

# 상엽(桑葉) 추출물의 Adipogenesis 억제를 통한 항비만 활성 평가

권오준<sup>\*#</sup>

대경지역사업평가원 경북지역산업평가단

## Anti-adipogenic Effect of *Mori Follium* Extract in 3T3-L1 Cells

O Jun Kwon<sup>\*#</sup>

Gyeongbuk Institute For Regional Program Evaluation, Gyeongsan 38542, Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : *Mori Follium* (*Morus alba* L, leaf) has been cultivated in many Asian countries. Especially, mulberry leaf has been used as an anti-diabetic remedy in oriental medicine. However, anti-obesity effect of mulberry has not been unknown. In this study, our objectives of study is to investigate the anti-adipogenic effect of mulberry water extract (MLE) and to reveal potential molecular anti-obesity mechanism in 3T3-L1 adipocytes differentiation model. **Methods** : The cytotoxicity of MLE in 3T3-L1 was examined by MTT assay. Anti-adipogenic effect of MLE was evaluated by Oil Red O (ORO) staining. To elucidate the molecular mechanism, inhibitor assay was employed. The mRNA expression levels of adipogenic transcriptional factors such as PPAR $\gamma$  and fatty acid synthase (FAS) were analyzed by reverse transcription-polymer chain reaction (RT-PCR) analysis.

**Results** : The MLE treatment for 24 h did not affect to the 3T3-L1 cells at concentrations of 1, 10, 100, 200, 400, 800 and 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Thus, non-toxic concentration ranges of MLE were used during adipogenesis period (day -2 to 7). Intracellular lipid accumulation in MLE-treated 3T3-L1 adipocytes (day 6) were quantitatively evaluated by ORO staining. The MLE treatment significantly and dose-dependently suppressed 3T3-L1 adipogenesis by 60.42%, 38.24%, and 5.97% at 10, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. In addition, our inhibitor assay and RT-PCR analysis revealed that the MLE-inhibited 3T3-L1 adipogenesis through inhibition of PPAR $\gamma$  mediated by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Conclusions** : In conclusion, these findings indicate that the MLE could be used in prevent and/or treatment of obesity-related diseases.

**Key words** : mulberry, obesity, adipogenesis, 3T3-L1, Wnt

## I. 서 론

인체의 지방세포는 에너지 항상성 유지 및 지질대사와 관련하여 중요한 역할을 수행한다. 하지만 사회적·경제적 발달로 인한 식습관의 변화는 에너지 섭취와 소비의 불균형을 초래하여 지방세포의 크기 및 숫자의 과도한 증가를 초래함으로써 체내 지방의 과잉 축적을 통해 대사성질환인 비만을 발생시킨다<sup>1)</sup>. 비만은 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 관절염, 심장병, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 등 각종 대사성 질환, 심혈관계 질환 및 암 발생의 직간접적인 발병 원인으로 작용하는 것으로 밝

혀졌으며, 외형적인 변화에 기인한 비만은 육체적·정신적 문제 또한 발생시킴으로서 개인의 삶의 질에도 부정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다<sup>2)</sup>.

전지방세포가 지방세포로 분화되는 과정인 adipogenesis는 비만의 예방 및 치료에 있어 중요하며 다양한 요인에 의해 영향을 받는다<sup>3)</sup>. Wnt/ $\beta$ -catenin 신호는 세포질에 존재하는  $\beta$ -catenin 단백질을 안정화 시켜 목표 유전자의 전사를 유도하는 신호전달경로이다. Wnt 신호가 없는 경우  $\beta$ -catenin은 Axin/APC/GSK3/CK1으로 이루어진  $\beta$ -catenin destruction complex에 의해 인산화된다. 인산화된  $\beta$ -catenin은 E3

\*#Corresponding and First author : O Jun Kwon, Gyeongbuk Institute For Regional Program Evaluation

· Tel : +82-53-818-9504 · E-mail : gbria@hanmail.net

· Received : 11 August 2016 · Revised : 20 August 2016 · Accepted : 20 September 2016

ubiquitin ligase인  $\beta$ -TrCP에 의해 ubiquitination 된 후 proteasome에 의해 분해된다. 그러나 Wnt ligand가 막수용체인 Frizzled와 LRP5/6에 결합하면  $\beta$ -catenin은 더 이상 분해되지 않고 세포 내에 축적되고, 안정화된  $\beta$ -catenin은 핵 내부로 들어가서 목표 유전자의 전사를 유도한다. 또한 최근 연구에서 Wnt/ $\beta$ -catenin의 조절을 통해 비만을 예방 및 치료할 수 있다는 가능성이 제시된 바 있다<sup>4)</sup>.

뽕나무는 뽕나무과 (Moraceae), 뽕나무속 (Morus)에 속하는 식물로 열대지방부터 온대지역에 널리 분포하고 있다<sup>5)</sup>. 뽕나무의 어린 가지나 뿌리, 열매, 잎 등은 민간에서 전통적인 약용재료로 사용되어 왔으며 다양한 생리활성이 보고되었다<sup>6)</sup>. 상업 물 추출물 처리는 인슐린이 처리된 지방세포에서 glucose의 소비를 농도 의존적으로 증가시킴으로서 항당뇨 소재로서의 가능성을 나타냈다<sup>7)</sup>. 또한 상업 에탄올 추출물에서 분리해낸 (2S)-4'-hydroxy-7-methoxy-8-prenylflavan, 2',7'-Dihydroxy-4'-methoxy-8-prenylflavan, brosimine B, 2',4'-dihydroxy-7'-methoxy-8-prenylflavan 등을 비롯한 flavane 유도체들은 3T3-L1 전지방세포의 분화와 증식을 억제하여 항비만 활성을 나타내는 것으로 보고되었다<sup>8)</sup>. 이밖에도 상업 메탄올 추출물은 다량의 quercetin과 kaempferol을 함유하고 있으며 lymphocytes에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 DNA 손상을 감소시키고 human aortic endothelial 세포에서 세포부착과 염증반응을 억제시키는 것으로 보고되었다<sup>9)</sup>. 이러한 상업의 다양한 생리활성은 무기성분, 아미노산, 그리고 rutin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin과 alkaloid 성분을 비롯한 flavonoid에 기인된 것이라 보고되었으며, 상업의 1-deoxynojirimycin (1-DNJ)는  $\alpha$ -glucosidase 저해를 통해 혈당상승을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>10)</sup>. 현재까지 유기용매를 이용한 상업 추출물 및 함유된 성분들의 다양한 생리활성 및 항당뇨 활성에 대한 연구는 비교적 다수 보고되었지만 상업 물 추출물의 항비만 효능 및 그 기전에 관한 연구는 아직까지도 미비한 실정이다.

본 연구에서는 상업 추출물의 세포독성을 MTT 분석법에 의해 확인한 후 3T3-L1 전지방세포에서 지방세포의 분화기간 동안 상업 추출물에 의한 세포내 지방축적 억제활성을 평가하였으며, 항비만 활성의 분자생물학적 기전을 탐색하고자 하였다. 또한 이러한 결과들을 바탕으로 상업 추출물의 항비만 기능성 식품소재로 의 활용방안에 대해 고찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

본 실험에 사용된 상업은 대한민국 부안에서 재배된 것으로 (주)비아이지 (Daejeon, Korea)에서 제공받아 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin, phosphate-buffered saline (PBS), bovine calf serum (BCS)는 Welgene Inc. (Daegu, Korea)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS)은 GE Healthcare Bio-Sciences Co. (Piscataway, NJ, USA)에서 구입하여

사용하였다. Oil Red O (ORO), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone, insulin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 11-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), 그리고 chloroform은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Formaldehyde는 Bio Basic Inc. (Markham, ON, Canada)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO), isopropanol은 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. Trizol<sup>®</sup>은 Life Technologies, Inc.(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. AccuPower<sup>®</sup> Cycle Script RT PreMix와 각각의 primer들은 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 구입하였으며, PCR PreMix (i-Taq)는 iNtRON (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

### 2) 상업 물 추출물 (MLE)의 제조

분쇄된 상업 1.0 kg에 10 l의 증류수를 가하여 잘 섞어준 뒤 autoclave에서 121℃에서 15분간 열수 추출하였다. 상업 물 추출물은 Whatman No.1 여과지로 여과한 뒤 동결건조하여 -20℃에서 보관하며 이후 분석에 사용하였다. 상업 물 추출물(MLE)의 수율은 15.2% (w/w-dry basis)였다.

## 2. 방법

### 1) 3T3-L1 세포배양 및 지방세포분화

3T3-L1 전지방세포는 American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD USA)에서 분양받아 사용하였다. 3T3-L1 전지방세포는 10%(v/v) BCS과 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 2일 주기로 배지를 교체해주면서 배양되었다. 3T3-L1 전지방세포에서 지방세포로의 분화와 상업 추출물의 처리과정은 Figure 1과 같다. 3T3-L1 전지방세포가 confluent된 상태 (day -2)가 된 2일 후 (day 0) 분화 유도 배지(Differentiation medium; DM)로 교체하였다. 분화유도 배지는 DMEM 배지에 10%(v/v) FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin을 포함시킨 후 500  $\mu$ M의 IBMX, 5.2  $\mu$ M의 DEX, 167 nM의 insulin을 추가하였으며 day 0에서 day 2까지 48시간 동안 사용하였다. 분화유도 후 배지 (Post-differentiation medium; Post-DM)는 DMEM 배지에 10%(v/v) FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin을 포함시킨 후 167 nM의 insulin만 추가하여 2일에서 4일까지 사용하였다. 이후 DMEM 배지에 10%(v/v) FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin을 포함시킨 후 4일에서 7일까지 사용하였으며 7일째 지방세포분화를 종료하였다.

### 2) 3T3-L1 세포에서 MLE의 세포독성

3T3-L1 전지방세포에 대한 MLE의 세포독성은 MTT assay를 이용하여 분석하였다. 3T3-L1 전지방세포에 1, 10, 100, 200, 400, 800, 그리고 1,000  $\mu$ g/ml의 MLE를 24 시간 동안 처리한 후 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 5 mg/ml의 농도로 용해시킨 MTT 용액을 1시간

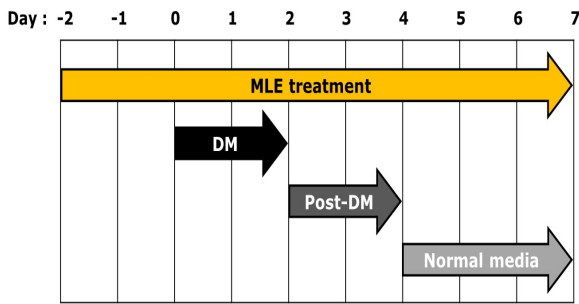


Fig. 1. Schem of 3T3-L1 differentiation and MLE treatment DM: differentiation medium consist of FBS-DMEM, 0.5 mM IBMX, 5.2  $\mu$ M DEX, and 167 nM insulin; Post-DM: post-differentiation medium consist of FBS-DMEM and 167 nM insulin

동안 처리하였다. 처리 후 DMEM 배지를 제거하고 37°C에 미리 데워진 1 ml의 PBS로 3T3-L1 전지방세포를 1회 씻어 주었다. 400  $\mu$ l의 dimethylsulfoxide (DMSO)를 이용하여 3T3-L1 전지방세포내의 MTT formazan을 녹인 후, DMSO에 용해된 MTT formazan을 96-well plate에 200  $\mu$ l/well 씩 옮겨 microplate reader (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. MLE를 처리하지 않은 3T3-L1 세포를 대조군으로 하여 세포생존률 (cell viability, % of control)을 계산하였다.

### 3) ORO 염색법에 의한 항비만 활성평가

MLE의 항비만 활성을 평가하기 위해서, 지방세포로 분화시킨 3T3-L1 세포의 지방축적량을 ORO 염색법을 통해 정성 및 정량분석 하였다. 3T3-L1 전지방세포는 10, 100, 그리고 200  $\mu$ g/ml의 MLE에 -2일에서 7일까지 처리하였다. 지방세포분화는 위에 설명한 방법에 의하여 실시하였다. 분화된 3T3-L1 지방세포 (day 7)는 3%(v/v)의 formaldehyde로 1시간 동안 실온에서 고정시켰다. 고정 된 세포는 3 mg/ml의

ORO를 이용해 1시간 동안 실온에서 염색시켰으며, 염색 후에는 증류수를 이용해 3회 씻어 주었다. ORO 정량분석은 염색된 12-well plate에 200  $\mu$ l의 isopropanol을 가하여 세포내 ORO를 녹인 후 96-well plate 50  $\mu$ l/well 씩 옮겨 microplate reader (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. MLE를 처리하지 않은 분화된 지방세포를 대조군으로 하여 lipid accumulation (% of control)을 계산하였다.

### 4) Wnt/ $\beta$ -catenin Inhibitor assay

MLE의 항비만 기전탐색을 위해 Wnt/ $\beta$ -catenin 특이적 저해제인 10  $\mu$ M IWR-1을 사용하였다. 3T3-L1 전지방세포는 100  $\mu$ g/ml의 MLE 또는 MLE+IWR-1에 day -2에서 day 0까지 처리되었다. 그리고 day 7에 위의 방법과 동일하게 ORO 염색법을 실시하여 IWR-1이 MLE 처리에 의해 억제된 3T3-L1 지방세포분화에 영향을 미치는지에 대한 분석을 실시하였다.

### 5) RT-PCR을 통한 유전자의 발현수준 분석

3T3-L1 세포는 100  $\mu$ g/ml의 MLE 또는 MLE+10  $\mu$ M IWR-1에 day -2에서 day 7까지 처리되었다. 지방세포분화는 위와 동일한 방법에 의하여 실시하였으며 day 7에 200  $\mu$ l의 TRIzol<sup>®</sup>을 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA에 100  $\mu$ l의 chloroform을 넣고 15분 동안 상온에 정치한 뒤 14,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 얻은 상층액에 isopropanol 80  $\mu$ l를 넣고 15분 동안 상온에 한번 더 정치한 다음 14,000rpm에서 15분간 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 정량한 뒤 SuperScriptII kit (Invitrogen)을 이용하여 42°C에서 1시간 동안 cDNA를 합성하였다. 본 실험에 사용된 PPAR $\gamma$ , FAS, 그리고  $\beta$ -actin의 primer sequences는 Table 1과 같다.

Table 1. Primer Sequences for Polymerase Chain Reaction Analysis

Name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
PPAR $\gamma$	CCCAATGGTTGCTGATTACAAAT	CTACTTTGATCGCACTTTGGTATTCT
FAS	GTGCACACAGTGCTCAAAGG	GGTATAGACACGGGCACAG
$\beta$ -Actin	AGGGAAATCGTGCGTGACAT	AGCTCAGTAACAGTCCGCCT

### 6) 통계분석

모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현하였으며, 데이터의 통계처리는 Statistical Package for Social Science (SPSS, Chicago, USA)을 이용하여 분석하였다. 신뢰수준 p<.05에서 평균값들에 대한 유의성을 검증하였다. 각 항목은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 시행하였으며, Student t-test 방법에 의하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다 (\*<0.05, \*\*<0.01, 그리고 \*\*\*<0.001).

## III. 결 과

### 1. 3T3-L1 세포에서 MLE의 세포독성

3T3-L1 세포에서 MLE의 세포독성을 확인하고자 MTT assay를 실시하였다. 1, 10, 100, 200, 400, 800, 그리고 1,000  $\mu$ g/ml의 MLE를 3T3-L1 전지방세포에 24시간 동안 처리한 결과, MLE를 처리하지 않은 대조군 대비 97.81%, 99.55%, 95.86%, 98.86%, 99.76%, 100.69%, 그리고 98.13%의 세포생존률을 나타냈다. 본 실험에 사용된 1, 10, 100, 200, 400, 800, 그리고 1,000  $\mu$ g/ml의 MLE 처리는 3T3-L1 세포의 세포생존률에 유의적으로 영향을 미치지 않았다(Fig. 2). 따라서 이후 실험에서는 200  $\mu$ g/ml 이하의 MLE를 선택적으로 사용하였다.

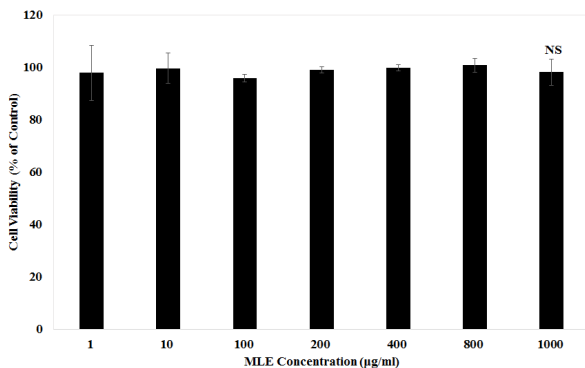


Fig. 2. Cytotoxic effect of MLE treatment for 24 h on the 3T3-L1 viability. Percentage viability of 3T3-L1 cells exposed to 1, 10, 100, 200, 400, 800, and 1,000 µg/ml of MLE. Statistical analysis was performed at  $p < 0.05$  by t-test, NS: Not significant

## 2. MLE의 adipogenesis 억제활성

MLE의 항비만 활성을 평가하기 위하여 3T3-L1 지방세포 분화모델을 이용하였으며, 지방세포분화 유도가 끝난 후 ORO 염색법을 실시하였다. 본 실험에서 MLE는 3T3-L1 세포에 day -2에서 day 7까지 처리되었으며, day 7에 ORO 염색법을 실시한 결과 MLE를 처리하지 않고 분화유도만 시킨 대조군은 다량의 지방이 축적된 것을 알 수 있었다. 반면 MLE 처리는 농도 의존적으로 3T3-L1 세포의 지방분화를 억제하였다 (Fig. 3A). 세포내 ORO 염색시약을 isopropanol로 용해하여 정량분석 한 결과, 대조군과 비교하여 10, 100, 그리고 200 µg/ml의 MLE 처리는 각각 60.42%, 38.24%, 그리고 5.97%로 지방세포분화를 농도 의존적이며 유의적으로 억제하였다 (Fig. 3B).

## 3. Inhibitor assay를 통한 MLE의 항비만 기전분석

MLE에 의해 억제된 adipogenesis의 기전을 분석하기 위하여 inhibitor assay를 실시하였다. 3T3-L1 세포는 100과 200 µg/ml의 MLE와 10 µM의 IWR-1에 day -2에서 day 7까지 처리되었으며, day 7에 ORO 염색법을 실시하였다. Figure 3의 결과와 유사하게 100과 200 µg/ml의 MLE를 처리하였을 때 3T3-L1 세포의 adipogenesis는 대조군 대비 각각 41.56% 그리고 8.65%로 나타났으며, Wnt/ $\beta$ -catenin 저해제인 IWR-1을 10 µM의 농도로 처리하였을 때 대조군 대비 79.54% 그리고 45.21%로 MLE에 의해 억제되었던 adipogenesis가 IWR-1 처리에 의해 항비만 활성이 감소하였다. 따라서, 본 결과는 MLE에 의한 adipogenesis 억제는 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달체계를 통해 이뤄진다는 것을 알 수 있다.

## 4. RT-PCR을 통한 mRNA 발현수준 분석

위의 결과로부터 MLE에 의해 억제되었던 3T3-L1 adipogenesis는 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달을 통해 이뤄지고 있음을 알았다. 따라서 MLE에 의해 3T3-L1 adipogenesis에 특이적으로 발현되는 전사인자의 mRNA 수준을 분석하고

Wnt/ $\beta$ -catenin 저해제인 IWR-1이 어떠한 영향을 미치는지 알아보하고자 하였다. 지방세포분화 day -2에서 day 7까지 MLE를 처리하였을 때 peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ) 및 fatty acid synthase (FAS)의 mRNA 발현이 현저하게 감소한 것을 관찰하였다. MLE에 현저하게 감소되었던 PPAR $\gamma$ 의 mRNA 발현수준은 IWR-1 처리에 의해 다시 증가되었다. 그러나 adipogenesis 후기에 발현되는 것으로 잘 알려진 FAS의 발현은 MLE 처리에 의해 감소하였지만 IWR-1 처리에 의해 유의적으로 증가하지는 않았으며, 이 부분에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

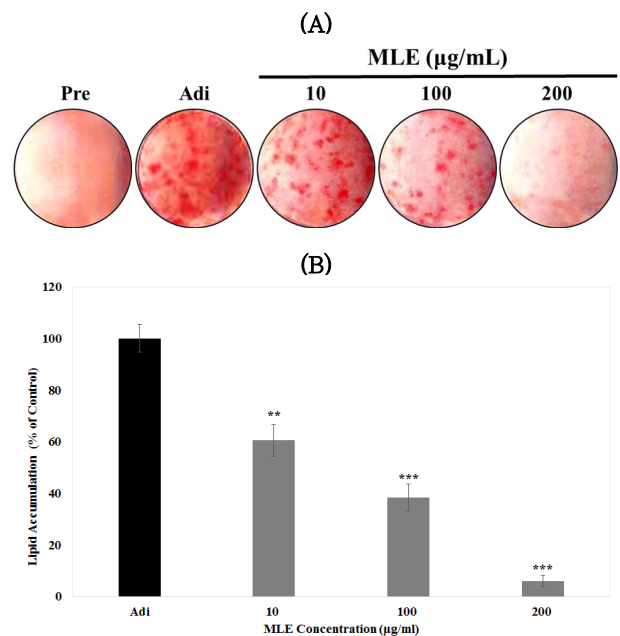


Fig. 3. Anti-adipogenic effect of MLE.

(A) After 7 days of 3T3-L1 differentiation in the presence of MLE at concentrations of 10, 100, and 200 µg/ml, adipocytes were stained with ORO.

(B) 3T3-L1 cells were then subjected to quantitative analysis of ORO stained intracellular lipid droplets. Significant differences were analyzed by one-way ANOVA followed by t-test (\*\* $< 0.01$ , and \*\*\* $< 0.001$ ). Pre: preadipocytes; Adi: Mature adipocytes at day 7.

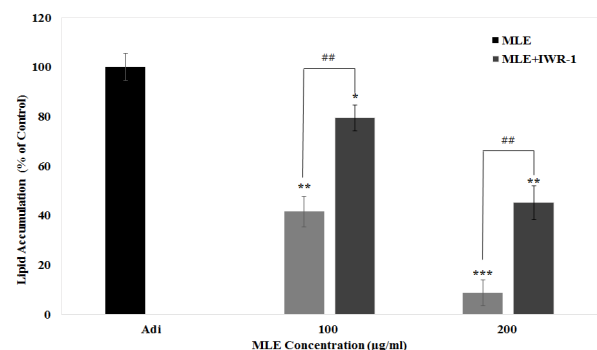


Fig. 4. Wnt/ $\beta$ -catenin inhibitor treatment reversed MLE-inhibited 3T3-L1 adipogenesis. 3T3-L1 cells were exposed to 100, and 200 µg/ml of MLE in the presence or absence of Wnt/ $\beta$ -catenin specific inhibitor, IWR-1. The mature adipocytes were stained with ORO at day 7. Significant differences were analyzed by one-way ANOVA followed by t-test (\* $< 0.05$ , \*\* $< 0.01$ , and \*\*\* $< 0.001$  vs Adi, ## $< 0.01$  vs IWR-1 treatment), Adi: Mature adipocytes at day 7.

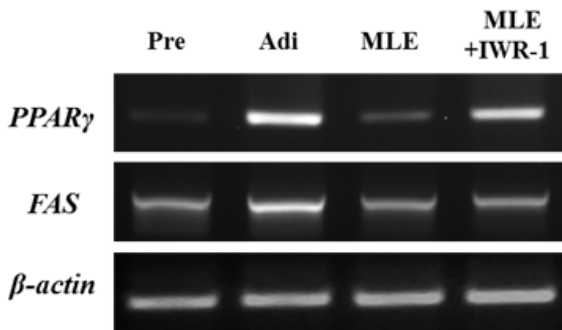


Fig. 5. The effect of IWR-1 treatment on the MLE-inhibited mRNA expression levels of PPAR $\gamma$ , and FAS. 100  $\mu$ g/ml of MLE and 10  $\mu$ M of IWR-1 were used.  $\beta$ -Actin was used as a control.

#### IV. 고찰

Adipogenesis를 억제하여 비만을 예방하는 것은 소아 뿐만 아니라 성인비만의 예방과 관리에 있어 중요한 타겟이다. 최근 연구들이 비만 및 과체중의 예방 및 치료에 있어 adipogenesis 및 lipogenesis 억제제를 통한 연구를 다각도로 시도하고 있으며<sup>11)</sup>, 상대적으로 안전한 천연물 소재를 바탕으로 항비만 소재들을 탐색하고 있다<sup>12)</sup>. 특히 기존에 항산화 활성 및 항암활성이 잘 알려진 quercetin, genistein, resveratrol, epigallocatechin gallate (EGCG) 등의 polyphenol을 중심으로 한 adipogenesis 억제연구가 활발하게 이루어지고 있다. 기존의 연구에 따르면 상엽은 항당뇨 활성이 잘 알려진 1-deoxynojirimycin (1-DNJ) 이외에도 polyphenol인 quercetin-3- $\beta$ -D-glucose, quercetin-3-O-glucose-6-acetate, quercetin, 그리고 rutin이 다량 존재하는 것으로 보고되었으며<sup>13)</sup>, 이 성분들이 상엽의 항비만 활성에 기여할 수 있다는 가설로 본 연구에서는 상엽의 항비만 활성을 평가하고 그 분자생물학적 기전을 탐색하고자 하였다.

본 연구에서는 상엽 물 추출물 MLE를 3T3-L1에 24시간 동안 1-1,000  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 결과 유의한 세포독성은 관찰되지 않았다. 따라서 세포독성이 나타나지 않은 MLE를 200  $\mu$ g/ml의 농도까지 본 실험에 이용하였다. 3T3-L1 세포에 MLE를 농도별로 처리한 결과, MLE는 농도 의존적이며 유익하게 3T3-L1의 adipogenesis를 억제하였다. 또한 본 연구에서 Wnt/ $\beta$ -catenin 특이적 저해제인 IWR-1 처리는 MLE에 의해 저해된 3T3-L1 adipogenesis가 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달을 통해 이뤄지고 있음을 밝혀냈다. Wnt 단백질은 세포의 성장 및 분화에 밀접하게 관련하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>14)</sup>. 최근의 연구에 따르면 활성화된 Wnt/ $\beta$ -catenin은 CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) 및 PPAR $\gamma$ 의 하향조절을 통해 adipogenesis를 억제하는 것으로 보고되었다<sup>15)</sup>. 또 다른 보고에 의하면 Wnt 신호전달체계는 glucose로 유도된 췌장의 insulin 분비를 촉진시킨다고 알려져 있다<sup>14)</sup>. 이는 MLE 처리가 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달을 활성화 시켜 PPAR $\gamma$ 의 발현수준을 감소시킨 본 연구결과와 일치하며, Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달체계가 지방세포의 분화에 중요하게 작용하고 있음을 시사한다.

본 연구에서 MLE를 처리하였을 때 PPAR $\gamma$  및 FAS의 유전자 발현 수준이 현저하게 감소하는 것을 관찰하였다. 선행연구에 의하면 adipogenesis에서 초기 과정은 C/EBP $\beta$ 와

C/EBP $\alpha$ 의 발현이 증가되며 이들에 의해 이후에 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 발현 또한 증가됨으로서 진행되는 것으로 보고되었다<sup>16)</sup>. 또한 다양한 polyphenol 성분들이 adipogenesis를 억제할 수 있다는 가능성이 보고되었는데, 국화에 존재하는 luteolin, apigenin, 그리고 cumambrin 등의 생리활성 물질이 PPAR $\gamma$ 의 조절을 통해 adipogenesis를 억제하는 것으로 보고 되었으며<sup>17)</sup>, 영경귀와 그의 주요 생리활성 성분인 apigenin은 3T3-L1 세포의 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 하향조절을 통해 항비만 활성을 나타내는 것으로 보고되었다<sup>18)</sup>. 이상의 결과를 볼 때 MLE에 존재하는 quercetin-3- $\beta$ -D-glucose, quercetin-3-O-glucose-6-acetate, quercetin, 그리고 rutin 등의 polyphenol 성분들이 MLE의 항비만 활성에 기여하였을 것으로 추측된다. 향후 MLE에 존재하는 생리활성 성분들을 체계적으로 분석하여 이들 중 어떠한 성분이 MLE의 항비만 활성에 기여하였는지 밝히는 연구가 추가적으로 요구된다. 또한 향후 MLE 처리를 통해 지방세포에 특이적으로 발현되는 C/EBP $\alpha$ , adipocyte Protein 2 (aP2, fatty acid binding protein), 그리고 LPL의 발현 및 활성에 미치는 영향에 대한 분석이 요구된다.

본 연구에서 Wnt/ $\beta$ -catenin 특이적 저해제인 IWR-1은 MLE에 의해 감소되었던 PPAR $\gamma$ 의 발현수준은 증가시켰지만, FAS의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 이전 연구에서 PPAR $\gamma$ 는 비교적 adipogenesis 중기이전에 발현되지만, FAS는 adipogenesis 후기에 발현되는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>. 이는 MLE가 3T3-L1 세포의 초기 및 중기에 특이적으로 작용하며, 후기에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다. 특히, Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달 과정 역시 adipogenesis 초기에 활성화 되는 것으로 알려져 있어 본 결과를 뒷받침 한다. Adipogenesis 초기에 작용을 하는 항비만 소재들은 비만의 예방 측면에서 활용이 가능할 것으로 여겨지며, 후기에 작용하는 항비만 소재들은 비만의 치료적 측면에서 접근이 가능할 것으로 생각된다. 추후 연구에서는 MLE를 adipogenesis 분화시기별로 처리하여 MLE가 adipogenesis의 초기, 중기, 후기 중 특이적으로 어느 시기에 작용하는지 탐색하는 과정이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 예로부터 당뇨 치료제로 널리 이용된 상엽의 물 추출물(MLE)을 제조하고 이의 항비만 활성을 3T3-L1 지방세포 분화 모델에서 평가하였다. 또한 더 나아가 inhibitor assay와 RT-PCR 분석을 통해 MLE의 항비만 활성이 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달체계와 밀접하게 관련되어 있음을 제시하였다. 동물실험 및 임상실험을 통해 MLE의 항비만 활성 및 그 기전에 추가적으로 확인되어야 하며, MLE가 adipogenesis 기간 중 어느 시기에 특이적으로 작용하는지에 대한 분석이 추가적으로 요구된다. 본 연구는 기존에 당뇨 환자를 위한 처방에 이용되어온 상엽의 항비만 소재로서의 가능성에 대해 탐색하였으며, 추후 체계적인 과학적 근거가 뒷받침 된다면 MLE는 향후 비만 환자를 대상으로 한 처방 및 기능성 식품의 소재로 충분히 활용될 수 있을 것이라 생각한다.

이상의 연구결과는 상엽 추출물이 세포내 지방축적 억제를 통한 항비만 소재로서 활용될 수 있다는 가능성을 보여주었으며 향후 이를 활용한 처방, 의약품, 보조제 및 기능성 식품 개발에 기초자료로서 유용히 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

상엽 물 추출물의 항비만 실험을 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 3T3-L1 세포에서 MLE를 24시간 처리하였을 때 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 유의적인 세포독성이 관찰되지 않았다.
2. 세포독성이 나타나지 않은 농도범위의 MLE를 3T3-L1 세포에 day -2에서 day 7까지 처리하고, MLE 처리는 유의적이며 농도 의존적으로 3T3-L1 지방세포분화를 억제하였다.
3. MLE 처리에 의해 감소되었던 3T3-L1 지방세포분화는 Wnt/ $\beta$ -catenin 특이적 저해제인 IWR-1 처리에 의해 증가되었으며, 이는 MLE의 항비만 활성이 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달을 통해 이뤄짐을 추측할 수 있다.
4. 지방분화를 개시하고 유도하는 대표적 전사인자인 PPAR $\gamma$  및 FAS의 발현이 MLE에 의해 현저하게 감소한 반면, MLE와 IWR-1 병행처리는 감소되었던 PPAR $\gamma$ 의 발현을 증가시켰다. 이는 MLE의 항비만 활성이 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달체계를 통한 PPAR $\gamma$ 의 조절을 통해 이뤄짐을 알 수 있다.

본 연구는 MLE 물 추출물이 비만의 예방 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 제시하며, MLE의 항비만 활성에 대한 분자생물학적 기전을 일부 밝혀냈다. 추후 동물실험 및 임상실험이 뒷받침 된다면 MLE는 과체중 및 비만환자에게 효과적인 처방 소재로 활용될 수 있을 것이라 생각한다.

## 참고문헌

1. Lee HS, Hwang SY. Effect of MYC extracts on cholesterol-lowering and anti-obesity effects in Zucker rats fed a high-fat diet. *Kor J Aesthet Cosmetol*. 2010 ; 8 : 71-80.
2. Park JB, Lee HS, Hwang SY, Hong SB, Kim HD, Yun CY. Effect of combined plant extracts on anti-obesity in rats fed a high-fat diet. *Kor J Aesthet Cosmetol*. 2011 ; 9 : 25-34.
3. Shon MS, Kim RH, Kwon OJ, Roh SS, Kim GN. Beneficial roel and function of fisetin in skin health via regulation of the CCN2/TGF- $\beta$  signaling pathway. *Food Sci Biotechnol*. 2016 ; 25 : 133-41.
4. Shon MS, Kim SK, Song JH, Kamegai M, Cha BY, Ishida Y, Lee SC, Kim GN. Anti-oxidant and anti-adipogenic effects of acorn (*Quercus acutissima* CARR.) shell extracts via regulation of Wnt signaling in 3T3-L1 cells. *Food Sci Biotechnol*. 2016 ; 25 : 875-82.
5. Ju MJ, Kwon JH, Kim HK. Physiological activities of mulberry leaf and fruit extracts with different extraction conditions. *Korean J Food Preserv*. 2009 ; 16 : 442-8.
6. Jeon YS, Kim MW. The antioxidative effects and isolation and characterization of the extracts from *Morus alba* L. *Korean J Food Nutr*. 2011 ; 24 : 94-100.
7. Attila H, Katalin V, Balazs Danko, Zoltan K, Edit W, Anasztasia H, Istvan Z, Tusty-Jiuan H. In vitro anti-diabetic activity and chemical characterization of an apolar fraction of *Morus alba* leaf water extract. *Phytother Res*. 2013 ; 27 : 847-51.
8. Yangyu Y, Yang X, Xu B, Zeng G, Tan J, He X, Hu C, Zhou Y. Chemical constituents of *Morus alba* L. and their inhibitory effect on 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation. *Fitoterapia*. 2014 ; 98 : 222-7.
9. Chao PY, Lin KH, Chiu CC, Yang YY, Huang MY, Yang CM. Inhibitive effects of mulberry leaf-related extracts on cell adhesion and inflammatory response in human aortic endothelial cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013 ; 28 : 1-14.
10. Kim EJ, Kim GY, Ki YM, Choi KH, Jang SJ. Anti-obesity effect of Mulberry leaves extraction in obese rats high-fat diet. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2009 ; 23 : 831-6.
11. Choi JH, Park YH, Lee IS, Lee SP, Yu MH. Antioxidant activity and inhibitory effect of *Aster scaber* Thunb. extract on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Korean J Food Sci Technol*. 2013 ; 45 : 356-63.
12. Lee MH, Nam DE, Kim OK, Heo SH, Lee JM. Lipolytic effect of supercritical extraction from pine cone (*Pinus koraiensis*) in mature 3T3-L1 adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2014 ; 43 : 1342-8.
13. Kim GN, Jang HD. Flavonol content in the water extract of the mulberry (*Morus alba* L.) leaf and their antioxidant capacities. *J Food Sci*. 2011 ; 76(6) : C869-73.
14. Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: A personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO J*. 2012 ; 31 : 2670-84.
15. Choi OM, Cho YH, Choi S, Lee SH, Seo SH, Kim HY, Han G, Min DS, Park T, Choi KY. The small molecule indirubin-3'oxime activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and inhibits adipocyte differentiation and obesity. *Int J Obesity*. 2014 ; 38 : 1044-52.
16. Fujino T, Asaba H, Kang MJ, Kang Y, Ikeda Y, Sone H, Takada S, Kim DH, Ioka RX, Ono M,

- Tomoyori H, Okubo M, Murase T, Kamataki A, Yamamoto J, Magoori K, Takahashi S, Miyamoto Y, Oishi H, Nose M, Okazaki M, Usui S, Imaizumi K, Yanagisawa M, Sakai J, Yamamoto TT. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 ; 100 : 229-34
17. Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*. 2000 ; 130(12) : 3122S-26S.
18. Ryu SY, Choi SU, Lee SH, Ahn JW, Zee OP. Antitumor activity of some phenolic components in plants. *Arch Pharm Res*. 1994 ; 17 : 42-4
19. Park HS, Kim SH, Kim YS, Ryu SY, Hwang JT, Yang HJ, Kim GH, Kwon DY, Kim MS. Luteolin inhibits adipogenic differentiation by regulating PPAR $\gamma$  activation. *Biofactors*. 2009 ; 35(4) : 373-9