

## 가지 물추출물의 3T3-L1 지방전구세포 분화 억제효능

이미경<sup>#</sup> · 류청 · 황방연 · 김선여\* · 이재학\*\*

충북대학교 약학대학, \*경희대학교 동서의학대학원, \*\*식물자원연구소  
(Received April 25, 2011; Revised May 16, 2011; Accepted May 31, 2011)

### Inhibitory Effect of Eggplant Extract on Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells

Mi Kyeong Lee<sup>#</sup>, Qing Liu, Bang Yeon Hwang, Sun Yeou Kim\* and Jae-Hak Lee\*\*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

\*Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University Global Campus, Gyeonggi-do 446-701, Korea

\*\*Korea Plant Resource Institute, Attached Well Root, Gyeonggi-do 413-832, Korea

**Abstract** — Abnormal growth of adipocyte characterized by increased cell numbers and differentiation is considered as a major pathological characteristic feature in obesity. Thus, inhibition of mitogenesis of preadipocytes and their differentiation to adipocytes would be beneficial for the prevention and inhibition of obesity. In the present study, we attempted to evaluate anti-adipogenic activity of eggplants (the fruits of *Solanum melongena* L.) employing preadipocytes cell line, 3T3-L1 as an *in vitro* assay system. Water extract of eggplants significantly inhibited adipocyte differentiation when treated during adipocyte differentiation process, as assessed by measuring fat accumulation using Oil Red O staining. Eggplant extract, however, showed little effects on fully differentiated adipocytes. Eggplant didn't show significant toxicity up to 500 µg/ml to the 3T3-L1 cells. Further studies with interval treatment demonstrated that eggplant exerted inhibitory activity on adipocyte differentiation via acting on early stage of adipogenesis. Conclusively, eggplants are suggested to be beneficial for the prevention of obesity.

**Keywords** □ Eggplant, *Solanum melongena*, Solanaceae, 3T3-L1 cells, adipocyte differentiation, obesity

비만이란, 신체 에너지의 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 과도한 에너지가 체지방으로 축적되어 나타나는 상태이다.<sup>1)</sup> 최근 비만이 세계 각국에서 증가추세에 있는 심각한 보건문제로 인식되고 있으며, 우리나라 역시 고도의 산업성장과 세계화의 영향으로 식생활 패턴의 서구화 및 신체 활동량 부족이 급속히 진행되어 비만 인구의 현저한 증가를 나타내고 있다. 비만의 경우 외모의 문제뿐만 아니라 다양한 합병증의 발병을 증가시켜 더욱 심각한 문제가 되고 있다. 비만한 사람은 쉽게 피로를 느끼고, 관절을 비롯한 통증 및 부종 등의 증상으로 불편을 초래하여 정상적인 활동에 영향을 준다. 또한 심혈관 질환, 고지혈증, 간기능 이상 및 지방간, 당뇨병, 내분비 장애, 폐기능 장애, 각종 암의 발생, 근골격 질환 및 심리적 질환 등 다양한 질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있어 사회적으로 심각한 문제가 되고 있다.<sup>2,3)</sup> 우

리나라에서도 비만인구가 증가하여 비만으로 인한 사회경제적 비용이 연간 약 1조 8,000억원으로 추산되고 있으며 이로 인하여 2007년 11월 국가비만관리대책위가 구성될 만큼 비만은 국가적으로 심각하고 위협적인 질병으로 부상하였다.

비만치료제의 경우 전 세계 의약품 시장에서 막대한 이윤을 창출하고 있으나 부작용으로 그 사용이 제한되고 있으며 따라서 부작용을 감소시키고 더불어 안정성 및 복용성이 향상된 새로운 비만치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 천연물의 경우 다양한 생리활성 성분을 포함하고 있으며 또한 오랫동안 사용되어 오면서 상대적으로 안정성을 확보하고 있어 천연물을 이용한 비만치료제의 개발이 활발히 진행되고 있다.<sup>4)</sup>

비만의 병리학적으로 지방세포의 과다증식이 원인이 되고 있다. 지방조직은 우리 몸의 에너지 항상성을 조절하는 중요한 대사기관으로서 adipokines이라고 불리는 다양한 인자들을 분비함으로써 glucose 대사, 식욕, 염증 반응 등을 조절하는 역할을 한다.<sup>5)</sup> 그러나 지방세포의 과도한 증식 및 세포내 지방의 축적을 glucose 및 지질 대사의 이상을 초래하며 이는 여러 질환의

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 043-261-2818 (팩스) 043-268-2732  
(E-mail) mklee@chungbuk.ac.kr

원인이 되고 있다. 이러한 지방세포의 과도한 증식은 여러가지 원인으로 인하여 지방전구세포의 비정상적인 증식과 분화를 통하여 이루어진다. 따라서 지방세포의 증식 및 분화의 억제제나 비만치료제 개발의 중요한 전략으로 간주되고 있다.<sup>4,6)</sup>

가지(*Solanum melongena* L.)는 가지과(Solanaceae)에 속하는 일년초로 우리나라를 비롯한 온대에 널리 분포하고 있다. 잎은 타원형으로 호생하며 긴 잎병이 있고 6~9월에 자주색의 꽃이 핀다. 가지(eggplant)로 불리는 열매는 난형에서 타원형의 장과로서 주로 흑자색을 띤다. 민간에서는 뿌리를 가근, 잎을 가엽, 과실의 꼭지를 가채라고 하여 각기, 치통, 동상등을 치료하는데 사용한다. 가지의 열매는 주로 식용으로 이용되며 최근 항산화, 항염, 간보호 작용 등이 보고되었다.<sup>7-9)</sup> 가지의 성분으로는 anthocyanin 색소로 nasunin, delphinidin 등이 알려져 있으며, chlorogenic acid 등의 페놀성 성분과 solamargin 등의 glycoalkaloid 성분들이 보고되었다.<sup>10-12)</sup>

본 연구에서는 식용으로 이용되는 과채류의 항비만 효능을 알아보고 비만치료제로의 개발 가능성을 알아보고자 한국에서 식용으로 널리 이용되고 있는 가지의 항비만 효능을 연구하였다. 가지에는 수용성 성분을 포함한 다양한 생리활성 성분들이 포함하고 있고 또한 식용으로 많이 섭취되고 있으므로 가지의 물추출물에 대하여 지방분화 연구에 널리 이용되는 3T3-L1 세포주를 이용하여 비만 지표의 하나인 지방분화 억제활성을 검색하였으며, 세포내 생성되는 지방의 양을 Oil Red O 염색법을 이용하여 염색하여 이를 정량함으로써 항비만 효능을 판단하였다.

## 실험방법

### 실험재료

Mouse 3T3-L1 preadipocyte세포주는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 분양 받아 사용하였다. 분화 유도에 사용된 insulin, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine(IBMx), dexamethasone, Oil Red O는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS) 등 세포배양에 사용된 시약은 Invitrogen 제품을 사용하였다.

### 추출물제조

가지는 2009년 경기도 고양시에서 재배된 신흑산호가지를 한국식물자원연구소에서 제공받아 사용하였다. 건조된 가지(768 g)를 초음파 추출기를 이용하여 40°C에서 3시간 동안 물로 추출하였다. 감압농축하여 물을 제거하여 물 추출물(22.5 g)을 얻었으며 이를 농도에 맞게 희석한 후 membrane filter(0.2 µm)로 여과하여 활성측정에 이용하였다.

### 3T3-L1세포주 분화의 유도 및 시료의 처리

3T3-L1 지방전구세포는 10% fetal bovine serum(FBS), 100 IU/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 포함하는 DMEM을 배양액으로 하여 37°C 배양기에서 공기(95%)와 CO<sub>2</sub>(5%)의 혼합기체를 계속 공급하면서 수행하였다.

지방 분화를 위하여 3T3-L1 preadipocyte를 1×10<sup>5</sup>/well 농도로 48-well plate에 분주하고 세포가 가득찬 뒤 2일을 더 배양하였다(Day 0). 다음 0.25 mM IBMx, 1 µg/ml insulin, 1 µM dexamethasone를 포함하는 분화유도 배지로 교환하여 2일간 분화를 유도하였다(Day 2). 이틀 후 1 µg/ml insulin을 함유하는 DMEM으로 갈아주고 2일 더 배양한 후(Day 4) DMEM으로 바꾸고 4일을 더 배양하였다(Day 8). 시료의 지방분화 저해 활성을 측정하고자 분화를 유도하는 동안(Day 0~8) 시료를 처리하였으며 배양액을 교체하는 경우 다시 시료를 처리하였다. 시료가 분화 시기 중 어느 시기에 작용하는지 알아보기 위하여 Day 0~2, Day 2~4, Day 4~8, Day 0~4, Day 2~8 기간에만 시료를 투여하고 그 외 시기에는 시료를 처리하지 않고 배양액만 교체하였다. 이 결과를 Day 0~8 기간 모두 시료를 처리한 결과와 비교하여 시료가 지방세포 분화 어느 단계에 작용하는지 판단하였다. 또한 농도를 달리하여 처리하여 농도에 따른 효과를 비교하였다.

### Oil Red O염색법

세포내 생성된 지방은 Oil Red O염색법을 이용하여 측정하였다. 8일간 지방분화 유도 후, 세포를 PBS로 세척하고 10% formalin으로 1시간 고정하였다. 세포고정 후, PBS 세척하여 고정액을 제거한 후 Oil Red O 용액을 사용직전 희석(0.6% Oil Red O : 물=3 : 2)하여 제조하고 15분간 세포내 지방을 염색하였다. 지방이 붉게 염색되면 염색액을 제거하고 물로 2번 세척한 후 현미경으로 관찰하였다. 또한 염색된 Oil Red O를 isopropyl alcohol로 용해시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.<sup>14)</sup>

### 세포생존율 측정

시료의 세포독성을 알아보기 위하여 3T3-L1 세포에 시료를 3일간 처리한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 수행하였다. 3T3-L1 세포를 0.5 mg/ml MTT로 2시간 배양한 생성된 formazan을 DMSO로 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계분석

실험결과의 통계적인 유의성은 Student's t-test로 분석하였으며 p value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성있는 것으로 판단하였다.

실험결과 및 고찰

가지는 한국에 널리 재배되고 소비되고 있으며 그 열매는 식용으로 많이 사용되고 있다. 가지는 다양한 색소를 포함하고 있으며 항산화 등의 작용이 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구 세포를 이용하여 지방분화 저해효능을 측정하여 항비만효능을 검색하고자 하였다.

지방분화는 IBMX, insulin 및 dexamethasone 등의 분화유도 호르몬으로 유도하였다. 분화를 유도하지 않은 세포는 지방의 생성이 거의 관찰되지 않았으나 분화된 지방세포는 세포내 지방을 축적하였으며 이는 Oil Red O 염색법을 이용하여 염색하면 쉽게 관찰이 가능하였다(Fig. 2). 그러나 지방분화를 유도하면서 가지의 물추출물을 처리한 경우 지방의 생성은 유의성있게 감소하였다(Fig. 1). 가지의 물추출물을 300 µg/ml로 처리하였을 때 약 50%의 지방생성 억제효과를 나타내었으며 이는 현미경에서도 쉽게 확인 가능하였다(Fig. 2). 가지의 물추출물은 500 µg/ml의 고농도에서도 특별한 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1). 한편 가지의 물추출물을 이미 지방분화가 유도되어 지방이 축적된 세포에 처리한 경우에는 그 저해효과가 미약하였다. 따라서 가지의 물추출물은 지방분화 억제효과는 뛰어났으나 지방분해 효과는 미약한 것으로 사료된다.

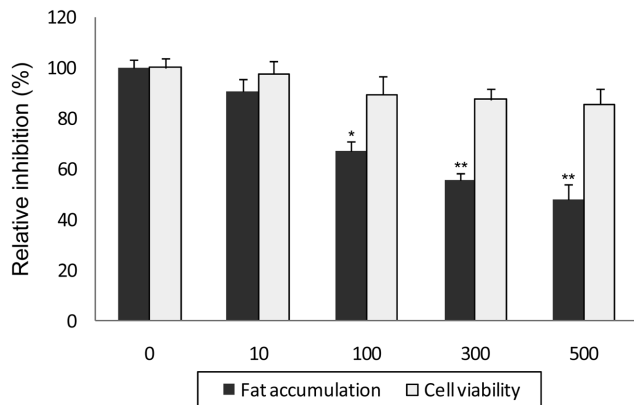


Fig. 1 – Effect of eggplant water extract on adipocyte differentiation and cell viability of 3T3-L1 cells. Cultures were induced to differentiate for 8 days and water extract of eggplant was treated for whole differentiation process (days 0~8). Cultures were then subjected to Oil Red O staining for adipocyte differentiation. MTT assay was assessed at day 3 for cell viability. Relative fat accumulation (%) was calculated as  $100 \times [(absorbance\ of\ sample - absorbance\ of\ undifferentiated\ control) / (absorbance\ of\ differentiated\ control - absorbance\ of\ undifferentiated\ control)]$ . Relative cell viability (%) was calculated as  $100 \times (absorbance\ of\ sample - treated / absorbance\ of\ control)$ . Results are expressed as mean ± SD of three independent experiments, each performed using triplicate wells. \*p<0.05; \*\*p<0.01 compared with differentiated control.

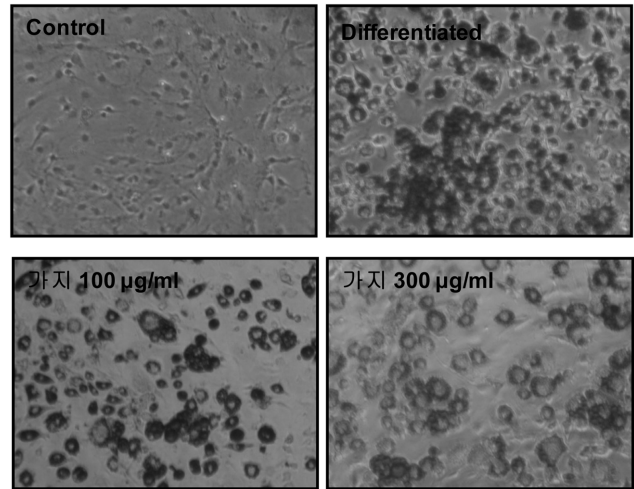
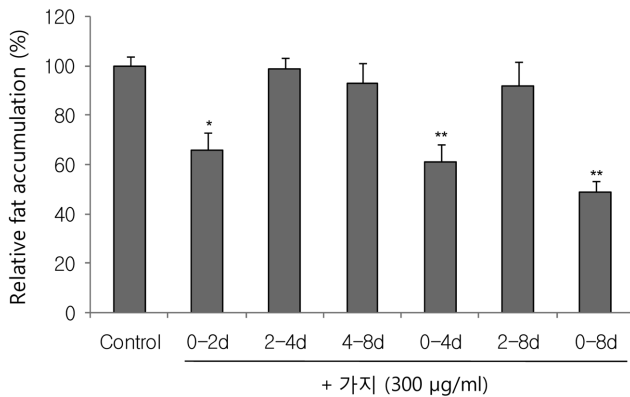


Fig. 2 – Effects of eggplant water extract on the morphology of 3T3-L1 cells. Cultures were induced to differentiate for 8 days. Cells were treated with eggplant water extract for whole differentiation process (days 0~8). On day 8, cultures were then subjected to Oil Red O staining. Figures are representatives of three independent experiments with similar results.

지방분화는 지방전구세포(preadipocytes)에서 지방세포(adipocytes)로 분화하는 과정으로 여러 인자에 의하여 단계별로 체계적으로 일어난다.<sup>15,16</sup> 분화가 진행되면 우선 지방전구세포는 지방증식이 억제되며 분화초기에는 preadipocyte factor-1(Pref-1)의 발현은 감소하고 PPARγ 및 CCAAT/enhancer-binding proteins(C/EBPs)의 발현은 증가한다. 분화가 진행되어 후기단계가 되면 지방대사와 fatty acid synthase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase 등이 증가한다.<sup>17,18</sup> 따라서 가지의 추출물이 지방분화의 어느 단계에 작용하여 지방분화를 억제하였는지 확인하고자 하였다. 3T3-L1 preadipocyte의 지방분화는 세포가 가득 찬 뒤 2일을 더 배양한 후 지방 분화 유도를 시작하였으며(Day 0). 0.25 mM IBMX, 1 µg/ml insulin, 1 µM dexamethasone를 포함하는 분화유도 배지로 교환하여 2일간 배양하면서 분화를 유도하였다(Day 0~2). 이틀 후 1 µg/ml insulin을 함유하는 DMEM으로 갈아주고 2일 더 배양한 후(Day 2~4) 지방 분화 유도 4일째 되는 날 배양액을 DMEM으로 바꾸고 4일을 더 배양하였다(Day 4~8). 시료가 분화 시기 중 어느 시기에 작용하는지 알아보기 위하여 Day 0~2, Day 2~4, Day 4~8, Day 0~4, Day 2~8 기간에만 시료를 투여하고 그 외 시기에는 시료를 처리하지 않고 배양액만 교체하였다. 이 결과를 Day 0~8 기간 모두 시료를 처리한 결과와 비교하여 시료가 지방세포 분화 어느 단계에 작용하는지 판단하였다. Fig. 3에서 보여지듯이 가지의 물추출물은 Day 0~2, Day 0~4 및 Day 0~8 등 지방분화 초기 단계에 투여되는 경우에는 뛰어난 저해활성을 나타내었으나 Day 2~4, Day 4~8 및 Day 2~8 등 후기 단계에만 처리한 경



**Fig. 3** – Effects of eggplant water extract on adipocyte differentiation during differentiation process. Cultures were induced to differentiate and water extract of eggplant was added at different periods of differentiation, namely, during days 0~2, 2~4, 4~8, 0~4, 2~8 and 0~8. On day 8, cells were stained with Oil Red O. Relative fat accumulation (%) was calculated as  $100 \times [(absorbance\ of\ sample - absorbance\ of\ undifferentiated\ control) / (absorbance\ of\ differentiated\ control - absorbance\ of\ undifferentiated\ control)]$ . Values are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  compared with differentiated control.

우에는 미약한 저해활성을 나타내었다. 따라서 가지의 물추출물은 지방분화 초기단계에 작용하여 저해활성을 나타내는 것으로 생각된다.

이와 같이 본 연구에서는 가지 물추출물의 항비만 효능을 확인하였다. 가지 이외에도 식용으로 많이 이용되는 울무 및 다양한 차 등의 항비만 활성이 보고 되어 개발 가능성을 제시하고 있다.<sup>19,20)</sup> 따라서 식용 과채류들의 비만 예방 효능이 기대되며 가지의 항비만 효능 최적화를 위하여 품종에 따른 성분 및 효능 비교 등 품질관리를 위한 연구가 필요하리라 생각된다.

## 결 론

이상의 결과로 가지의 물추출물은 3T3-L1 세포에서 지방의 축적을 유의성있게 저해시켰으며 이러한 효과는 지방분화 유도 전에 처리하였을 때 더 효과적이었다. 따라서 가지는 비만의 예방에 효과적인 것으로 기대된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청 연구지원사업(PJ006985: 대사성질환 예방물질 고함유 농산물자원발굴 및 대량생산기술 개발) 및 2009 학년도 충북대학교 학술연구지원사업에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) Grundy, S. M. : Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 563s (1998).
- 2) Bastard, J. P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M. J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J. and Feve, B. : Recent advances in the relationship between obesity, inflammation and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* **17**, 4 (2006).
- 3) Kopelman, P. G. : Obesity as a medical problem. *Nature* **404**, 635 (2000).
- 4) Rayalam, S., Della-Fera, M. A. and Baile, C. A. : Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J. Nutr. Biochem.* **19**, 717 (2008).
- 5) Spiegelman, B. M. and Enerback, S. : The adipocyte: a multifunctional cell. *Cell Metab.* **4**, 425 (2006).
- 6) Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. : Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**, 847 (2006).
- 7) Akanitapichat, P., Phraibung, K., Nuchklang, K. and Prompitakkul, S. : Antioxidant and hepatoprotective activities of five eggplant varieties. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 3017 (2010).
- 8) 배기환 : 한국의 약용식물, 교학사, 서울, p 456.
- 9) Ben-Erik van Wyk : Food plants of the world, Briza publications, Pretoria, p 347.
- 10) Mennella, G., Rotino, G. L., Fibiani, M., D'Alessandro, A., Francese, G., Toppino, L., Cavallanti, F., Acciarri, N. and Lo Scalzo, R. : Characterization of health-related compounds in eggplant (*Solanum melongena* L.) lines derived from introgression of allied species. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7597 (2010).
- 11) Azuma, K., Ohyama, A., Ippoushi, K., Ichianagi, T., Takeuchi, A., Saito, T. and Fukouka, H. : Structure and antioxidant activity of anthocyanins in many accessions of eggplant and its related species. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10154 (2008).
- 12) Kwon, Y. I., Apostolides, E. and Shetty, K. : *In vitro* studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresour. Technol.* **99**, 2981 (2008)
- 13) Shin, E., Choi, K. H., Yoo, H. S., Lee, C. K., Hwang, B. Y. and Lee, M. K. : Inhibitory effects of coumarins from the stem barks of *Franxinus rhynchophylla* on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 1610 (2010).
- 14) Lee, M. K., Shin, E., Liu, Q., Hwang, B. Y., Lee, J., Kim, S. Y. and Lee, J. H. : Inhibitory activity of three varieties of adlay (coix seed) on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Nat. Prod. Sci.* **16**, 291 (2010).
- 15) Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. : Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783 (1998).
- 16) Lefterova, M. I. and Lazar, M. A. : New developments in

- adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 107 (2009).
- 17) Farmer, S. R. : Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* **4**, 263 (2006).
- 18) White, U. A. and Stephens, J. M. : Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* **318**, 10 (2010).
- 19) Kim, S. O., Yun, S. J., Jung, B., Lee, E. H., Hahm, D. H., Shim, I. and Lee, H. J. : Hypolipidemic effects of crude extract of adlay seed (*Coix lachrymal-jabi* L.var. *ma-yuen* Stapf) in obesity rat fed high fat diet: Relationship of TNF- $\alpha$  and leptin mRNA expressions and serum lipid levels. *Life Sci.* **75**, 1391 (2004).
- 20) Wolfram, S., Wang, Y. and Thielecke, F. : Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 176 (2006).