

3T3-L1 지방전구세포에서 염생식물 *Atriplex gmelinii*의 조추출물과 용매 분획물의 지방세포분화 억제

이정임 · 오정환¹ · 공창숙² · 서영완³

국립수산물품질관리원 인천지원, ¹신라대학교 해양식의약소재융합기술연구소, ²신라대학교 식품영양학과, ³한국해양대학교 해양과학융합학부

Crude Extract and Solvent-Partitioned Fractions of the Halophyte *Atriplex gmelinii* Inhibit Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes

Jung Im Lee, Jung Hwan Oh¹, Chang-Suk Kong², Youngwan Seo³

Incheon Regional Office, National Fishery Products Quality Management Service, ¹Marine Biotechnology Center for Pharmaceuticals and Foods, Silla University, ²Department of Food and Nutrition, Silla University, ³Division of Convergence on Marine Science, Korea Maritime and Ocean University

Received: October 19, 2023

Revised: November 22, 2023

Accepted: November 29, 2023

Correspondence to: Youngwan Seo
Division of Convergence on Marine
Science, Korea Maritime and Ocean
University, 727 Taejong-ro,
Yeongdo-Gu, Busan 49112, Korea
Tel: +82-51-410-4328
Fax: +82-51-404-4750
E-mail: ywseo@kmou.ac.kr

Copyright © 2023 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: *Atriplex gmelinii* C. A. Meyer is a halophyte belonging to the Chenopodiaceae family, and its young leaves and stems are used as fodder for livestock. The aim of the present study was to investigate the effects of *A. gmelinii* extract and its solvent fractions on lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes.

Methods: The samples of *A. gmelinii* were separately extracted using methylene chloride and methanol. Subsequently, they were combined to formulate the initial extract, which was then partitioned based on polarity to prepare solvent fractions. Oil Red O staining was employed to measure lipid accumulation during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. To verify cytotoxicity in 3T3-L1 cells, MTT assays were conducted. The expression levels of transcription factors in 3T3-L1 preadipocytes were measured through Western blotting analysis.

Results: At 50 μ g/mL, treatment of *A. gmelinii* extract and its solvent fractions during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes significantly diminished lipid accumulation with no noteworthy cytotoxicity on cell viability. Additionally, when investigating the biochemical pathways that underlie the prevention of lipid accumulation using solvent fractions, it was found that the *n*-BuOH and *n*-hexane fractions significantly decreased the expression of key transcription factors involved in the generation of fat, such as peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), and sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP1c).

Conclusions: These findings indicate that *A. gmelinii* can effectively reduce the accumulation of fat in 3T3-L1 adipocytes, making it a potentially valuable material for mitigating and preventing obesity.

Key Words: Halophyte, *Atriplex gmelinii*, Adipogenesis, 3T3-L1 cells, Lipid accumulation

서론

인간의 노력으로 현대 식량 수급 문제, 의약품 개발에 따른 질병 문제는 일정 수준 극복하였으나 경제발전 에 따른 생활여건 향상으로 현대인들의 정신적 긴장감, 스트레

스의 증가, 신체 활동의 부족과 함께 서구화된 식습관으로 인한 비만의 발병률을 지속적으로 증가시키게 되었다. 세계보건기구(World Health Organization)는 1997년부터 비만이 선진국을 포함한 세계 각국에서 중대한 건강문제가 되는 질환으로 규정하고 있으며¹⁾, 우리나라에서도 큰

사회문제로 떠오르고 있어 비만을 만병의 근원이 되는 질병이라 인식하여 2000년 대한비만학회에서 비만치료지침을 발표한 바 있다²⁾.

비만은 에너지 저장을 위한 조절과정에서 발생하며 주로 지방세포 내의 과도한 지방 축적으로 인슐린 저항성을 유발하여 제2형 당뇨병, 고혈압, 이상지질혈증, 관상동맥 질환 및 대사증후군의 발생 위험을 높이고, 심혈관질환, 암 등의 사망률을 높이는 것으로 보고되고 있다³⁾. 우리나라는 2년 후에 초고령사회로 진입하게 되며 고령층의 비만은 젊은 층의 비만과 다른 특징을 나타내며 나이가 들면서 식사섭취 및 활동량 변화, 여러 개의 동반된 만성질환, 호르몬 변화, 급성 질환 등에 대한 저항성 감소 등에 따른 체성분의 변화를 통해 점진적인 근육 소실을 동반하게 된다^{4,5)}.

지금까지 비만 치료는 식사치료, 운동치료, 행동치료와 같은 비약물 치료가 우선이며, 체중 감량에 실패한 경우 약물치료를 고려하는데 안전성의 문제로 장기간 사용이 가능한 약물은 거의 없다. 최근 glucagon-like peptide 1 (GLP-1) 작용제(agonist)로 이용되는 노보 노디스크사의 삭센다(Saxenda, liraglutide), 위고비(Wegovy, semaglutide), 일라이 릴리사의 마운자로(Mounjaro, tirzepatide)가 인기 있는 비만 치료제로 사용되고 있으며, 화이자의 다누글리프론(danuglipron)이 출시될 예정이다. 하지만, 이러한 비만 치료제들은 요요현상, 위장장애, 체장염, 근육량 감소 등의 부작용이 많아서 사용에 제한이 있다⁶⁻⁸⁾.

한편, 천연 식물추출물은 과학적인 약물효과 입증 부족 및 작용기전의 불확실성이라는 단점은 있으나 비교적 안전하며 독성이 없는 약물이라는 큰 장점으로 장기복용이 가능하여 이들로부터 유효한 비만 억제물질을 발굴하려는 연구개발이 이루어지고 있다⁹⁻¹¹⁾.

염생식물은 해수와 육지가 만나는 독특한 중간 지대인 염생습지에서 서식하는 식물들로 염생습지에는 유기물질과 무기염이 유입되어 혼합되어 있고 염분 농도가 높아 염생식물은 높은 염도로 인해 생체 내에서 생성되는 활성 산소종의 축적에 따른 세포 손상을 방지하고 이온 균형을 유지하기 위한 독특한 대사 과정을 갖고 있다. 또한, 염생식물은 육지 식물과는 구별되는 다양한 이차 대사물질들을 생산하며, 항암, 항노화, 항염증 및 항산화 등 다양한 생리활성물질을 갖고 있음이 알려져 있다¹²⁻¹⁵⁾.

갯능쟁이속(*Atriplex*)은 명아주과(Chenopodiaceae)에 속

하는 식물군으로서 전 세계 약 300종이 있으며, 아프리카, 아시아, 호주 및 북미 등에 널리 분포되어 있고, 사막, 해변 등 주로 염분이 높은 지역에 사는 종들이 많기 때문에 'saltbush'라고도 불린다. 이 속의 식물들은 영양학적으로도 중요성을 가지고 있으며 플라보노이드, 사포닌, 쿠마린, 알칼로이드 등 상당수의 다양한 이차 대사산물들과 항산화, 항박테리아, 항바이러스, 항당뇨병, 항암, 항진균 등의 몇 가지의 일반적인 생리활성이 보고되었다. 그러나 거의 300종에 달하는 *Atriplex*속에 속하는 식물들중에서 천연물 화학적인 연구가 진행된 것은 20종 미만이며 나머지 대부분의 식물 종에 대해서는 연구가 거의 보고되지 않았다¹⁶⁾.

갯능쟁이속에 속하는 가는갯능쟁이(*Atriplex gmelinii* C. A. Meyer)는 바닷가에 자라는 1년생 염생초본으로서 어린 잎과 줄기는 가축의 먹이로 이용하며, 중국 북부, 러시아 사할린, 일본, 북아메리카 등 세계적으로 분포하고, 우리나라에서도 바닷가 조간대 모래땅, 간척지 등에 흔하게 발견된다. 그러나 가는갯능쟁이에 대해서는 아직 우리나라를 제외하고는 생리활성 보고나 효능 관련 연구가 진행된 적이 없으며, 최근 메탄올 추출물의 항주름 및 미백효과가 보고된 바 있다¹⁷⁻¹⁹⁾. 본 연구팀은 염생식물로부터 생리활성물질을 탐색하는 과정 중에 가는갯능쟁이 조추출물(crude extract)의 지방세포분화 억제 효과를 발견하였으며, 디클로로메탄과 메탄올로 각각 추출하여 합한 조추출물과 이 조추출물을 물, *n*-부탄올, 85% 메탄올, *n*-헥산으로 분획한 용매 분획물이 지방세포에서의 분화 유도 및 지방 축적에 미치는 영향을 분석하여 항비만 소재로서의 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

가는갯능쟁이는 2018년 9월 인천의 강화군 동검리 해변에서 채집된 *A. gmelinii*의 시료를 수집하여 그늘에서 말린 후, 잘게 세절하고 각각 디클로로메탄(dichloromethane)과 메탄올(methanol) 용매로 두 번 추출하였다. 두 추출물은 합쳐서 총 157.7 g의 조추출물을 수득하였으며, 합쳐진 조추출물은 디클로로메탄과 물을 사용하여 1차 분획을 하였다. 분리된 유기층은 *n*-헥산(*n*-hexane)과 85% 메탄올로 재분획하여 각각 12.4 g과 9.7 g의 *n*-헥산 및 85% 메탄올 분획을 얻었으며, 수용성 층도 *n*-부탄올(*n*-BuOH)과 물(H₂O)로

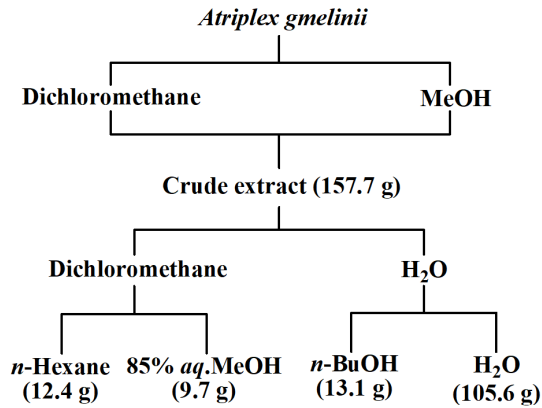


Fig. 1. Preparation of crude extract and its solvent-partitioned fractions from *Atriplex gmelinii*.

재분획하여 각각 13.1 g 및 105.6 g의 분획물을 얻었다 (Fig. 1).

2. 지방세포 배양 및 분화 유도

3T3-L1 지방전구세포는 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 일주일에 2-3회 배지를 교환하였으며 분화를 위해 지방전구세포를 3.3×10³ cell/cm² 밀도로 6-well culture plate에 분주하였다. 2일 후 세포가 가득차면 insulin (5 µg/mL), dexamethasone (0.25 µM), methyl isobutylxanthine (IBMX, 0.5 mM)이 첨가된 배지에 약물을 함께 처리하면서 분화를 유도하였다. 이를 후에 insulin만 포함된 배지로 교체하고 8일간 매일 배지를 교환하면서 분화를 유도하였다²⁰.

3. 세포 생존율 측정

약물이 3T3-L1 세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 먼저 3T3-L1 지방전구세포를 96-well culture plate에 2×10⁵ cell/mL로 100 µL씩 분주하여 37 °C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 배지를 교체하고 약물을 농도(10, 25, 50 µg/mL)별 첨가하여 24시간 동안 배양한 후, 1 mg/mL의 MTT 시약을 처리하였다. 이에 형성된 formazan을 dimethyl sulfoxide에 녹인 후 540 nm에서 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 흡광도를 측정하였으

며, 세포 생존율을 확인하였다²¹. 세포 생존율은 약물로 처리하지 않은 blank의 흡광도를 100%로 하였을 때 상대적인 값(%)으로 나타내었다.

4. Oil Red O 염색

3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화능은 Oil Red O 염색법을 사용하여 확인하였다. 먼저, 분화된 지방세포를 phosphate buffered saline (1× PBS)로 세척한 후 3.7% formaldehyde 용액을 넣고 1시간 동안 실온에서 방치하였다. 고정된 세포를 PBS로 세척하고, Oil Red O 염색액 (0.5% w/v, 60% isopropanol, 40% 증류수)을 처리하여 실온에서 1시간 동안 염색하였다. 염색액을 제거하고 PBS로 3번 세척한 후 세포 내 지방구(lipid droplet) 생성 정도를 광학현미경으로 관찰하였다. 정량적 분석을 위하여 지방구에 염색되어 있는 Oil Red O 시약을 100% isopropanol로 완전히 용해한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다²².

5. 비만 관련 유전자의 단백질 발현량 측정

세포를 RIPA 세포용해 완충액(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)으로 4 °C에서 30분간 용해하여 단백질을 분리하였다. 총 단백질의 농도를 정량(BCA protein assay kit; Thermo scientific, USA)한 후 일정 단백질(25 µg)을 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리하였으며, polyvinylidene fluoride membrane (Amersham Pharmacia Biotech, England, UK)을 이용하여 이동시켰다. Membrane을 5% skim milk에 담가 1시간 동안 비특이 반응을 차단하고, 1× TBST 완충액으로 3번 세척하였다. 1시간 동안 실온에서 1차 항체(1:1,000 희석)와 혼성화한 후 1× TBST 완충액으로 3번 세척하였다. 이를 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체(1:1,000 희석)를 이용해서 실온에서 1시간 동안 배양 반응시키고, chemiluminescence ECL assay kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 단백질 밴드를 Davinch-Chemi imager™ (CAS-400SM, 서울, 한국)를 사용하여 가시화하였다^{23,24}. 내부대조군으로 β-actin을 사용하였으며, 각 밴드는 β-actin 대비 발현 정도를 image program으로 계산하여 시료를 처리하지 않고 지방분화를 유도한 대조군과 비교하여 정량화하였다.

6. 통계분석

각 실험의 데이터는 평균(mean)±표준편차(standard de-

viation, SD)로 나타냈으며 각 시료의 농도별 차이는 Duncan's multiple range test를 포함한 Statistical Analysis System (SAS) v9.2 (SAS Institute Inc., NC, USA) 통계 프로그램 (analysis of variance)을 이용하여 분석되었다. 차이의 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 정의되었다.

결과

1. 가는갯능쟁이 조추출물의 3T3-L1 세포 생존에 미치는 영향

가는갯능쟁이를 각각 디클로로메탄과 메탄올로 추출하고 합쳐서 조제된 조추출물의 지방분화 억제 효과를 평가하기 전 조추출물이 3T3-L1 세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 가는갯능쟁이 조추출물을 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리하였을 때 각각 111.1 ± 14.7 , 105.4 ± 10.0 , $101.6 \pm 12.8\%$ 의 세포 생존율을 보였으며, 따라서 가는갯능쟁이 조추출물의 지방분화 억제 효과는 50 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 이루어졌다(Fig. 2).

2. 가는갯능쟁이 조추출물의 지방세포 분화에 미치는 영향

가는갯능쟁이 조추출물이 3T3-L1 지방세포 분화 및 지방 축적 억제 효과를 확인하기 위하여 Oil Red O 염색을 실시하였다. 그 결과, 시료를 첨가하지 않고 분화유도배지를 이용하여 지방세포로의 분화를 유도한 대조군과 비교 시 가는갯능쟁이 조추출물을 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 지방구 생성이 120.2 ± 8.4 , 99.8 ± 0.9 , $79.9 \pm$

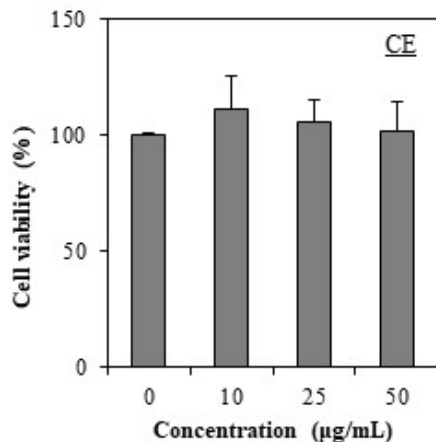


Fig. 2. Cytotoxic effect of crude extract (CE) from *Atriplex gmelinii* on 3T3-L1 cells. The data represent the mean \pm SD of three separate experiments. SD: standard deviation.

1.4%로 나타났으며, 특히, 50 $\mu\text{g/mL}$ 조추출물 농도에서는 대조군에 비해 20.1% 가량의 지방구의 생성을 억제하는 유의적인 차이($P < 0.05$)를 보였다(Fig. 3).

3. 가는갯능쟁이 분획물들의 3T3-L1 세포 생존에 미치는 영향

가는갯능쟁이 조추출물은 극성에 따라 용매 분획을 실시하여 물, *n*-부탄올, 85% 메탄올 및 *n*-헥산층으로 분리하였다. 각 분획물이 3T3-L1 세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각 분획물의 농도를 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 물층에서는 101.4 ± 2.8 , 106.5 ± 4.3 , $107.2 \pm 5.0\%$ 의 세포 생존율을 보였으며, *n*-부탄올층에서는 109.9 ± 2.7 , 120.5 ± 2.7 , $124.0 \pm 5.4\%$, 85% 메탄올층에서는 102.0 ± 7.8 , 101.1 ± 2.6 , $96.8 \pm 2.3\%$, *n*-헥산층에서는 97.7 ± 2.1 , 97.8 ± 2.8 , $97.5 \pm 3.0\%$ 로 측정되었다. 따라서 처리한 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의적인 세포 독성을 나타내지 않았으므로(Fig. 4), 50 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 분획물들의 지방분화 억제 효과를 확인하였다.

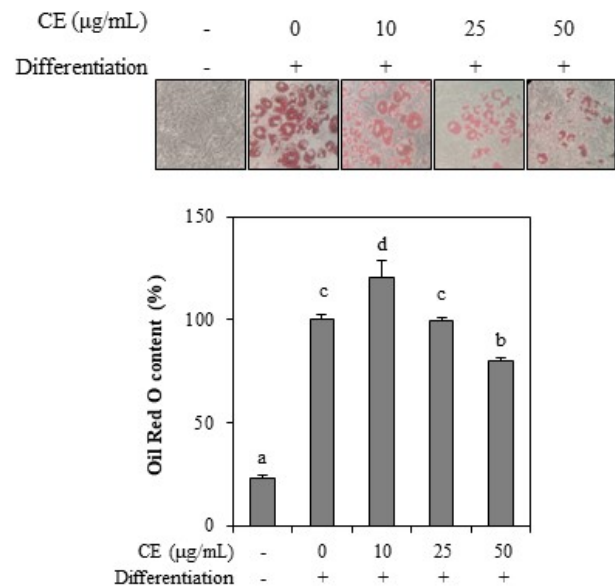


Fig. 3. Effect of solvent fractions from the crude extract of *Atriplex gmelinii* on the lipid accumulation of differentiated 3T3-L1 adipocytes depicted by Oil red O staining (200x magnification). The data represent the mean \pm SD of three separate experiments. CE: crude extract, SD: standard deviation, ANOVA: analysis of variance. Different letters above bars (a, b, c and d) mean those bars are significantly different ($P < 0.05$) among each other according to one way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

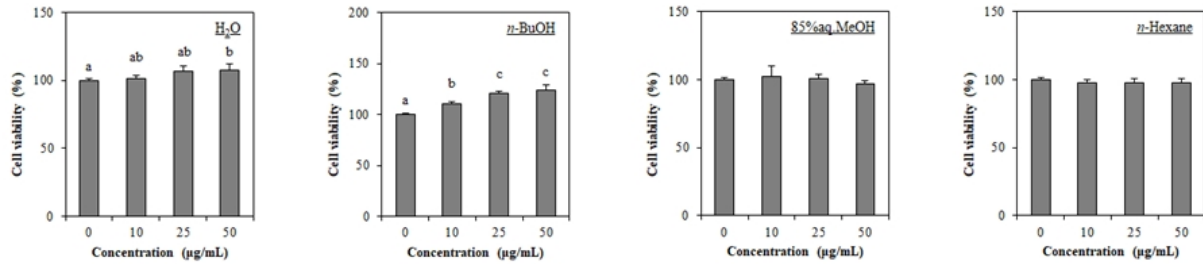


Fig. 4. Cytotoxic effect of solvent fractions from the crude extract from *Atriplex gmelinii* on 3T3-L1. The data represent the mean±SD of three separate experiments. SD: standard deviation, ANOVA: analysis of variance. Different letters above bars (a, b, and c) mean those bars are significantly different (P<0.05) among each other according to one way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

4. 가는갯능쟁이 용매 분획물의 지방세포 분화에 미치는 영향

가는갯능쟁이 조추출물의 용매 분획물에 대한 3T3-L1 지방세포 분화 및 지질 축적 억제 효과를 확인하기 위하여 Oil Red O 염색을 실시하였다. 4종 분획물에 대한 세포 내 지방구 형성 억제 효과를 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었을 때, 분화유도 효과와 함께 각 분획물 10, 25, 50 µg/mL 처리농도에서 물층은 83.1±1.1, 68.5±0.2, 62.4±3.9%, n-부탄올층은 94.8±6.4, 76.1±6.1, 75.0±6.0%, 85% MeOH층은 99.3±10.0, 90.3±5.9, 76.5±4.8%, n-헥산층은 88.3±6.5, 86.9±6.6, 66.1±1.7%로 지방세포 내 지방구 형성을 억제하였다. 따라서 가는갯능쟁이 분획물들은 3T3-L1 지방세포에서의 지방구 형성을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 5).

5. 가는갯능쟁이 분획물의 지방분화 관련 단백질 발현에 미치는 영향

가는갯능쟁이 물, n-부탄올, 85% 메탄올, n-헥산 분획물들을 각각 10, 25, 50 µg/mL로 지방세포에 처리하여 지방전사인자인 PPARγ (peroxisome proliferator-activator gamma), C/EBPα (CCAAT/enhancer binding protein α), SREBP-1c (sterol regulatory elementbinding proteins-1c)의 단백질 발현을 western blot으로 확인하였다. 먼저, 물 분획물을 처리한 결과, 시료를 처리하지 않고 지방분화를 유도한 대조군에 비해 PPARγ, C/EBPα, SREBP-1c의 발현은 감소되지 않았다. n-부탄올 분획물의 처리한 결과, PPARγ (60.3±3.1%<69.4±5.2%<93.4±5.3%), C/EBPα(54.1±0.8%<59.3±0.8%<64.1±1.2%), SREBP-1c (27.7±5.9%<43.6±2.1%<64.8±0.7%)의 단백질 발현을 농도의존적(P<0.05)으로 억제하였다. 85% 메탄올 분획물의 처리는 PPARγ의 발현을 농도의

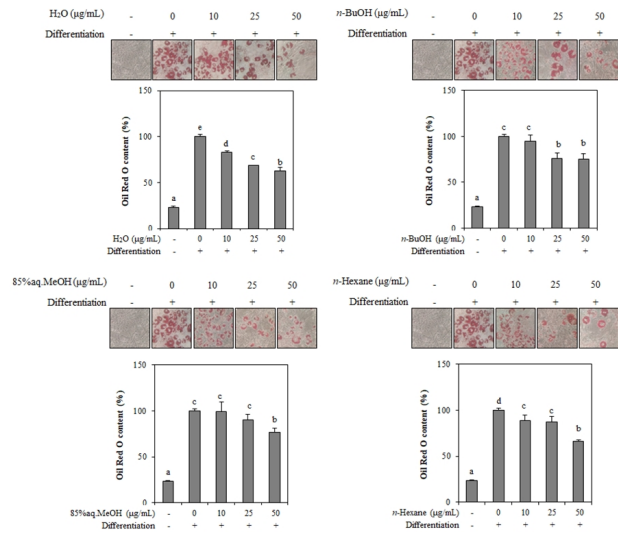


Fig. 5. Effect of solvent fractions from the crude extract of *Atriplex gmelinii* on the lipid accumulation of differentiated 3T3-L1 adipocytes depicted by Oil red O staining and the quantification of the stain bound to lipid droplets (200x magnification). The data represent the mean±SD of three separate experiments. SD: standard deviation, ANOVA: analysis of variance. Different letters above bars (a, b, c, d and e) mean those bars are significantly different (P<0.05) among each other according to one way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

존적(30.7±5.1% <65.8±1.0% <99.5±0.0%)으로 억제하였으며, C/EBPα는 25, 50 µg/mL의 농도에서 각각 37.4±12.0%, 40.3±7.0%으로 대조군과 비교시 유의적 차이(P<0.05)를 보였다. SREBP-1c는 각각의 농도에서 52.5±6.1%, 52.0±3.8%, 65.2±6.4%으로 대조군에 비해 발현이 억제되었다. n-헥산 분획물은 25, 50 ng/mL의 농도에서 대조군에 비해 PPARγ (39.4±15.3%<62.3±4.0%), C/EBPα (22.6±8.9%<66.9±6.8%)의 발현을 유의적(P<0.05)으로 억제하였으며, SREBP-1c는 모든 농도에서 36.2±2.2%, 33.1±10.6%, 40.4±7.6%으로 발현을 억제하였고 대조군과 비교시 유의적(P<0.05) 차이를 보였다. 그 결과, 4종의 분획물들 중 n-부탄올 분획물이 지

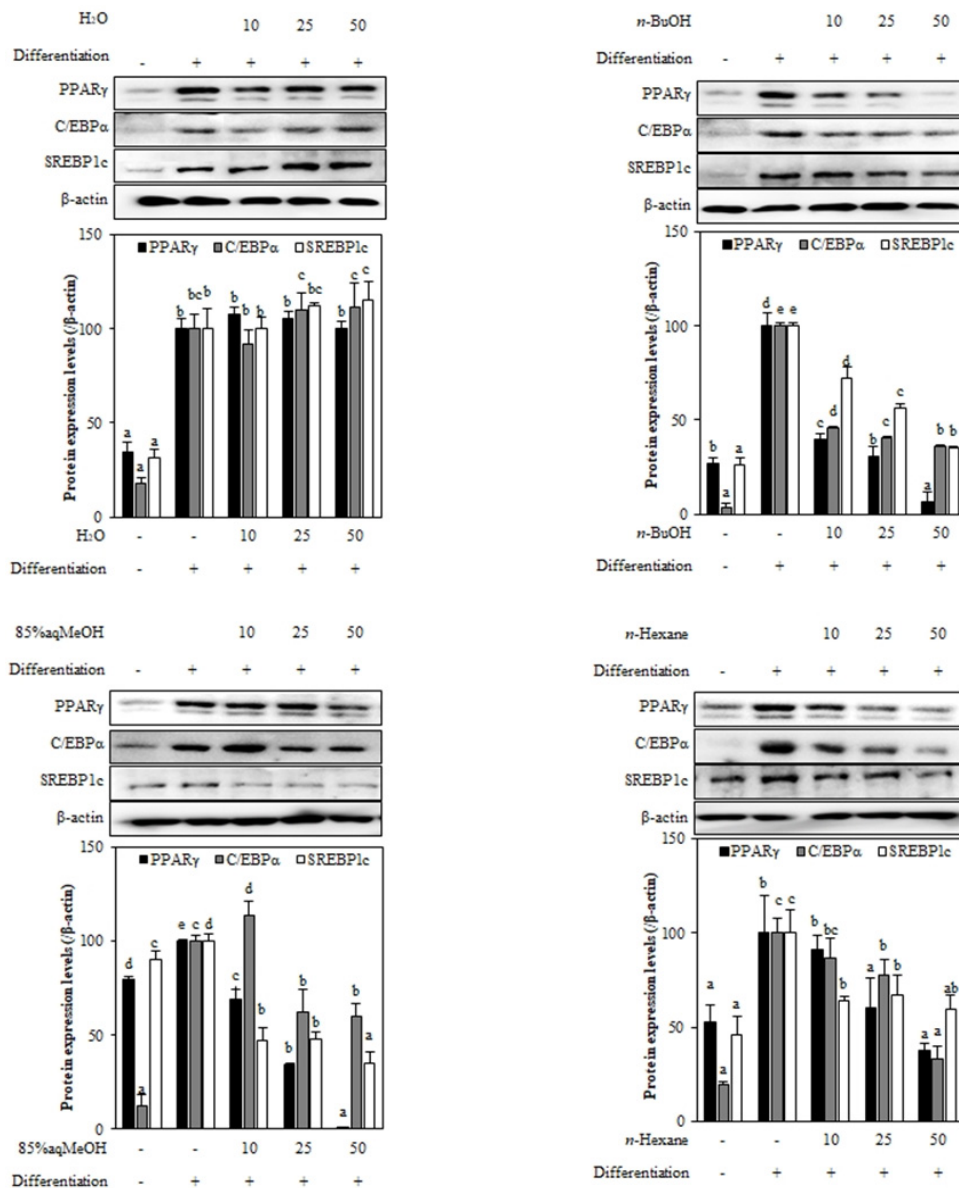


Fig. 6. Effect of solvent fractions from the crude extract of *Atriplex gmelinii* on protein expression levels of key adipogenic differentiation marker, PPAR γ , C/EBP α , and SREBP1c in 3T3-L1 adipocyte. β -Actin was used as an internal standard. The data represent the mean \pm SD of three separate experiments. PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ , C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein α , SREBP1c: sterol regulatory element-binding protein-1c, SD: standard deviation, ANOVA: analysis of variance. Different letters above bars (a, b, c, d and e) mean those bars are significantly different ($P < 0.05$) among each other according to one way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

방전사인자인 PPAR γ , C/EBP α , SREBP-1c의 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였으며, 시료를 처리한 최소 농도 10 μ g/mL에서도 PPAR γ , C/EBP α 의 발현을 50% 이상 억제하는 효과를 보였다(Fig. 6).

고찰

본 연구에서는 3T3-L1 지방전구 세포를 이용하여 우리나라 서해안 및 남해안에 널리 분포하는 가는갯능쟁이의 조추출물과 물, *n*-부탄올, 85% 메탄올, *n*-헥산 용매 분획물의 지방세포 분화 및 지방축적 억제 효능을 확인하였다.

먼저, 3T3-L1 지방 전구세포에 대한 가는갯능쟁이 조추출물의 세포독성을 확인하여 세포 생존도에 영향을 주지 않는 처리 농도를 결정하였으며 Oil Red O 염색을 통해 지방 전구세포의 지방세포로의 분화 과정 중에 지방구(lipid droplet) 생성을 억제하는 효과에 대하여 확인하였다. 약물을 처리하지 않은 대조군에 비해 조추출물을 처리한 처리군에서는 농도 의존적인 지방구의 수적 감소를 확인하였고 50 µg/mL 농도에서 지방구 형성이 약 80% 정도 억제되는 것으로 나타나서 가는갯능쟁이 조추출물이 지방세포 분화와 지질축적의 억제에 효과가 우수함을 확인하였다(Fig. 3). 한편, 지방구 형성 억제 효과를 보이는 구성성분들의 극성 정도를 확인하기 위하여 용매극성에 따라 조추출물을 물, *n*-부탄올, 85% 메탄올, *n*-헥산 용매로 분획을 실시하였으며, 각 분획의 세포독성을 측정된 결과 50 µg/mL 농도에서 세포 생존율에 변화가 없는 것을 확인하였다. 또한, 50 µg/mL 농도에서 분획들의 지방구 형성을 억제하는 효과를 확인하였다.

세포내 지방구의 형성은 adipogenesis라는 지방세포로의 분화과정을 통해 일어나며 세포형태, 유전자 발현 및 호르몬 민감성 등의 변화를 가져온다. 지방세포로의 분화는 분화과정 중 초기단계에서 PPAR- γ , CEBP/ α , SREBP1c와 같은 adipogenic transcription factor의 작용으로 발달하기 시작하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 과정은 마우스 유래 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포 분화과정 중에서도 확인할 수 있다²⁰. Adipogenesis 과정은 3T3-L1 지방 전구세포에 dexamethasone과 IBMX를 처리하면 초기 분화 전사인자인 CCAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β)가 발현되며, C/EBP β 는 계속해서 PPAR γ 의 발현을 증가시키면서 지방세포 분화와 지방합성을 유도하게 된다^{25,26}. PPAR- γ 와 CEBP/ α 는 지방조직에서 발현하는 전사인자인 SREBP-1c 발현에 의해 조절되며 지방생성의 중기와 후기 단계에서 SREBP-1c의 활성화로 인해 지방 생합성이 시작되고, 지방합성 효소가 증가하면 중성지질의 지방구 형성과 축적으로 지방세포 분화를 완료하게 된다²⁷. 이와 같은 PPAR γ , C/EBP α , SREBP1c는 지방조직에서 주로 발현되어 지방세포의 분화와 세포 내 지방구의 형성에 중요한 비만 관련 핵심 조절인자이다.

본 연구에서 가는갯능쟁이 조추출물의 네 가지 분획물들 중에 *n*-부탄올, 85% 메탄올, *n*-헥산 분획물이 지방세포 분화과정에서 PPAR γ , C/EBP α , SREBP1c 단백질의 발현을

억제하는 것을 확인하였으며, 그 중에서 *n*-부탄올 분획이 가장 좋은 억제 효과를 보여 주었다. 나머지 하나인 물 분획은 Oil red O 염색실험에서 지방구 형성이 가장 많이 억제된 것으로 관측되었지만 지방분화 관련 단백질의 발현 억제 효과는 낮은 것으로 나타났다. 일반적으로 염생식물 조추출물의 물분획물은 염분을 어느 정도 함유하고 있으며 또 다당류 계열의 수용성 물질을 함유하고 있다. 문헌에 의하면 염분은 0.1 M 이하의 농도에서 PPAR- γ , C/EBP α , SREBP1c의 발현을 증가시키는 것으로 나타나 우리의 실험결과와 유사성을 보였다²⁸. 그러나 mouse를 이용한 생체실험에서는 저농도의 염분을 섭취할 경우에는 지질이 축적되고 고농도에서는 지질축적이 억제되는 것으로 보고되었다²⁹. 현 단계에서 지방세포 분화과정 중의 정확한 작용기작을 알 수는 없지만 물분획층에 포함된 여러 복합구성성분들이 지방세포 분화과정의 초, 중기에 발현하는 PPAR- γ , C/EBP α , SREBP1c를 강하게 억제하지 않는 반면에 분화과정의 말기 단계를 주로 억제하여 지방구 생성이 감소되는 것으로 추측된다^{30,31}.

이상과 같이 가는갯능쟁이 용매 분획물은 지방세포 분화에서 분화전사 인자들의 발현을 억제함으로써 지방세포에서의 지방생성을 억제한다는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 비만 개선에 도움을 줄 수 있다고 보여진다. 따라서 앞으로 추가적인 유전자들의 발현검증 및 동물모델을 이용한 생체 내 실험과 화학성분 분석 등을 통해 좋은 항비만 소재를 도출하고자 한다. 염생식물은 염분을 많이 함유하고 있어 짠맛을 나타내며 짠맛은 본초학에서 함미라고 부르는데 짠맛을 가진 약물은 굳은 것을 유연하게 하고 마른 것을 녹여 주는 작용을 한다고 한다. 민간의 약으로 널리 사용되어온 함초는 항비만 효과를 보이는 대표적인 염생식물로 잘 알려져 있다^{32,33}. 우리나라에서 흔하게 발견되는 가는갯능쟁이도 본 연구결과에서 보여지는 것처럼 비만 예방에 효과적이고 부작용도 적은 항비만 활성 천연소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 가는갯능쟁이의 3T3-L1 지방전구세포의 지질분화과정에서 지방축적 억제 효과를 관찰하기 위해 진행되었다. 우선 가는갯능쟁이의 세포독성 여부를 확인하기 위해 MTT assay를 시행하여 세포독성이 거의 없음을

확인하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 분화시키며 가는갯능쟁이 시료를 처리하였고, Oil red O 염색을 통해 지방세포의 지방축적 효과가 유의하게 감소되었다는 것을 관찰하였다. 또한 지방세포 분화과정에서 가는갯능쟁이 조추출물과 그 용매 분획물이 전사인자인 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP1c의 단백질 발현을 유의적으로 억제한다는 것이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원 해양바이오전략소재개발 및 상용화지원사업(No. 20190096)과 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 기본연구사업(No. 2022R1F1A1065328)의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

1. Park HK. A mechanism how obesity to attain a status of disease. *J Sci Technol Stud.* 2014 ; 14(2) : 165-98.
2. Park YW. Clinical guidelines of treatment of obesity in adults. *J Korean Med Assoc.* 2003 ; 46(4) : 345-56.
3. Wu TR, Lin CS, Chang CJ, Lin TL, Martel J, Ko YF, et al. Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutella sinensis*. *Gut.* 2019 ; 68(2) : 248-62.
4. Choi SJ, Park SM, Kwak YS. Comparison of the thigh composition and its functional contractility in obese and nonobese elderly patients. *J Life Sci.* 2014 ; 24(10) : 1125-31.
5. Han G. Evaluation of chronic disease and nutritional intake by obesity of Korean elderly-data from Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2016-2018. *Korean J Food Nutr.* 2020 ; 33(4) : 428-39.
6. Müller TD, Blüher M, Tschöp MH, DiMarchi RD.

Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2022 ; 21(3) : 201-23.

7. Chakhtoura M, Haber R, Ghezzawi M, Rhayem C, Tcheroyan R, Mantzoros CS. Pharmacotherapy of obesity: an update on the available medications and drugs under investigation. *EClinicalMedicine.* 2023 ; 58 : 101882.
8. Saxena AR, Frias JP, Brown LS, Gorman DN, Vasas S, Tsamandouras N, et al. Efficacy and safety of oral small molecule glucagon-like peptide 1 receptor agonist danuglipron for glycemic control among patients with type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *JAMA Netw Open.* 2023 ; 6(5) : e2314493.
9. Conforti F, Pan MH. Natural products in anti-obesity therapy. *Molecules.* 2016 ; 21(12) : 1750.
10. Li SZ, Zeng SL, Liu EH. Anti-obesity natural products and gut microbiota. *Food Res Int.* 2022 ; 151 : 110819.
11. Shaik Mohamed Sayed UF, Moshawih S, Goh HP, Kifli N, Gupta G, Singh SK, et al. Natural products as novel anti-obesity agents: insights into mechanisms of action and potential for therapeutic management. *Front Pharmacol.* 2023 ; 14 : 1182937.
12. Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol.* 2009 ; 47(8) : 2083-91.
13. Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, et al. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biol.* 2008 ; 331(11) : 865-73.
14. Ben Hamed K, Castagna A, Salem E, Ranieri A, Abdelly C. Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regul.* 2007 ; 53 : 185-94.
15. Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR, Parida AK. Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *J Genet.* 2006 ; 85(3) : 237-54.
16. Ali B, Musaddiq S, Iqbal S, Rehman T, Shafiq N, Hussain A. The therapeutic properties, ethnopharmacology and phytochemistry of *Atriplex* species: a review. *Pakistan*

- J Biochem Biotechnol. 2021 ; 2(1) : 49-64.
17. Jeong H, Kim H, Ju E, Kong CS, Seo Y. Antioxidant effect of the halophyte *Atriplex gmelinii*. KSBB J. 2016 ; 31(4) : 200-7.
 18. Park MJ, Kim J, Kong CS, Seo Y. Inhibition of MMP-2 and -9 by crude extracts and their solvent-partitioned fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. Ocean Polar Res. 2019 ; 41(2) : 79-88.
 19. Jeon GY, Kim YC. Anti-wrinkle and skin-whitening efficacies of *Atriplex gmelinii* methanol extract in a cell-free system. J Invest Cosmetol. 2022 ; 18(2) : 161-8.
 20. Kong CS, Lee JI, Kwon MS, Seo Y. Inhibitory effect of crude extracts from a brown alga *Sargassum siliquastrum* on 3T3-L1 adipocyte differentiation. Ocean Polar Res. 2015 ; 37(4) : 279-85.
 21. Kim J, Kong CS, Moon KH, Seo Y. Inhibitory effects of the halophyte *Ligustrum japonicum* on matrix metalloproteinases activity in PMA-stimulated HT-1080 cells. KSBB J. 2020 ; 35(1) : 57-63.
 22. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. J Clin Invest. 2011 ; 121(6) : 2094-101.
 23. Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. Obesity and cardiovascular disease: Risk factor, paradox, and impact of weight loss. J Am Coll Cardiol. 2009 ; 53(21) : 1925-32.
 24. Park E, Song JH, Kim GN, Kim HO. Anti-oxidant and anti-obese effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaf extract in 3T3-L1 cells. Kor J Aesthet Cosmetol. 2015 ; 13(1) : 19-26.
 25. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. Cell Metab. 2006 ; 4(4) : 263-73.
 26. Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ. Adipogenesis at a glance. J Cell Sci. 2011 ; 124(Pt 16) : 2681-6.
 27. Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. J Biol Chem. 2001 ; 276(21) : 18464-71.
 28. Lee M, Sorn SR, Lee Y, Kang I. Salt induces adipogenesis/lipogenesis and inflammatory adipocytokines secretion in adipocytes. Int J Mol Sci. 2019 ; 20(1) : 160.
 29. Cui H, Yang S, Zheng M, Liu R, Zhao G, Wen J. High-salt intake negatively regulates fat deposition in mouse. Sci Rep. 2017 ; 7(1) : 2053.
 30. Isa Y, Miyakawa Y, Yanagisawa M, Goto T, Kang MS, Kawada T, et al. 6-Shogaol and 6-gingerol, the pungent of ginger, inhibit TNF-alpha mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2008 ; 373(3) : 429-34.
 31. Regassa A, Kim WK. Effects of oleic acid and chicken serum on the expression of adipogenic transcription factors and adipogenic differentiation in hen preadipocytes. Cell Biol Int. 2013 ; 37(9) : 961-71.
 32. Kim YA, Kong CS, Lee JI, Kim H, Park HY, Lee HS, et al. Evaluation of novel antioxidant triterpenoid saponins from the halophyte *Salicornia herbacea*. Bioorg Med Chem Lett. 2012 ; 22(13) : 4318-22.
 33. Lee HS. Meta-analysis on the effect of obesity and blood lipid levels in *Salicornia herbacea*. J Korean Appl Sci Technol. 2023 ; 40(1) : 123-34.