pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 35, No. 1, pp. 93~101 (2020)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2020.35.1.93

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

올레산 유도 비알코올성 지방간세포에서 자색옥수수 색소 1호 포엽과 속대 추출물의 지질 축적 억제 효과

이기연[1] · 김태희[1] · 김재은[1] · 배선화[1] · 박아름[1] · 이효영[1] · 최성진[1] · 박종열[2] · 권순배[1] · 김희연[1]*

[1]강원도농업기술원 농식품연구소
[2]강원도농업기술원 옥수수연구소

Inhibitory Effect of Purple Corn 'Seakso 1' Husk and Cob Extracts on Lipid Accumulation in Oleic Acid- Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease HepG2 Model

Ki Yeon Lee[1], Tae hee Kim[1], Jai Eun Kim[1], Son wha Bae[1], A-Reum Park[1], Hyo Young Lee[1], Sun jin Choi[1], Jong yeol Park[2], Soon bae Kwon[1], Hee Yeon Kim[1]*

[1]*Agriproduct Processing Experiment Station, Gangwon-do Agricultural Research and Experiment Services, Korea*
[2]*Hongcheon Maize Experiment, Gangwon-do Agricultural Research and Experiment Services, Korea*

(Received November 25, 2019/Revised November 28, 2019/Accepted December 19, 2019)

ABSTRACT - Seakso 1, a maize hybrid, was developed in 2008 by Gangwon Agricultural Research and Extension Services in Korea and registered in 2011. It is single-cross hybrid, semi-flint, deep-purple variety of corn, variety of are yellow, while the husks and cobs are purple. Due to the sensitivity of Seakso 1 to excess moisture after seeding, water supply should be carefully managed, and it should be harvested at a suitable time to obtain the highest anthocyanin content. This study investigated the hepatoprotective effect of Saekso 1 corn husk and cob extracts (EHCS) in oleic acid-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in HepG2 cells. EHCS showed a high level of lipid accumulation inhibiting effect. EHCS also suppressed triglyceride accumulation and inhibited expression of lipid marker genes, such as sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) and sterol regulatory element binding protein-1a (SREBP-1a). Analysis by western blot of the expression of p-AMPK, p-SREBP1, PPARα, and FAS proteins showed that the incidence of SREBP1 protein, a major factor involved in lipid metabolism in the liver, has decreased significantly after treatment with the extracts. Moreover, the protein-induced expression of FAS, a major enzyme involved in the biosynthetic pathways of fatty acids, was decreased significantly in all concentrations. These results suggest that EHCS is a potent agent for the treatment of NAFLD.

Key words : NAFLD, Purple corn, Husk, Cob, Oleic acid, HepG2

지방간은 지방이 차지하는 비율이 5% 이상인 상태로 주로 중성지방, 인지질 및 에스터형 콜레스테롤이 과량 축적된다. 지방축적 유발위험인자로는 알코올과 비만, 당뇨, 고지혈증, 고혈압 등 체내 대사이상을 들 수 있다. 비알코올성 지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease)은 1980년대 음주를 하지 않은 비만한 여성 환자에게서 나타난 알콜성 간염 소견을 갖는 새로운 증후군으로 알려지게 되었다. 천천히 발생되는 만성질환으로 비만, 당뇨, 고지혈증, 고혈압 등 대사 증후군과 같은 다른 질환을 동반하는 경우가 많아 치료 약제 개발이 쉽지 않고, 현재까지 효과적인 치료 약제도 없는 실정이다. 현재 식품의약품안전처에 등록된 간기능개선 기능성 원료 11개 중 비알코올성 지방간 개선 효과로 인정받은 추출물은 댕댕이나무열매추출분말(제2019-19호)로 비알코올성 지방간 기능성원료의 개발은 전무한 상황으로 이와 관련된 소재개발이 지속적으로 요구되고 있다.

비알코올성 간 손상의 원인으로는 영양 과잉으로 인한

*Correspondence to: Hee Yeon Kim, Agriproduct Processing Experiment Station, Gangwon-do Agricultural Research and Experiment Services, Chuncheon 24203, Korea
Tel: +82-33-248-6526, Fax: +82-33-248-6555
E-mail: heeya80@korea.kr

간 내 지방축적 증가와 간 내 산화스트레스 증가 및 간세포 손상으로 알려져 있다. 영양과잉으로 인한 간 내 지방축적의 경우 sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)와 carbohydrate response element binding protein (ChREBP)이 활성화되어 지방산 합성을 촉진하는 유전자 발현이 증가되며, 지방산 합성 증가로 생성되는 말로닐-CoA (malonyl-CoA)이 CPT-1 (carnitine palmitoyl transferase-1)의 작용을 억제하여 미토콘드리아에서 지방산 베타-산화를 감소시켜 결국 간 내 지방축적이 촉진되는 것이다[1].

본 연구에 사용된 자색옥수수 색소 1호는 강원도 농업기술원 옥수수연구소에서 개발한 품종으로 알곡은 노란색이고 속대와 포엽은 자색으로 2014년 품종등록 되었다(제4967호). 자색옥수수 색소 1호 품종은 포엽과 속대에 안토시아닌을 고함유하는 것을 특징으로 하며, 총안토시아닌 함량은 8.61%로 보고되었다[2]. 자색옥수수의 부위별 안토시아닌 함량분석에 관한 연구에서 자색옥수수의 포엽, 속대, 잎에서 C-3-G를 포함한 10종의 안토시아닌 색소가 확인되었으며, 자색옥수수 속대의 1% citric acid를 포함한 60% 에탄올 추출물에서 C-3-G를 포함한 9개의 안토시아닌 색소가 확인되었다[3,4]. 자색옥수수의 주요 기능성으로는 항산화, 항세균성, 항돌연변이, 항암활성, 항당뇨, 항비만 효과 등이 있으며[5,6], 안토시아닌의 항산화 활성 효과면에서 주로 활성산소 제거능, 지질과산화물 생성억제의 효과 등이 보고되었다[7,8]. 본 연구는 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 간 조직 내에서 지방산의 합성 및 산화 등 지질 대사에 관여하는 유전자와 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 수행되었다. 본 연구의 결과는 향후 자색옥수수 색소 1호의 비알코올성 간 보호 기능성 식품 개발에 관한 기초자료로 제공하고자 한다.

Materials and Methods

실험재료

본 실험에 사용된 자색옥수수 색소 1호 품종은 2016년도에 강원도농업기술원 옥수수연구소에서 표준재배법에 준하여 재배되었다. 재배된 자색옥수수 색소 1호를 수확하여 수염과 외피를 제거하고 건조하여 포엽과 속대를 분리한 다음 분쇄하여 추출시료로 사용하였다. 옥수수 포엽과 속대 건조분말시료 500 g에 0.1% citric acid가 함유된 30% 에탄올을 10 L씩 첨가하고 12시간 동안 상온 교반하여 3회 반복 추출하였다. 추출액을 여과하여 감압농축하고 부형제로 30% dextrin을 첨가한 다음 분무건조하여 HepG2 세포 내 지방생성억제효능 검정용 시료로 사용하였다.

세포배양 및 추출물 처리

본 실험에 사용된 HepG2 (HB-8065)는 인체 유래 간암세포주이며, 세포는 미국 세포 은행인 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. HepG2 세포에 10% fetal bovine serum과 trypsin-EDTA 및 penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)를 넣고 5% CO_2, 37°C의 조건하에서 배양하였다. HepG2 세포를 6-well plate에 5×10^6 cells/well의 농도로 분주하고 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물을 0, 100, 500, 1,000 μg/mL의 농도로 처리한 후, 세포 내 지질 축척을 유도하기 위하여 0.2 mM 농도의 oleic acid (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)를 처리하고 24시간 동안 배양하였다.

세포 독성 분석

자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 세포 독성은 EZ-CYTOX assay kit (DAEILLAB SERVICE co., Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 세포 배양액을 96-well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 100 μL씩 분주하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 다음 농도별 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물(0, 10, 50, 100, 500, 1,000 μg/mL)을 각 well에 10 μL씩 첨가하고 24시간 배양하였다. 배양 후 EZ-cytox reagent 10 μL를 각 well에 분주하고 4시간 배양한 다음 ELISA reader (FLUOstar Omega, BGM LABTECH, Ortenberg, Germany)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Oil Red O 염색

추출물 및 oleic acid 처리하고 24시간 후 배지를 제거한 뒤 10% formaldehyde 용액을 30분간 처리하여 세포를 고정시켰다. 상온에서 고정한 뒤 용액을 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)으로 2번 세척한 다음 70% 알코올로 2번 세척한 후 Oil Red O (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)용액을 이용하여 염색을 실시하였다. 염색된 세포를 광학현미경(AG Axio Observer D1 Inverted Microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 통하여 200배 배율로 이미지를 관찰하였으며 염색된 지방구(lipid droplet)는 isopropyl alcohol 용액으로 용해시켜 510 nm에서 흡광도(xMark™ microplate absorbance spectrophotometer, Bio-Rad, Tokyo, Japan)를 측정하고 세포내 지방축적 억제 정도를 측정하였다.

Nile Red 염색

추출물 및 oleic acid 처리하고 24시간 후 배지를 제거한 뒤 10% formaldehyde 용액을 30분간 처리하여 세포를 고정시켰다. 상온에서 고정한 뒤 용액을 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)으로 2번 세척한 다음 70% 알코올로 2번 세척한 후 Nile Red (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)용액을 이용하여 염색을 실시하였다. 염색된 세포는 형광현미경을 통해 200배 배율로 이미지를 관찰하였다.

Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정

Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정은 24시간 배양된 세포에서 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 RNA를 추출하고 total RNA를 정량하였다. 추출된 RNA를 DNase가 포함되어 있는 High capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 정량하여 cDNA로 합성하고, SYBR Green과 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), carnitine palmitoyltransgerase 1A (CPT-1), peroxisome proliferator activated receptor α (PPARα), peroxisome proliferator activated receptor γ (PPARγ), acetyl-CoA carboxylase alpha (ACC), stearoyl-CoA desaturase (SCD), fatty acid synthase (FAS), microsomal trigryceride transfer protein (MTTP), CD36 molecule (CD36), sterol regulatory element-binding protein-1a (SREBP-1a), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBPα) primer를 이용하여 real-time PCR (StepOne Real-time PCR system, Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA)을 수행하였다[9]. 대조군 유전자로는 GAPDH를 사용하였으며 해당 유전자의 primer 및 sequence는 Table 1과 같다.

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

배양된 HepG2 세포에 추출물 처리 후 30분, 24시간 후 각각 PBS로 2번씩 세척한 후 protease inhibitor가 포함된 RIPA buffer (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)로 30분간 ice에서 용해시킨 뒤 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻어진 상층액은 10% SDS polyacrylamide gel로 전기영동을 통해 단백질을 분리한 뒤

Table 1. Primer sequence used in real-time PCR

Target gene	Sence	Sequence (5`-3`)
GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (NM_001289746.1)	F	CCACTCCTCCACCTTTGAC
	R	ACCCTGTTGCTGTAGCCA
CPT1 Carnitine palmitoyltransgerase 1A (NM_001876.3)	F	TTCAGTTCACGGTCACTCCG
	R	TGACCACGTTCTTCGTCTGG
PPARα Peroxisome proliferator activated receptor α (NM_001001928.2)	F	TCACCACAGTAGCTTGGAGC
	R	GTGAAAGCGTGTCCGTGATG
PPARγ Peroxisome proliferator activated receptor γ (NM_005037.5)	F	GGCTTCATGACAAGGGAGTTTC
	R	AACTCAAACTTGGGCTCCATAAAG
C/EBPα CCAAT/enhancer-binding protein α (NM_004364.4)	F	CCAGAAAGCTAGGTCGTGGG
	R	ACAAACAAGGCTGAGGGTCC
FAS Fatty acid synthase (NM_004104.4)	F	CAGAGCAGCCATGGAGGAG
	R	AATCTGGGTTGATGCCTCCG
SCD Stearoyl-CoA desaturase (NM_005063.4)	F	CCCTGCTTACTTGGTGAGGG
	R	TGCCCTAGGCTGTAGGGAAT
MTTP Microsomal trigryceride transfer protein (NM_001300785.1)	F	CATATATTCTTGTCACACAACTGGT
	R	CCACATCCACGTTGGAGGAA
CD36 CD36 molecule (NM_001289909.1)	F	TGGCTGTGGCATACAACAATACT
	R	TGGAAATGAGGCTGCATCTGT
SREBP-1c Sterol regulatory element-binding protein-1c	F	TCAGCGAGGCGGCTTTGGAGCAG
	R	CATGTCTTCGATGTCGGTCAG
SREBP-1a Sterol regulatory element-binding protein-1a	F	GGAGGGGTAGGGCCAACGGCCT
	R	CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC
ACC Acetyl-CoA carboxylase alpha	F	TGATGTCAATCTCCCCGCAGC
	R	TTGCTTCTTCTCTGTTTTCTCCCC

nitro cellulose membranes (#1620112, BIO-RAD, Germany)으로 transfer하였다. 1차 항체는 GAPDH (#14C10, Cell signaling, Danvers, MA, USA), p-AMPK (#T172, Cell signaling, USA), p-SREBP1 (#Ser372, Cell signaling, USA), PPARα (ab8934, abcam, UK), FAS (ab82419, abcam, UK)를 사용하였고 2차 항체로는 HRP-conjugated anti-rabbit (1:10000)을 사용하였다. 각각의 단백질 발현양은 Chemidoc XRS+ with Image Lab software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 분석하였다[10].

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였고 결과는 평균(Mean)과 표준편차(SD, Standard Deviation)로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다 (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Results and Discussion

세포 독성 분석

자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 HepG2 간암세포에 대한 세포독성 검정을 위해 EZ-CYTOX assay를 수행하였다. HepG2 세포를 96well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 분주하여 배양한 한 후 농도별 추출물을 24시간 동안 처리하여 세포독성을 평가한 결과, 1,000 μg/mL 이하의 농도에서 HepG2 간암세포의 세포 생존율에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(Fig. 1).

중성지방 축적 억제 효과

HepG2 세포에 oleic acid와 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물 100, 500, 1,000 μg/mL을 처리하였으며,

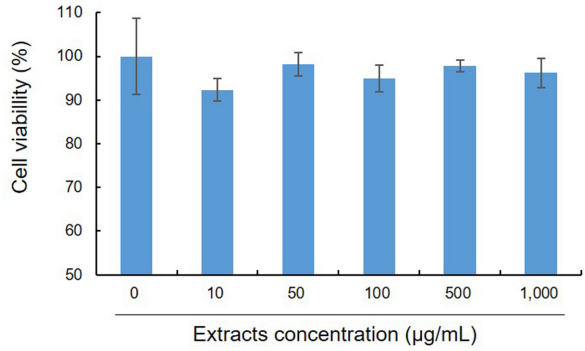

Fig. 1. Effect of Seakso 1 husk and cob extracts on cell viability in HepG2 cells. Each bar represents the mean±SD (n=3).

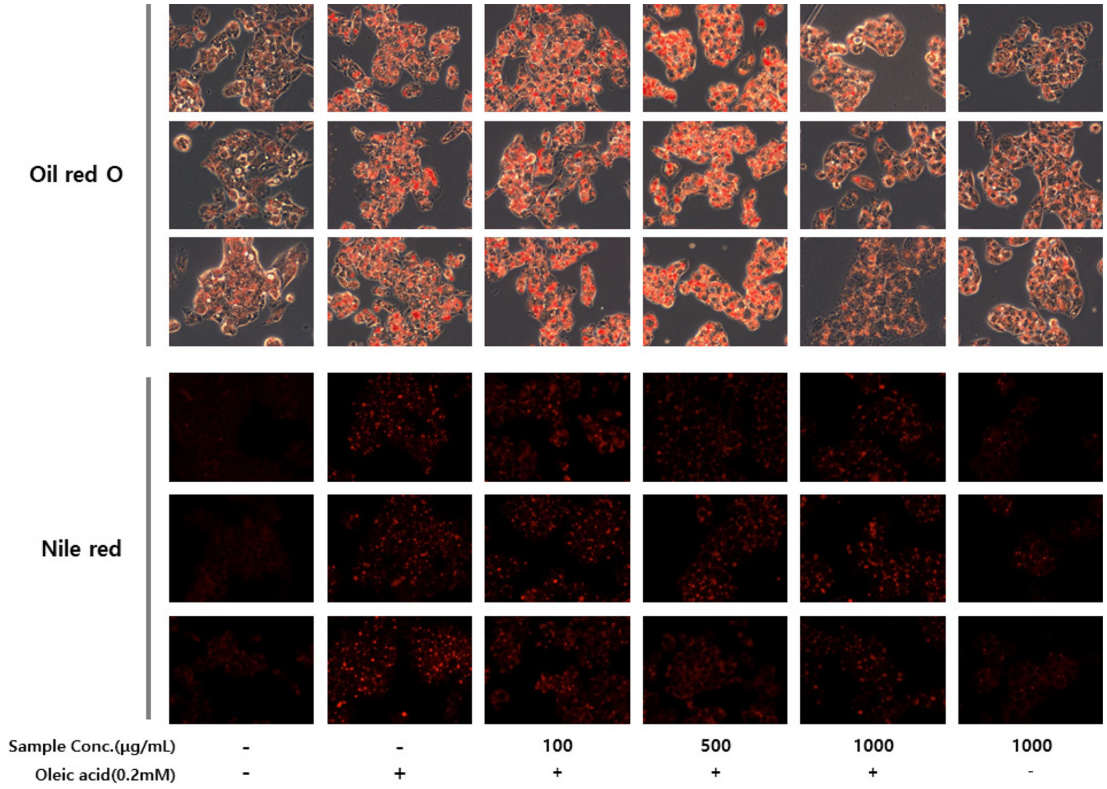

Fig. 2. Inhibition of lipid accumulation by treatments of Seakso 1 husk and cob extracts in HepG2 cells. Cells were stained with Oil Red O and Nile Red reagent.

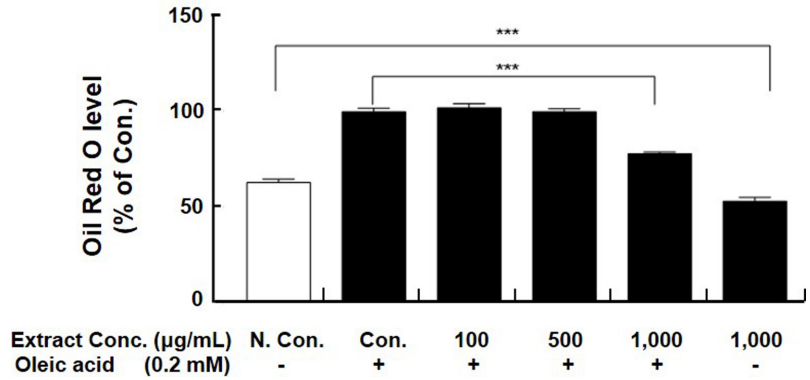

Fig. 3. Oil red O levels by treatments of Seakso 1 husk and cob extracts in HepG2 cells.

Oil Red O와 Nile Red 시약으로 지방을 염색하고 광학 및 형광현미경을 이용하여 지방의 축적을 관찰하였다. 실험결과, Oil Red O 염색을 통하여 oleic acid 처리에 의한 지방생성이 증가된 것을 확인하였으며 추출물 1,000 μg/mL 농도에서 지방생성이 21.85% 감소된 것으로 나타났다(Fig. 2, 3). Nile Red 염색을 통해 염색된 HepG2 세포 내 생성된 지방구는 형광현미경 관찰을 통해 확인되었으며, oleic acid 처리로 인하여 지방이 형성된 HepG2 세포에서 추출물 500, 1,000 μg/mL 처리에 의하여 증가된 지방이 감소된 것으로 나타났다(Fig. 2).

Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정

자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물에 의한 HepG2 세포 내 지질 축적의 변화를 확인하기 위하여 배양된 세포에 oleic acid로 지질 축적을 유도하고 추출물을 처리하지 않는 대조군과 추출물을 처리한 실험군의 지방합성 및 축적에 관련된 유전자 발현량을 측정하였다. 비알코올성 지방간증은 지방합성 및 대사의 불균형으로 인하여 간 세포내 중성지방이 증가함으로써 나타나는 증상이다[11]. 간의 지방 합성과 대사 관련 핵심인자인 SREBP-1c, SREBP-1a, ACC, FAS, SCD-1, PPARγ, C/EBPα, CD36 발현이 증가함에 따라 간세포 내에 지방 축적이 유도된다. SREBP-1c와 SREBP-1a는 간에서 지방산 및 중성지방의 합성을 조절하는 활성인자로서 특히 간에서의 분포가 높은 것으로 알려진 SREBP-1c 유전자는 간세포에서 중성지방의 합성에 관여하는 효소인 ACC, FAS, SCD-1 등의 발현을 조절한다[12]. 간에서 SREBP-1c 발현의 증가로 지방 합성에 관여하는 ACC, FAS, SCD-1 등이 증가되며 이는 간 조직에서의 중성지방 축적을 야기시킨다[13,14]. 지방간 병변이 관찰되는 ob/ob mice의 SREBP-1c 유전자를 비활성시켰을 때 간조직의 지방축척이 50% 감소된다고 보고되었다[15]. 따라서 지방 합성에 관여하는 유전자의 발현량을 통하여 간 조직 내에서 지질축적의 정도를 판단할 수 있다. 본 연구에서 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 지방대사 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Real-time PCR를 실시하여 각각의 유전자 발현량을 측정한 결과, oleic acid에 의하여 지질 축적이 유도된 대조군에 비하여 모든 추출물 처리군의 SREBP-1c와 SREBP-1a 유전자 발현량이 유의적으로 감소되었다. 간 조직 내 지방 합성과 관련된 효소들의 유전자 발현량을 측정한 결과, ACC는 추출물의 500 μg/mL 농도에서 대조군에 비하여 유의적인 감소를 나타내었으며, FAS는 추출물의 처리 농도에 따라 감소하는 것으로 나타났으나 control과 농도별 처리군 간의 유의적인 차이는 없었다. SCD는 추출물 처리군에서 증가하는 경향을 보였고, 간세포 내로 지방산을 이동시키는 지방산 특이 수송체인 CD36은 지질 축적이 유도된 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며 추출물 처리군 별로 실험적 오차가 큰 것으로 나타났다. 자색옥수수 색소 1호 포엽 속대 추출물의 처리로 SREBP-1c와 SREBP-1a의 발현량의 억제와 이에 따른 지방 합성 관련 효소들과의 상관관계에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다. 간에서 지질대사에 관여하며 지방산 산화와 관련된 유전자 전사의 주된 조절 인자로 작용하는 PPARα는 주로 간세포에 분포하는 전사인자로써 CPT-1의 발현을 증가시켜 지방산의 β-oxidation을 촉진시킨다[16]. CPT-1는 PPARα의 표적유전자로 미토콘드리아 내부로의 지방산 이동에 관여하며 PPARα에 의해 발현량이 증가되어 세포 내 지방 축적을 억제하는 역할을 한다. 간에서의 PPARα의 활성으로 인한 CPT-1의 증가는 지방산의 β-oxidation를 촉진시킴으로써 중성지방의 분해를 증가시키고 혈중 중성지방 농도의 개선의 효과를 나타낸다[17,18]. Oleic acid에 의하여 지질 축적이 된 HepG2 세포에서 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 처리로 인하여 PPARα 유전자의 발현은 추출물의 처리 농도별로 증가하는 경향을 나타내었으나 시료를 처리하지 않은 대조군과의 유의적인 차이는 없었다. CPT-1 유전자의 발현은 추출물의 100 μg/mL 처

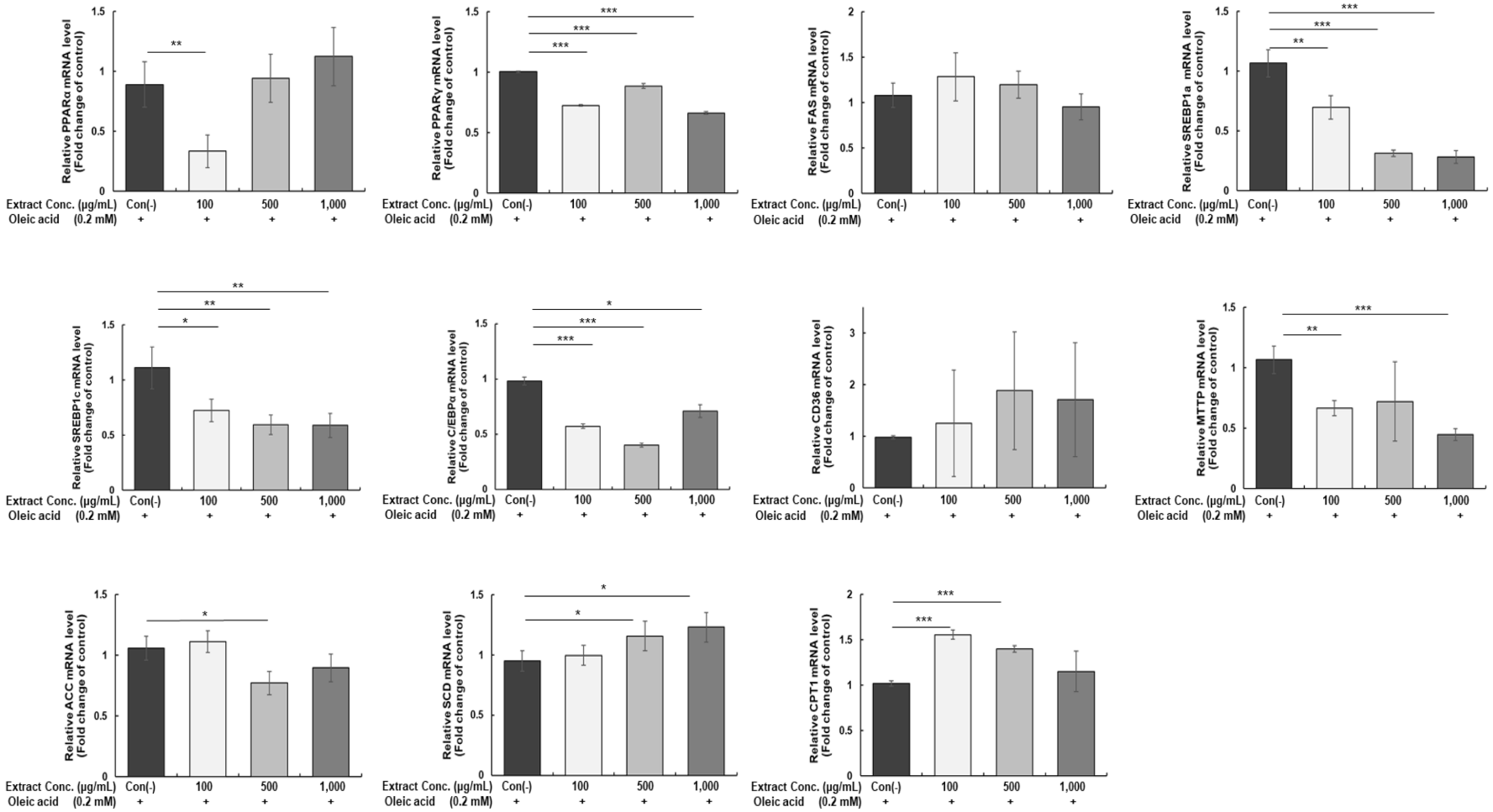

Fig. 4. Effect of Seakso 1 husk and cob extract on mRNA expression level in HepG2 cell. CON : oleic acid treatment group. Each bar represents the mean±SD (n=3). Statistical significance was determined as **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 compared to oleic acid treated cells.

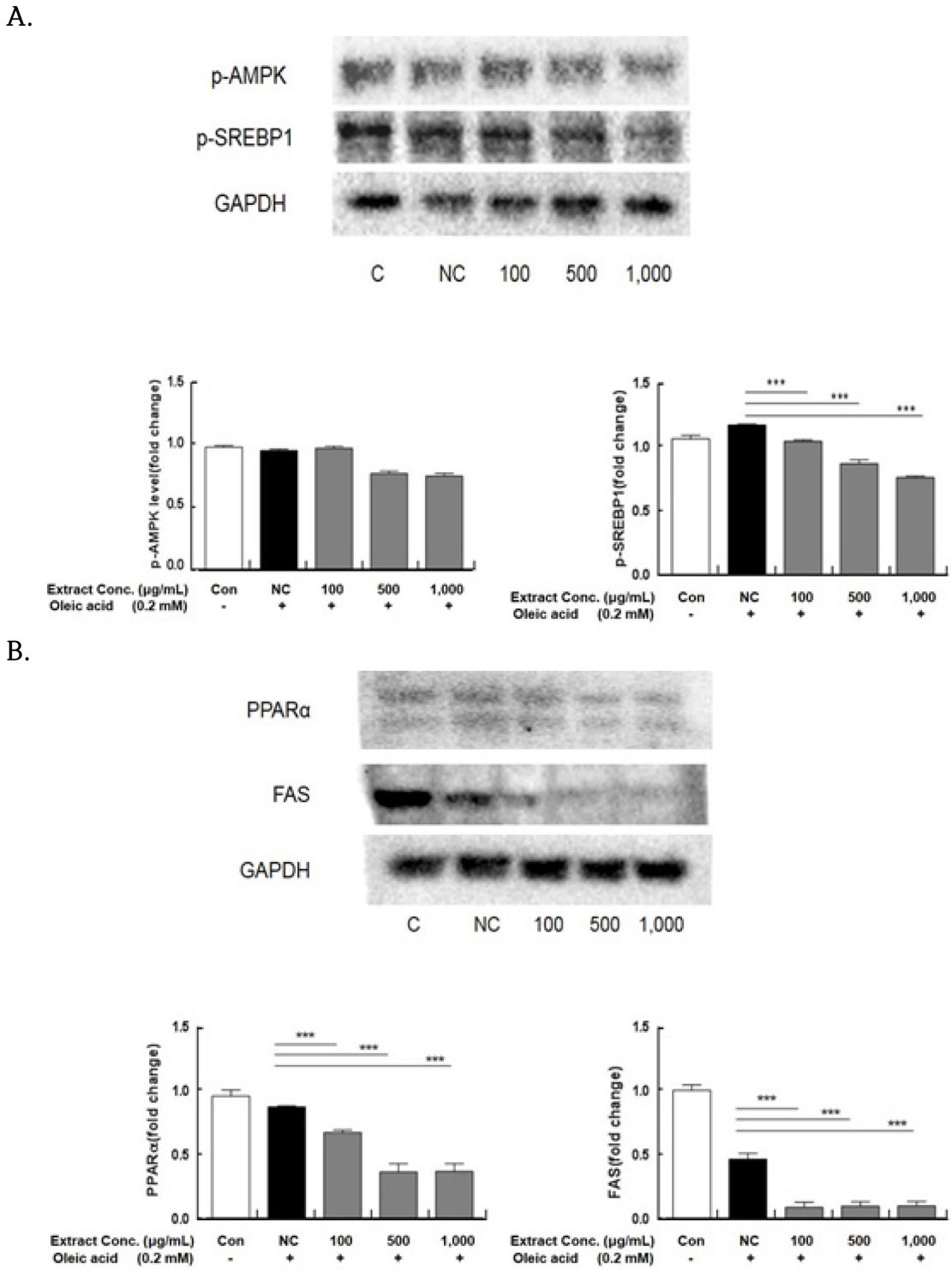

Fig. 5. Effect of Seakso 1 husk and cob extract on protein expression level in HepG2 cell. CON : normal cell group, NC : oleic acid treatment group. Each bar represents the mean±SD (n=3). Statistical significance was determined as **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 compared to oleic acid treated cells.

리군에서 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였으나 처리 농도별로 발현량이 감소하는 경향을 보였다. 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 처리로 인한 PPARα와 CPT-1 유전자 발현량 증가 효과는 다소 미비한 것으로 판단된다. PPARγ와 C/EBPα는 지방세포 분화과정의 중추적인 역할을 하는 전사인자로써 3T3-L1 지방전구세포가 지

방세포로 분화되어 세포 내 중성지방을 축적시키는 역할을 한다[9,19]. 지방세포가 분화하는 과정에 관여하는 PPARγ와 C/EBPα 등과 같은 전사인자들의 활성 억제는 세포 내 지방 축적을 억제하는 역할을 하는 것으로 판단된다. 앞서 연구에서 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 대조군에 비하여 추출물 처리군의 PPARγ와 C/EBPα의 유전자 발현을 유의적으로 감소시킨 것으로 나타났다[20]. 본 연구에서 지질 축적이 유도된 HepG2 세포에서 추출물 처리로 인하여 PPARγ와 C/EBPα유전자 발현량이 추출물 처리 농도에 의존적으로 감소하는 경향은 없었지만 모든 추출물 처리군에서 대조군에 비하여 유의적으로 감소된 것을 확인하였다. 따라서, 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물은 지방분화세포에서 뿐만 아니라 간 조직 세포 내에서도 지방 대사에 관여하는 PPARγ와 C/EBPα 유전자의 활성을 억제하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 간 조직 내에서 지방의 합성 및 축적 등 지질대사와 관련된 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot을 실시하여 p-AMPK, p-SREBP1, PPARα, FAS의 단백질 발현량을 측정하였다. 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물 처리 30분 후 HepG2 세포에서 단백질을 추출하여 p-AMPK, p-SREBP1 단백질 발현량을 측정한 결과, p-AMPK는 감소하는 경향을 나타내었으나 지질 축적이 유도된 NC와의 유의적인 차이는 없었으며, p-SREBP1는 추출물의 농도가 증가함에 따라 NC에 비하여 단백질 발현량이 유의적으로 감소된 것을 확인하였다. 또한 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물 처리 24시간 후 HepG2 세포에서 단백질을 추출하여 PPARα, FAS 단백질 발현량을 측정한 결과, PPARα와 FAS의 발현량은 추출물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다. RT-PCR을 통한 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물의 HepG2 세포에서의 PPARα 유전자 활성 효과는 미비한 것으로 조사되었으며 PPARα 단백질 발현량에서도 농도에 따라 오히려 감소하는 경향을 나타내어 추출물로 인한 간 세포에서의 PPARα 활성 효과는 낮은 것으로 판단된다.

인산화된 AMP-activated protein kinase (AMPK)가 활성화되면 SREBP-1c의 발현을 감소시킨다[21]. AMPK는 간과 골격근을 포함한 전신 지질 대사를 조절하는 역할을 하며 이와 관련하여 에너지 균형을 유지시키는 역할을 하는데, 활성화된 APMK는 지방산의 산화를 촉진시켜 포도당이 세포 내로 유입을 유도하여 에너지원으로 사용할 수 있게 한다[22,23]. AMPK의 활성화는 간에서 지질 대사에 관여하는 주요 인자인 SREBP-1c의 발현을 억제하고 FAS 또는 ACC와 같은 지방합성 효소를 불활성화 시킴으로써 지방산의 β-oxidation을 촉진시킨다[23]. FAS의 불활성화는 지방산 및 중성지방합성의 억제와 관련이 있으며 이로 인하여 세포 내 중성지방의 분해가 촉진되고 혈중 중성지방 농도의 개선효과를 기대할 수 있다[17,18]. 본 연구 결과 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물 처리에 의한 HepG2 세포 내에서의 AMPK 단백질 활성에 대한 연관성은 낮은 것으로 나타났으나 주로 간에서 지방산 및 중성지방의 합성에 관여하는 SREBP1의 단백질 발현은 지질 축적이 유도된 NC에 비하여 추출물의 처리 농도에 따라 유의하게 감소되었음이 확인되었다. 또한, 지방산의 생합성 경로에 관여하는 주요 효소인 FAS의 단백질 발현향은 지질 축적이 유도된 NC에 비하여 모든 처리 농도에서 현저하게 감소된 것이 확인되었다. 따라서 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 oleic acid로 지질 축적이 유도된 HepG2 세포에서 SREBP1 단백질 발현을 억제시키고 이에 따라 지방합성에 관여하는 효소인 FAS 단백질 발현을 억제시켜 세포 내 지질 축적을 감소시킨 것으로 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 “경제협력권산업육성사업(지역주도형 R&D, R0005796)”로 수행된 연구결과입니다.

국문요약

본 연구의 목적은 oleic acid로 지방생성이 유도된 HepG2 세포에서 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 간 세포 내 지방생성에 미치는 영향을 구명하는 것이다. 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물에 의한 HepG2 세포 내 지방 축적의 변화를 확인하기 위하여 배양된 세포에 oleic acid로 지방 축적을 유도하고 추출물에 의한 중성지방생성 억제 효과를 측정하였으며 추출물을 처리하지 않은 대조군과 추출물을 처리한 실험군의 지방합성 및 축적에 관련된 유전자와 단백질 발현량을 RT-PCR과 Western blot을 통하여 측정하였다. Oil Red O와 Nile Red 염색을 통하여 추출물의 처리로 HepG2 세포 내 중성지방 축적이 억제된 것을 확인하였다. RT-PCR에 의하여 mRNA 발현량을 측정한 결과, oleic acid에 의하여 지방 생성이 유도된 대조군에 비하여 모든 추출물 처리군의 SREBP-1c와 SREBP-1a 유전자 발현량이 유의적으로 감소되었다. Western blot을 실시하여 p-AMPK, p-SREBP1, PPARα, FAS 단백질의 발현량을 측정한 결과, 간에서 지질대사에 관여하는 주요 인자인 SREBP1 단백질의 발현은 추출물의 처리 농도에 따라 유의하게 감소하였으며 지방산의 생합성 경로에 관여하는 주요 효소인 FAS의 단백질 발현향은 모든 처

리 농도에서 현저하게 감소된 것이 확인되었다. 본 연구 결과는 자색옥수수 색소 1호 포엽 및 속대 추출물이 간세포 내에서 중성지방의 축적을 억제시키고 지질 합성에 관련된 유전자 및 단백질의 발현을 억제시킴으로써 간 세포 내 지질 축적을 완화할 수 있는 기능성 소재로의 활용가치가 높다고 판단된다.

Reference

1. Kim, C.S., Cho, E.H., Choe, S.Y., Kang, M.S., Yu, R., Inhibitory effect of isorhamnetin on lipid accumulation in free fatty acid-induced steatotic hepatocytes through the PPARα pathway. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **47(7)**, 703-709 (2018).
2. Lee, K.Y., Hong, S.Y., Kim, T.H., Kim, J.E., Park, A.R., Noh, H.S., Kim, S.C., Park, J.Y., Ahn, M.S., Jeong, W.J., Kim, H.Y., Inhibition of pancreatic lipase activity and adipocyte differentiation in 3T3-L1 Cells treated with purple corn husk and cob extracts *J. Food Hyg. Saf.,* **33(2),** 131-139 (2018).
3. Kim, S.L., Kim, E.H., Son, Y.K., Song, J.C., Hwang, J.J., Hur, H.S., Identification of anthocyanin pigments in black waxy corn kernels. *Korean J. Breed*, **31**, 408-415 (1999).
4. Kim, S.L., Hwang, J.J., Song, J., Song, J.C., Jung, K.H., Extraction, purification and quantification of anthocyanins in colored rice, black soy bean and black xaxy corn. *Korean J. Breed,* **32**, 146-152 (2000).
5. Kim, J.T., Son, Y.B., Lee, J.S., Baek, S.B., Woo, K.S., Jung, G.H., Kim, M.J., Jeong, K.H., Kwon, Y.U., Effects of particle size on antioxidant activity and cytotoxicity in purple corn seed powder. *Korean J. Crop. Sci*., **57**, 353-358 (2012).
6. Lee, J.S., Son, B.M., Kim, J.T., Ku, J.H., Han, O.K., Baek, S.B., Moon, J.K., Hwang, J.J., Kwon, Y.U., Change of total anthocyanin contents and antioxidant activities of purple waxy corn inbred lines and hybrids during grain filling. *Korean J. Breed Sci.*, **44**, 290-300 (2012).
7. Duan, X.W., Jiang, Y.M., Zhang, Z.Q., Shi, J., Antioxidant properties of anthocyanin extracted from litchi (*Litchi chinenesis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. *Food Chem*., **101**, 1365-1371 (2006).
8. Chung, M.G., Lim, J.D., Antioxidant, anticancer and immune activation of anthocyanin fraction from *Rubus Coreanu*s miquel fruits(Bokbunja). *Korean J. Medicinal Crop Sci.,* **20**, 259-269 (2012).
9. Choi, H.Y., Kim, G.H., Inhibitory effects of *Allium senescens* L. methanol extracts on reactive oxygen species production and lipid accumulation during differentiation in 3T3-L1 cells. *Korea J. Food Sci. Technol*., **46(4)**, 498-504 (2014).
10. Lim, H.J., Seo, J.E., Chang, Y.H., Han, B.K., Jeong, J.K., Park, S.B., Choi, H.J., Whang, J.N., Anti-obesity effects of Jeju Hallabong Tangor (Citrus kiyomi × ponkan) peel extracts in 3T3-L1 adipocytes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **43(11)**, 1688-1694 (2014).
11. Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., McCullough, A., Natale, S., Forlani, G., Melchionda, N., Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes,* **50,** 1844-1850(2001).
12. Rawson, R.B., Control of lipid metabolism by regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs). *Biochem Soc. Symp.,* **70,** 221-231 (2003).
13. Shimomura, I., Bashmakov, Y., Horton, J.D., Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.,* **274,** 30028-30032 (1999).
14. Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P., Foufelle, F., Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **96,** 12737-12742 (1999).
15. Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., Friedman, J.M., Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science,* **269,** 543-546 (1995).
16. Lee, K.E., Song, J.L., Jeong, B.J., Jeong, J.S., Huh, T.G., Park, K.Y., Anti-lipogenic effect of functional cereal samples on high sucrose diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **45(6),** 789-796 (2016).
17. Hashimoto, T., Cook, W.S., Qi, C., Yeldandi, A.V., Reddy, J.K., Rao, M.S., Defect in peroxisome proliferator-activated receptor α-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J. Biol. Chem.,* **275,** 28918-28928 (2000).
18. Lapsys, N.M., Kriketos, A.D., Lim-Fraser, M., Poynten, A.M., Lowy, A., Furler, S.M., Chisholm, D.J., Cooney, G.J., Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in human skeletal muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* **85,** 4293-4297 (2000).
19. Rosen, E.D., Spiegelman, B.M., Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi*., **16**, 145-171 (2000).
20. Jang, Y.S., Seo, J.Y., Kwun, M.J., Kwon, J.M., Lee, I., Hong, J.W., Kim, S.Y., Choi, J.Y., Park, S.H., Joo, M.S., Han, C.W., Effect of *Phaseolus angularis* seed on experimental cellular model of nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **27(6),** 802-808 (2013).
21. Long, Y.C., Zierath, J.R., AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest*., **116(7),** 1776-1783 (2006).
22. Ha, S.K., Kim, J., Chae, C., Role of AMP-activated protein kinase and adiponectin during development of hepatic steatosis in high-fat diet-induced obesity in rats. *J. Comp Pathol*., **145(1)**, 88-94 (2011).
23. Munday, M.R., Campbell, D.G., Carling, D., Hardie, D.G., Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *Eur J. Biochem.*, **175(2)**, 331-338 (1988).