

Anti-adipogenic Activity of Cortex *ulmi pumilae* Extract in 3T3-L1 Preadipocytes

Hyun Young Jeong¹, Soojung Jin¹, Soo Wan Nam^{1,2}, Sook Kyung Hyun^{1,3}, Sung Gu Kim⁴, Byung Woo Kim^{1,5} and Hyun Ju Kwon^{1,5*}

¹Blue-Bio Industry RIC, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ²Department of Biotechnology and Bioengineering, College of Engineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ³Department of Food Nutrition, College of Human Ecology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ⁴Bioport Korea Co., Marine Bio-industry Development Center, Busan 619-912, Korea, ⁵Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received November 20, 2013 / Revised January 14, 2014 / Accepted February 6, 2014

Cortex *ulmi pumilae*, the cortex of *Ulmus davidiana* var. *japonica*, has been used in traditional folk medicine for its anti-inflammatory effect. Although its various bioactivities such as anti-inflammatory, anti-microbial, and anti-cancer, have been reported, the anti-adipogenic activity of cortex *ulmi pumilae* remains unclarified. In the present study, we investigated the effect of cortex *ulmi pumilae* extract on adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. Treatment with cortex *ulmi pumilae* extract significantly reduced the formation of lipid droplets and triglyceride content in a dose-dependent manner; this is associated with an inhibition of the adipogenic transcription factors, CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), C/EBP β , and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). In addition, cortex *ulmi pumilae* extract treatment during the early stage of adipogenesis showed more efficient anti-adipogenic activity than treatment during other stages of adipogenesis. Cortex *ulmi pumilae* extract also inhibited cell proliferation and induced G1 arrest of 3T3-L1 cells in the early stage of adipogenesis. This was associated with upregulated expression of Cdk inhibitor p21 and down-regulated expression of cyclin E and phospho-Rb, indicating that cortex *ulmi pumilae* extract blocks mitotic clonal expansion by cell cycle regulation. Taken together, these results suggest that cortex *ulmi pumilae* extract possesses anti-adipogenic activity through the inhibition of adipocyte differentiation by blocking mitotic clonal expansion.

Key words : Adipocyte differentiation, adipogenic transcription factors, anti-adipogenic activity, cortex *ulmi pumilae*, mitotic clonal expansion

서 론

비만은 음식물의 섭취(food intake)와 에너지 소비(energy expenditure) 사이의 불균형으로 인하여 유발되는 대사 장애로 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 말하며, 고혈압, 심혈관계 질환, 제 2형 당뇨병 및 각종 암 등과 같은 만성 질환의 발생 가능성을 증가시키는 위험요소로 알려져 있어 비만의 치료와 예방 등에 관심이 증가되고 있다[6, 26]. 이러한 비만 인구는 점차 증가하고 있어 2008년 전세계 성인 인구 중 15억 명이 과체중 및 비만이었으며, 2030년에는 과체중 인구가 약 21억 명, 비만 인구가 약 11억 명에 이를 것으로 추산되고 있다[22]. 한국의 경우도 식습관의 서구화 및 생활환경의 변화 등으로 인해 성인 비만 인구는 1998년 26.0%에서 2001년 29.2%,

2009년 31.3%로 점차 증가하고 있으며 이러한 비만 인구의 증가로 인한 비만 예방 및 치료제에 관한 수요 또한 급증하고 있다[21]. 현재 비만치료제 시장은 음식물 흡수 억제제 및 식욕 억제제 등이 대부분을 차지하고 있으나 부작용에 대한 우려로 인하여, 최근에는 부작용이 적고 체중 조절에 효과적인 천연 물질을 이용한 비만 예방 및 치료제의 개발이 활발히 진행되고 있다[14].

비만은 지방세포의 과형성에 의한 지방조직의 축적에 의해 유발되며 지방세포의 과형성은 지방세포의 증식 또는 지방세포의 분화 유도에 의해 일어난다. 따라서 비만치료제 개발을 위하여 지방세포의 증식 또는 분화를 억제하는 천연물질의 연구가 활발히 진행되고 있으며 이러한 항비만 활성의 분자생물학적 기전연구를 위하여 mouse embryo로부터 유래된 지방전구세포인 3T3-L1 세포가 주로 사용된다[8]. 또한 3T3-L1 지방전구세포를 사용하여 *in vitro* system에서 지방세포 분화를 유도하기 위하여 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone, insulin (MDI) 등 분화유도인자가 필요하다[9, 10]. 지방세포의 분화 과정 즉 adipogenesis 과정은 confluence, hormonal induction, growth arrest, mitotic clonal expansion, terminal differentiation의 일련의 과정을 거치는데, 지방전구

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1519, Fax : +82-51-890-1532

E-mail : hjkwon@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

세포가 confluence 상태가 되면 contact inhibition으로 인해 세포주기가 G0/G1기에서 정지되고 이때 분화 유도제인 MDI를 처리하게 되면 세포는 G1기를 빠져 나와 다시 세포주기로 들어가 세포증식이 유도된다. 그 결과 세포의 수는 분화유도제 처리 전에 비해 약 3-4배 증가하게 되며, 이 과정을 mitotic clonal expansion이라 부른다[30]. 이 과정은 지방세포 분화에 필수적인 부분으로, 지방전구세포의 세포주기를 조절하여 mitotic clonal expansion을 억제하면 지방세포분화가 진행되지 않아 항비만 효과가 뛰어나다는 다수의 보고가 있다[27, 28, 29]. 이러한 지방세포의 분화과정은 전사인자인 CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)와 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 에 의해 조절된다[3, 5, 23, 24]. Mitotic clonal expansion 단계는 이러한 주요 전사인자의 발현 유도를 위한 준비단계로서, 이 단계에서의 세포는 분화 초기에 발현되는 C/EBP β , C/EBP δ 의 발현을 유도시켜 [12, 13, 15] adipogenesis의 핵심적인 기능을 하는 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현을 증가시킨다[4, 7, 11]. 활성화된 핵심 조절인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 는 서로 상호작용하여 상승효과를 일으킨다. 이러한 주요 전사인자들의 조절을 통해 지방세포분화가 진행되고 그 결과 중성지방의 지방구(lipid droplet)가 세포질에 나타나 점점 커지고 합쳐져서 지방세포의 분화가 완료된다[3, 6, 8]. 따라서 많은 연구에서 mitotic clonal expansion의 억제, 지방세포분화 관련 전사인자의 조절 등 지방세포의 분화를 제어하는 항비만 치료제의 연구가 지속되고 있다[13, 24].

유근피(*Cortex ulmi pumilae*)는 느릅나무과에 속하고 유피(楡皮) 또는 유백피(楡白皮)라고도 불리며, 느릅나무(*Ulmus davidiana var. japonica* Nakai)의 코르크층을 벗긴 수피(樹皮)를 건조한 것을 말한다. 예로부터 수종, 임질, 유선염, 소변불통, 녹막염에 사용하였으며, 외용으로는 뿌리를 찧어 환부에 붙여 소염제로 이용하였다[18]. 현재까지 유근피의 항균효과와 산화적 스트레스를 억제하는 항산화 효과가 보고되었으며 [1, 33], 또한 느릅나무의 메탄올 추출물이 위암과 대장암 세포주에 대해 미약한 항암효능을 갖는다는 연구결과가 보고되었다[31]. 이와 같이 유근피의 다양한 생리활성에 대한 연구보고는 있으나 항비만 활성에 대한 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 유근피 추출물을 이용하여 지방세포 내의 지방 축적을 감소시키고 지방세포 분화에 관여하는 인자의 조절을 통해 지방 형성을 감소시키는 효능에 대하여 확인하였다.

재료 및 방법

3T3-L1의 배양과 시약

본 실험에 사용한 mouse embryo 유래의 3T3-L1 지방전구세포 및 SC-1 섬유아세포는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 분양을 받아 사용하였다. 세포배양을 위하여 3T3-L1 지방전구세포는 10% bovine calf serum (BCS,

WelGene Biopharmaceuticals, Daegu, Korea)과 1% penicillin/streptomycin solution을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, WelGene Biopharmaceuticals, Daegu, Korea)를 사용하고, SC-1 섬유아세포는 DMEM에 10% fetal bovine serum (FBS, WelGene Biopharmaceuticals, Daegu, Korea)과 1% penicillin/streptomycin solution을 첨가한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

시료의 추출물 제조

가루로 분쇄된 유근피(*Cortex ulmi pumilae*) 100 g에 70% 에탄올을 첨가하여 75°C에서 3시간씩 3회 반복하여 유효성분을 추출하였다. 추출액은 filter하여 불순물을 제거한 다음, 감압 농축하여 8.8 g의 추출물을 얻었으며, DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 녹여 500 mg/ml의 농도로 만들어 사용하였다.

세포독성 검토

유근피 추출물의 세포독성 측정은 PreMix WST Cell Proliferation Assay System을 이용하였다[11]. 3T3-L1 지방전구세포를 96well cell culture plate (SPL Lifesciences, Pocheon, Korea)에 5×10^3 cells/well의 농도로 접종한 후 24시간 배양하였다. 그 후 유근피 추출물을 0, 100, 200, 300, 400, 500 μ g/ml의 농도로 처리하고 대조군의 경우는 0.5% DMSO를 처리하였다. 37°C에서 48시간 배양한 다음 WST-1 solution (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Bioidea, Italy)을 각 well에 20 μ l씩 첨가하고 4시간 반응 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

3T3-L1 지방전구세포의 지방세포 분화(differentiation) 유도

35 mm cell culture dish (SPL Lifesciences, Pocheon, Korea)에서 3T3-L1 지방전구세포를 confluent한 상태가 되도록 배양을 한 후, 2일간 더 배양하였다(D0). 이 상태에서 FBS가 첨가된 DMEM에 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, 10 μ g/ml insulin (MDI, Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 처리하여 분화를 유도하고 2일간 배양하였다(D2). 그 후, 10 μ g/ml insulin만을 포함한 DMEM-FBS로 교환하고 2일에 한번씩 배지를 교환하여 4일간 더 배양하였다(D6). 이 후 세포 안에 지방구가 형성이 되는 것을 볼 수 있는데, 완전히 분화시키기 위해 DMEM-FBS로 교환하여 2일간 추가 배양을 하였다(D8).

Triglyceride 축적 저해 효과 확인(Oil Red O 염색)

유근피 추출물에 의해 지방세포 분화 시 나타나는 triglyceride 축적이 저해되는 지 확인하기 위하여 3T3-L1 지방전구

세포의 분화 유도시 유근피 추출물을 농도별(0, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하고, 유근피 추출물을 처리하지 않은 대조군의 세포가 100% 분화가 완료되었을 때 Oil Red O 염색을 하였다. 먼저 dish내 배지를 제거한 후 phosphate buffered saline (PBS, Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)으로 세포를 세척한 다음, 10% formalin (Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)을 처리하여 상온에서 1시간 동안 고정시켰다. 고정 후 formalin을 제거하고 증류수와 60% isopropanol (Burdick and Jackson, Muskegon, MI, USA)로 세척한 후 세포들을 완전히 건조시키고, Oil Red O working solution (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 20분간 처리하여 세포 안에 축적된 지방구들을 염색시킨 다음 증류수로 세척하였다. 현미경을 사용하여 염색된 세포를 관찰한 후, 100% isopropanol을 이용하여 triglyceride에 염색되어 있는 Oil Red O를 용출시킨 다음 spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하여 triglyceride 함량을 확인하였다.

지방세포 분화 억제 효과 관찰

유근피 추출물의 지방세포 분화 효과를 검토하기 위하여 농도별 효과와 처리 시간별 효과를 관찰하였다. 먼저 유근피 추출물의 농도에 의한 효과는 지방세포 분화유도를 위한 MDI와 insulin 첨가와 동시에 다양한 농도의 유근피 추출물(0, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$)을 동시에 처리하였으며, 이후 배지 교환 시기마다 같은 농도의 유근피 추출물을 처리하였다. 다음으로 유근피 추출물의 처리시기에 따른 지방세포 분화 저해 효과를 관찰하기 위하여 Fig. 4A와 같이 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 유근피 추출물을 지방세포 분화 유도 단계별로 처리하였다. 이 때 유근피 추출물의 처리 시기에 따라 2가지 대조군과 4가지 실험군으로 나누었으며, 1번 대조군은 분화 유도제를 처리하지 않은 지방전구세포(preadipocyte), 그리고 2번 대조군은 지방세포분화를 유도하면서 유근피 추출물 대신 0.5% DMSO를 처리한 대조군(Control adipocyte)을 준비하였다. 3번 실험군은 분화유도제인 MDI를 처리할 때 유근피 추출물을 동시에 처리하였으며(D0~D8), 4번 실험군의 경우, 분화유도제 MDI 처리 이후 1차 insulin 단독 처리 시기부터 유근피 추출물을 처리하였다(D2~D8). 5번 실험군은 2차 insulin 단독 처리 시기(D4)부터 유근피 추출물을 처리하여 D8까지 처리하였다. 마지막으로 6번 실험군의 경우, 분화유도가 끝나고 마지막 배지 교환 단계에서 유근피 추출물을 동시에 처리하였다(D6~D8).

세포증식 속도 측정(trypsin blue exclusion assay)

유근피 추출물이 mitotic clonal expansion 단계에서 일어나는 세포증식에 어떤 영향을 끼치는 지 확인하기 위하여 trypan blue exclusion assay를 수행하였다. 먼저 3T3-L1 지방전구세포를 confluent한 상태까지 배양한 후 분화유도제인 MDI를 포함하는 배지로 교환할 때, 유근피 추출물을 농도별(0, 100,

200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하였다. 분화유도제와 유근피 추출물을 처리하여 배양 후 각 0, 24, 48 시간별로 세포를 회수한 다음, trypan blue solution (Trypan blue solution 0.4%, SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 세포현탁액을 1:1로 처리하여 염색하고 이 후 hemocytometer를 이용하여 생 세포 수를 측정하였다.

세포주기 변화 측정

3T3-L1 지방전구세포를 60 mm cell culture dish에 1×10^5 cells/dish의 농도로 seeding 하여 배양 하였다. 세포를 confluent한 상태까지 배양한 후 분화유도제인 MDI를 포함하는 배지로 교환할 때, 유근피 추출물을 농도별(0, 300, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하였다. 24시간 후에 세포를 회수하여 PBS로 세척 후 70% EtOH로 고정을 시킨 다음, MuseTM Cell Cycle Reagent (Millipore Co. Milford, MA, USA)를 처리하여 30분간 염색한 후 MuseTM Cell Analyzer (Millipore Co. Milford, MA, USA)로 분석하였다.

지방세포 분화 관련 단백질의 발현 분석(Western blot analysis)

유근피 추출물의 처리에 따른 지방세포 분화 관련 단백질의 발현 변화를 분석하기 위하여 Western blot analysis를 수행하였다. 유근피 추출물을 처리한 3T3-L1 세포를 회수하여 CSK 완충액[100 mM PIPES (pH 6.8), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT)]에 0.1% Triton X-100, 1 mM ATP 및 Protease inhibitor Cocktail (BD PharmingenTM, Mississauga, Ontario, Canada)이 첨가된 용액에 현탁하고 15분간 용출시킨 후 sonicator로 세포를 한번 더 파쇄하였다. 이 후 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하고 BCA법을 사용하여 총 단백질량을 결정하였다. 추출한 단백질에 동량의 sample buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% bromophenol blue]를 섞어서 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였다. 전기영동 후 gel 내의 단백질을 PVDF membrane (Pall corporation, NY, USA)에 전사시킨 다음, 전사된 membrane을 blocking solution [0.15 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% Triton X-100, 5% BSA]을 사용하여 4°C에서 16시간 동안 blocking시켰다. Membrane을 세척한 후 일차 항체를 반응시키고, 이차 항체를 사용하여 반응시켰다. 면역반응 단백질은 화학발광시스템 (Chemi-luminescence system; SuperSignal West Femto Maximum sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)으로 검출하였다. 본 실험에 사용된 C/EBP α 및 C/EBP β 의 일차 항체는 Cell signaling technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며 PPAR γ , p21, Cyclin E, Cdk2, Rb, Phospho-Rb, E2F-1 등의 일차 항체 및 HRP-con-

jugated anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG 등 이차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하여 사용하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였으며 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타내었다. 통계분석은 SPSS 프로그램(SPSS 18.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였으며, *t*-test에 의해서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

유근피 추출물의 세포 독성 평가

먼저 유근피 추출물의 세포 독성을 확인하기 위해 3T3-L1 지방전구세포 및 정상세포로 SC-1 섬유아세포를 사용하였다. 이들 정상세포에 유근피 추출물을 0, 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml 농도로 처리한 후, PreMix WST-1 Cell Proliferation Assay System을 이용하여 분석하였다. 그 결과는 유근피 추출물을 처리한 실험군들과 0.5% DMSO를 처리한 대조군의 흡광도 값을 비교하여 백분율로 나타내었다. Fig. 1A에서 알 수 있듯이 최고 농도인 500 µg/ml의 농도를 처리하였을 때에도 대조군에 비해 3T3-L1 지방전구세포의 세포증식에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였으므로, 유근피 추출물이 3T3-L1 지방전구세포에 대한 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 또한 이는 동일한 mouse embryo 유래의 정상세포대조군으로 사용한 SC-1 섬유아세포에서도 유사한 결과를 보여(Fig. 1B), 본 실험에 사용한 유근피 추출물의 농도 범위에서는 세포 독성이 없음을 확인하였다. 따라서 이후의 실험에서는 유근피 추출물을 0, 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml로 처리하였다.

유근피 추출물에 의한 triglyceride 축적 억제 효과

유근피 추출물의 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포분화(adipogenesis)에 미치는 유근피 추출물의 영향을 살펴보았다. 3T3-L1 지방전구세포의 분화 유도를 위하여 MDI 및 insulin이 포함된 배지로 교환할 때 적정 농도의 유근피 추출물을 동시에 처리하여, Oil Red O 염색법으로 세포 내 형성된 triglyceride를 염색하여 위상차 현미경(phase-contrast microscope)을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, Fig. 2A와 같이 유근피 추출물을 처리하지 않았을 경우에는 세포질 내 염색된 triglyceride의 형성이 관찰되었으나, 유근피 추출물을 처리한 경우, 대조군에 비교하여 100 µg/ml의 농도에서 염색된 triglyceride의 형성이 억제되었으며, 200~500 µg/ml의 농도에서는 지방구가 거의 형성이 되지 않는 것을 볼 수 있었다. 형성된 triglyceride를 정량하기 위하여 염색되어진 Oil Red O를 100% isopropanol로 용출하여 500 nm에서 흡광도를 측정한 결과, 유근피 추출물 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml의 농도에서 각각 46.3, 19.5, 18.1, 14.2 13.2% 정도로 중성지방 축적이 감소됨을 확인하였다(Fig. 2B). 따라서, 천연소재인 유근피 추출물은 지방전구세포에 대한 독성은 없으면서 지방세포 내의 triglyceride 축적 억제 활성이 현저하게 높은 것을 확인하였다.

지방세포 분화 조절인자에 미치는 영향

지방전구세포는 C/EBP family와 PPAR γ 를 중심으로 초기, 중기, 후기의 각 단계별로 발현되는 전사인자들의 복잡한 상호작용에 의하여 지방세포로 분화된다. 즉, 분화와 함께 나타나는 세포의 모양 변화나 중성지방의 축적과 같은 형태상의 변화는 분화과정에서 유도되는 분화 조절인자들의 활성에 의한 것이며[2, 32], 대표적인 분화 조절인자인 PPAR γ , C/EBP family들이 그 중추적인 역할을 담당하고 있다[4, 7]. 특히 C/EBP β 는 분화 초기에 발현이 유도되어 이후 분화 후기에 유도되는 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현을 조절함으로써 지방세

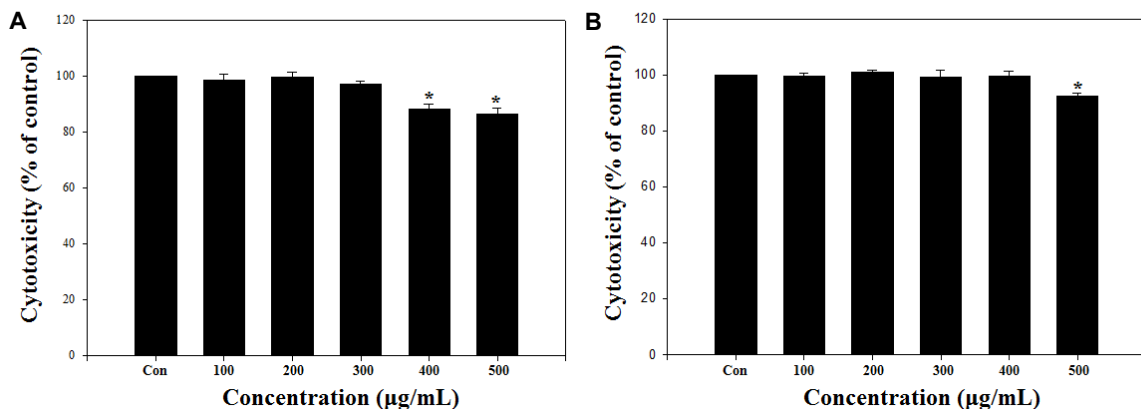


Fig. 1. Effect of Cortex *ulmi pumilae* extract on cytotoxicity of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 preadipocytes (A) and SC-1 fibroblast cells (B) were incubated with various concentration of Cortex *ulmi pumilae* extract for 48 h to measure cell viability. Cell viability was determined by WST assay. **p*<0.05 as compared with the control.

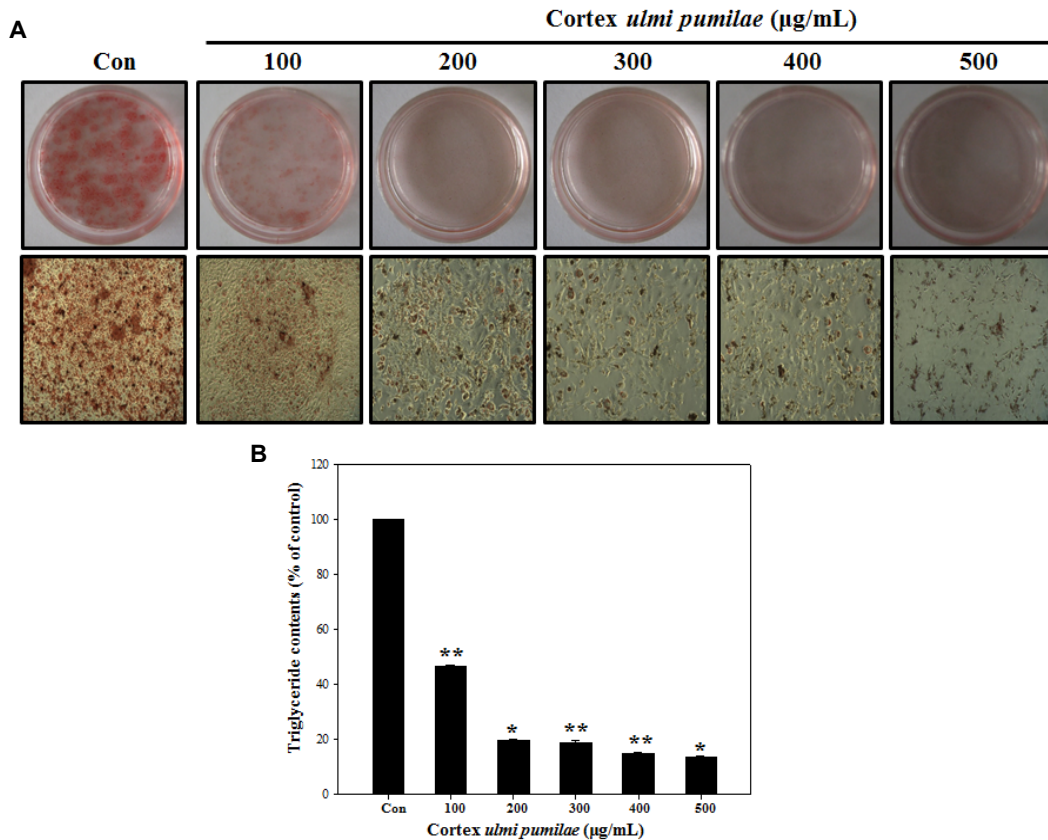


Fig. 2. Inhibitory effect of *Cortex ulmi pumilae* extract on the lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. Two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (D0) were stimulated for 2 day with MDI medium containing indicated concentration (100, 200, 300, 400, 500 µg/ml) of *Cortex ulmi pumilae* extract. On day 2, the MDI medium was replaced with DMEM/10% FBS culture medium containing 10 µg/ml insulin and indicated concentration of *Cortex ulmi pumilae* extract. The medium was further changed at day 2, 4, and 6. The intracellular lipid accumulation was visualized by Oil Red O staining at day 8 (A). Stained intracellular oil droplets were eluted with 100% isopropanol and quantified by spectrophotometrical analysis at 500 nm (B). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared with the control.

포 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[3, 5, 23]. 일단 confluent 상태인 지방전구세포에 분화유도제를 처리하면, 지방세포분화의 초기 단계로 분화유도제의 자극에 의해 C/EBPβ가 발현이 되고 이에 의해 2~3배의 세포 증식이 일어나는 mitotic clonal expansion의 단계로 들어간다[27, 28, 29]. 또한 이렇게 활성화된 C/EBPβ는 지방세포분화의 중기와 후기에서 중요하게 작용하는 PPARγ와 C/EBPα의 발현을 촉진시키며, 활성화된 PPARγ와 C/EBPα에 의해 지방세포 특이 유전자의 발현이 유도되고 지방세포분화가 완성된다[23, 24]. 따라서 본 연구에서는 유근피 추출물이 분화관련 조절인자의 발현에 미치는 영향을 분화 단계별로 확인하였다. 먼저 분화 유도 초기단계인 mitotic clonal expansion에서 유근피 추출물이 지방세포분화 관련 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보았다. Fig. 3A에서와 같이 분화유도제인 MDI와 유근피 추출물을 동시에 처리하여 2일 동안 배양하여 mitotic clonal expansion 단계(D2)에서 세포를 회수하고, 초기 지방세포 분화 조절인자인 C/EBPβ의 단백질 발현양상을 Western blot anal-

ysis를 통하여 확인하였다. 그 결과, C/EBPβ의 발현이 대조군과 비교하여 유근피 추출물 농도의존적으로 감소됨을 확인하였다(Fig. 3A).

다음으로 분화초기 C/EBPβ의 발현 이후, 분화 후기에 발현되어 adipose-specific 유전자 발현을 활성화시키는 데 관여하는 PPARγ와 C/EBPα의 발현 양상을 확인하기 위하여, Fig. 3B에서와 같이 분화유도제 MDI처리와 동시에 유근피 추출물을 처리하여 분화후기인 D6까지 유근피 추출물을 동시에 처리한 다음, 세포를 회수하여 PPARγ와 C/EBPα의 발현 양상을 Western blot analysis를 통하여 확인하였다. 그 결과, Fig. 3B에서와 같이 PPARγ와 C/EBPα의 발현이 유근피 추출물의 농도의존적으로 감소함을 확인하였다. 따라서 지금까지의 결과로부터 유근피 추출물은 지방세포 분화 초기의 C/EBPβ의 발현을 감소시키고, 그 영향으로 이후 단계적으로 발현이 유도되는 PPARγ와 C/EBPα의 발현 또한 억제되는 것으로 사료되며, 이러한 유근피 추출물에 의한 지방세포 분화 조절인자들의 발현 저하는 지방세포로의 분화를 억제시켜 세포질 내 중

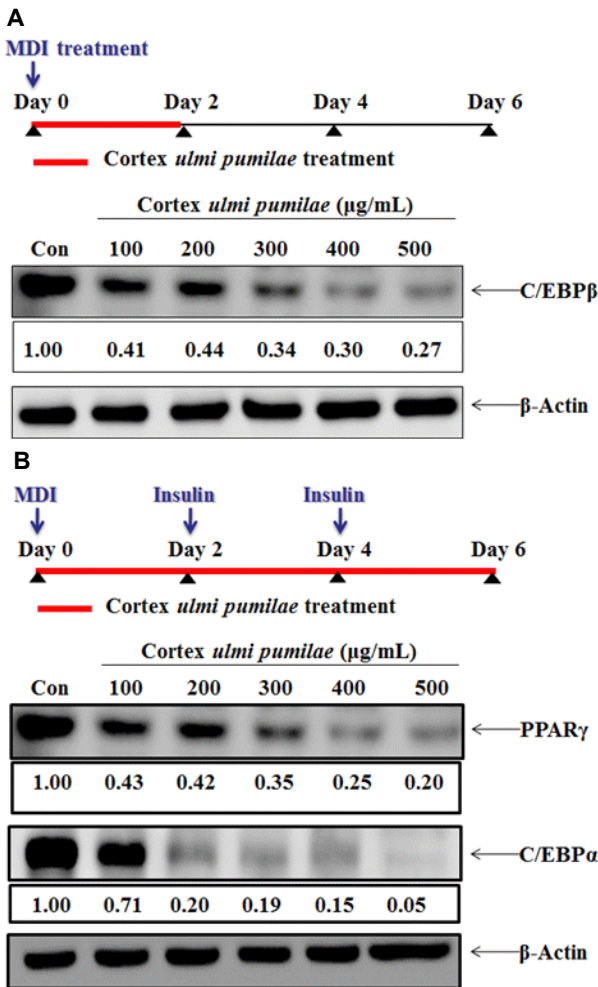


Fig. 3. Effect of Cortex *ulmi pumilae* extract on the expression of adipogenesis related proteins. (A) Post-confluent 3T3-L1 preadipocytes were incubated in adipogenic inducer for 2 days with indicated concentration of Cortex *ulmi pumilae* extract. (B) Post-confluent 3T3-L1 preadipocytes were incubated in adipogenic inducer for 2 days with Cortex *ulmi pumilae* extract. The media were changed to DMEM containing 10 μg/ml insulin and with or without Cortex *ulmi pumilae* extract at day 2 and 4. Cells harvested at day 6. Cells were lysed and proteins were subjected to Western blot analysis.

성지방 축적을 감소시켰을 것으로 사료된다.

지방세포 분화단계별 처리에 따른 분화 억제 효과

지방세포의 분화는 단계별로 나누어져 있으며, 분화유도제인 MDI를 처리하여 분화를 유도하는 초기(early stage: D0~D2), 분화가 진행되어 세포의 크기가 증가하며 세포 내 지방구가 축적되면서 성숙지방세포로 분화되는 중기(intermediate stage: D2~D6), 그리고 완전히 성숙된 지방세포로 분화가 완료되는 후기(terminal stage: D6~)로 나눌 수가 있으며, 지방세포 분화 초기단계에서는 세포수가 급증하게 되는 mitotic clo-

nal expansion이 일어난다[13]. 앞서 유근피 추출물 처리에 의해 지방세포분화 초기 조절 단백질인 C/EBPβ의 발현이 억제되는 것을 확인하였으므로, 다음으로 유근피 추출물의 처리 시기에 따른 지방세포분화 억제효과를 확인하였다. 즉, 유근피 추출물을 지방세포 분화 단계별로 처리하여 지방세포 분화 과정 중 어느 단계에서 유근피 추출물이 효과적으로 작용하는지 검토하였다. Fig. 4A와 같이 2가지 대조군과 4가지 실험군으로 나누어 각 단계별로 유근피 추출물(500 μg/ml)을 처리한 다음, Oil Red O 염색으로 지방세포 분화에 의한 지방구 형성을 확인하였다. 그 결과, 분화유도제를 처리하지 않은 지방전구세포인 1번 대조군에 비해 분화유도제 처리와 동시에 0.5% DMSO를 처리한 2번 대조군의 경우, 지방구 형성이 활발하게 유발되어 지방세포 분화유도가 효과적으로 일어나는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 이에 비해 분화유도제 처리와 동시에 유근피 추출물을 처리한 3번 실험군의 경우 지방구 형성이 거의 일어나지 않았다. 반면, 분화유도제 처리시기에 비해 유근피 추출물의 처리시점이 늦어질수록 즉, 4번에서 5번, 6번 실험군으로 갈수록 지방구 형성이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 또한 Oil Red O 염색의 정량적인 분석결과, 대조군의 triglyceride 함량을 100%로 보았을 때 3~6번 실험군에서의 triglyceride 생성 억제율은 각각 85, 80, 57, 27% 이었다(Fig. 4C). 이러한 결과로부터 분화유도제와 동시에 유근피 추출물을 처리하는 것이 지방세포 분화 억제 효율이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 유근피 추출물은 지방세포 분화 초기 단계에서부터 효과적으로 지방세포분화를 저해하는 것을 알 수 있었다.

유근피 추출물의 mitotic clonal expansion 단계에 미치는 영향

앞서 유근피 추출물이 지방세포분화의 초기 단계에 효과적으로 작용하여 지방세포분화를 억제하는 것을 확인하였으므로, 분화초기에 일어나는 mitotic clonal expansion에 미치는 영향을 관찰하였다. 지방전구세포는 confluence 상태에서 세포주기가 정지되어 있다가 분화초기, 분화유도제인 MDI에 의해 세포주기가 재개되면서 한 번 혹은 두 번의 세포분열이 일어나 세포수가 증가하는 mitotic clonal expansion이 일어나고, 이때 분화초기 관련 전사인자인 C/EBPβ가 필수적이라는 보고가 있다[27, 28, 29]. 따라서 3T3-L1 지방전구세포에 분화유도제인 MDI를 처리함과 동시에 유근피 추출물을 처리하여 Day 0, 1, 2의 기간 동안 세포 증식 변화를 typan blue exclusion assay를 통하여 관찰하였다. 그 결과, Fig. 5A에서 보여지듯이 Day 0에 분화유도제와 동시에 DMSO를 처리한 대조군에서는 Day 0에 비해 Day 1에서 1.45배, Day 2에서 1.81배 증가하는 반면, 유근피 추출물을 처리한 경우 농도의존적으로 세포 수 증가가 억제되었으며, 특히 최고 농도인 500 μg/ml의 유근피 추출물을 처리한 경우, Day 1과 Day 2에서 세포 수가 거의 증가하지 않는 것을 확인하였다. 또한 이러한 유근피 추

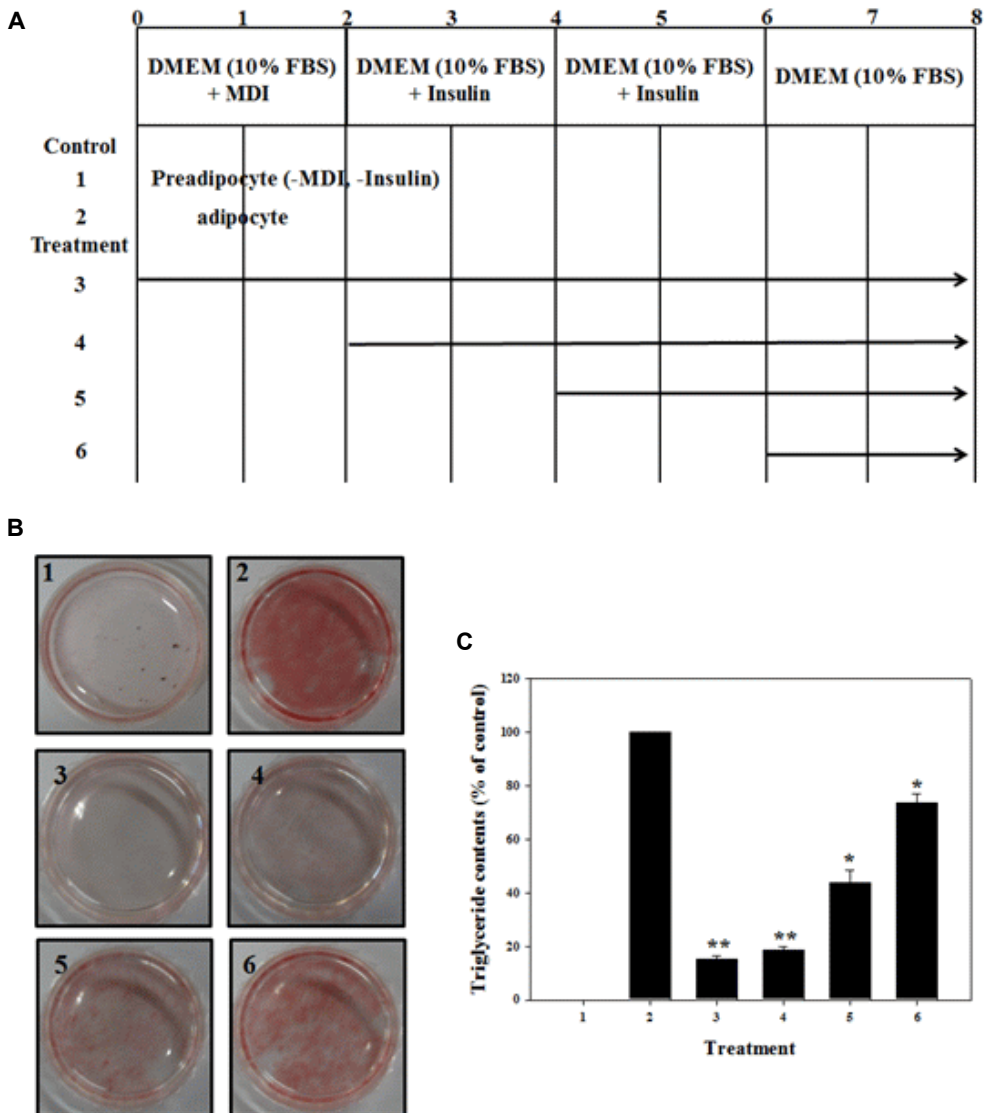


Fig. 4. Inhibitory effect of Cortex *ulmi pumilae* extract in the early stage of adipogenesis. Two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes were subjected to adipocyte differentiation for 8 days with 500 µg/ml Cortex *ulmi pumilae* extract at the indicated time points, as shown in (A). After these treatments, cells were subjected to Oil Red O staining (B) and quantitative analysis of Oil Red O-stained intracellular lipids (C). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared with the control 2 group.

출물에 의한 세포 수 증가 억제가 세포 독성에 의한 것이 아님을 확인하기 위하여 WST assay를 실시한 결과, 분화유도제인 MDI와 DMSO만을 처리한 대조군과 비교하여 유근피 추출물을 처리한 3T3-L1세포의 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으며, 유근피 추출물이 mitotic clonal expansion 단계에서 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Fig. 5B). 따라서 Fig. 5A에서 확인한 유근피 추출물에 의한 세포 수 증가의 억제는 MDI의 자극에 의해 일어나는 세포 증식, 즉 mitotic clonal expansion을 억제하는 것을 나타내며, 그 결과 지방세포로의 분화를 저해하는 것으로 사료된다.

유근피 추출물 처리에 의한 세포주기 변화분석

Mitotic clonal expansion 단계에서는 정지되어있던 세포주기가 다시 진행되어 일어나는 단계이고, 유근피 추출물에 의해 지방전구세포의 mitotic clonal expansion이 저해되는 것을 확인하였으므로, 유근피 추출물의 처리가 세포주기의 변화에 어떤 영향을 미치는 지 확인하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 배양하여 confluent상태를 만든 다음 분화유도제인 MDI와 동시에 유근피 추출물을 농도별(0, 300, 400, 500 µg/ml)로 처리하여 24시간 배양한 후, 세포를 회수하여 세포주기 변화를 확인하였다. 그 결과, Fig. 6에서 알 수 있듯이 지방세포 분화 hormone인 MDI만을 처리한 대조군(con)의 G1기의 개체군의 비율은 37.9%인 반면, 유근피 추출물을 농도별로 처리한 군들

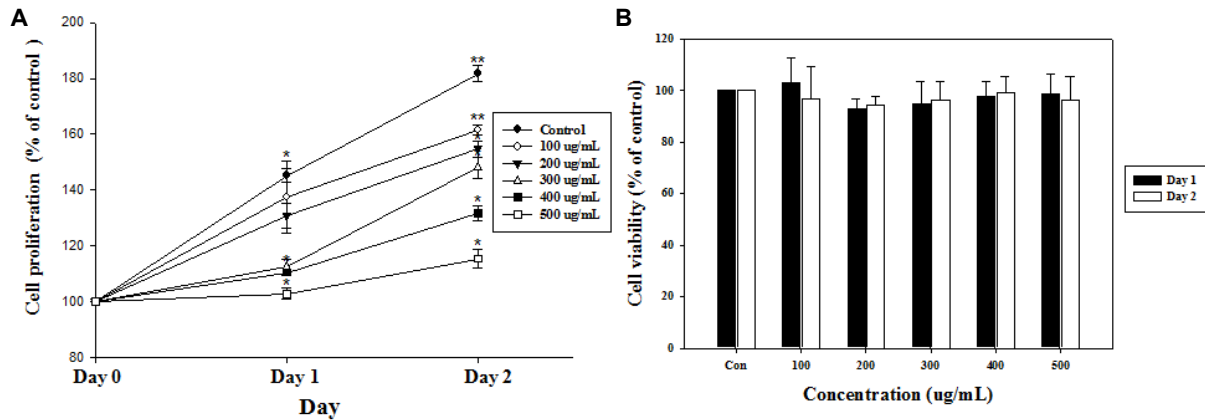


Fig. 5. Effect of Cortex *ulmi pumilae* extract on proliferation of 3T3-L1 preadipocytes stimulated by adipogenic inducer. Post-confluent 3T3-L1 preadipocytes were caused to differentiate by adipogenic inducer with indicated concentration of Cortex *ulmi pumilae* extract. Trypan blue exclusion assay was performed at Day 0, Day 1 and Day 2 (A). Cell viability was determined by WST assay performed at Day 1 and Day 2 (B). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared with the control.

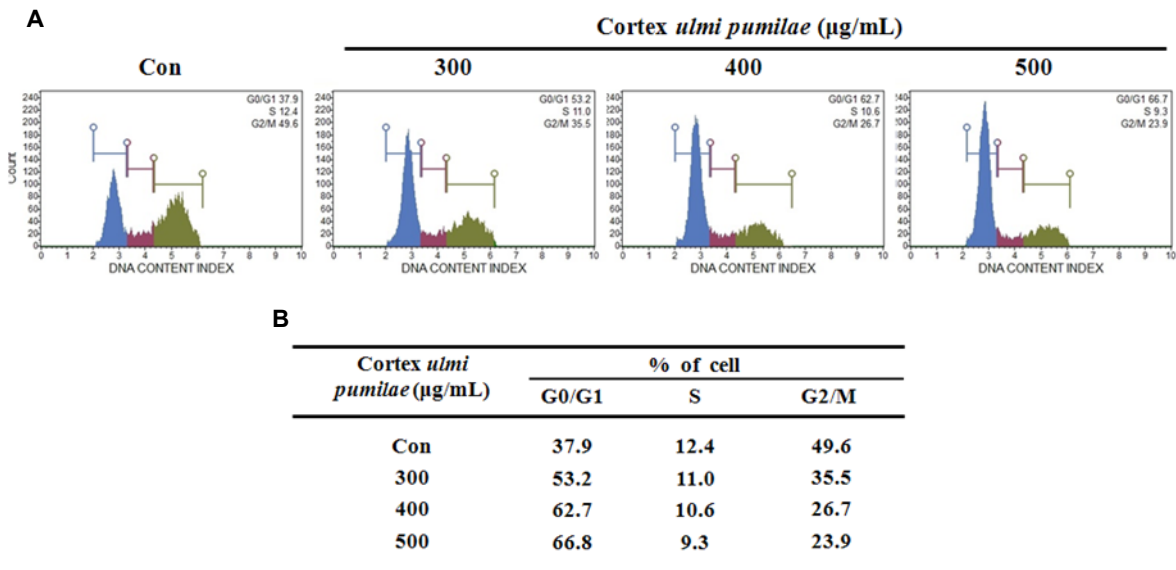


Fig. 6. Induction of G1 arrest by Cortex *ulmi pumilae* extract in differentiation-induced 3T3-L1 cells. Post-confluent cells were treated with dimethylsulfoxide or Cortex *ulmi pumilae* extract in a medium containing adipogenic inducer. Following incubation the cells were harvested, fixed in 70% ethanol, and stained for 30 min with Muse™ Cell Cycle Reagent. After incubation, the stained cells were analyzed by flow cytometer. DNA-fluorescence histogram (A) and quantitative data of cell distribution (B) are shown.

의 G1기 개체군의 비율은 각각 53.2, 62.7, 66.8%로 유근피 추출물 농도의존적으로 증가하였으며, 대조군에서 12.4%인 S기의 개체군의 비율은 11.0, 10.6, 9.3%로 유근피 추출물 농도의존적으로 감소함을 확인하였다. 따라서 유근피 추출물의 처리에 의해 지방세포분화 초기 단계 세포들의 G1 arrest가 유도됨을 확인하였으며, 이러한 결과는 유근피 추출물에 의한 G1 arrest에 의해 지방세포분화 초기의 mitotic clonal expansion 단계에서 일어나는 세포증식이 억제되었음을 시사한다.

세포주기 G1기 관련 단백질의 발현에 미치는 유근피 추출물의 영향

유근피 추출물에 의해 G1 arrest가 유도됨을 확인하였으므로, 세포주기에 관계된 단백질들의 발현 양상을 확인하였다. 세포주기는 G1, S, G2/M기로 나뉘어지며 각 주기마다 checkpoint가 있어 각 checkpoint 관련 단백질들의 활성화/비활성화에 의해 세포주기진행이 조절된다. 특히 G1기에서 S기로의 전이는 Cyclin E/Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) complex의 활성화에 의해 유도되며, 활성화된 Cyclin E/Cdk2 complex에 의해 Rb가 인산화되고 Rb/E2F-1의 complex가 분리되

어 S기의 개시가 이루어진다[25, 30]. 또한 이러한 Cyclin/Cdk complex의 활성화는 Cdk inhibitor인 p21 등에 의하여 비활성화되어 G1/S 전이가 조절된다. 따라서 유근피 추출물에 의한 G1 arrest의 분자기전을 확인하기 위하여 세포주기 중 G1기에서 S기로의 전이에 관련하는 단백질들인 Cdk2, Cyclin E, Rb, phospho-Rb 및 p21의 발현 변화를 검토하였다. 3T3-L1 지방전구세포에 분화유도제인 MDI와 다양한 농도의 유근피 추출물을 동시에 처리하여 2일간 배양한 후, G1/S 전이 관련 단백질의 발현변화를 확인한 결과, 유근피 추출물 농도의존적으로 p21의 발현이 유의적으로 증가하였으며, Cyclin E의 발현은 감소되고 Rb의 인산화 또한 저해되었다(Fig. 7). 반면, Cdk2의 발현량은 큰 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과들로부터 증가된 Cdk inhibitor인 p21이 CyclinE/Cdk2 complex에 결합하여 CyclinE/Cdk2 complex의 활성이 저해되고 따라서, 이후 단계의 Rb의 인산화가 억제되어 S기로의 진행이 저해되고 G1 arrest가 유도되었을 것으로 사료된다. G1/S 전이 관련 단백질의 발현양상의 변화는 유근피 추출물이 지방전구세포의 G1 arrest를 유도하고, 그 결과 세포 증식이 저해되어 mitotic clonal expansion 억제가 유발된다는 것을 시사한다.

이상의 결과에서 유근피 추출물은 지방세포 분화 초기에 작용하여 지방세포의 G1 arrest를 유도하고 C/EBPβ의 발현을 저해하여 지방세포 분화에 필수적인 mitotic clonal expansion 과정을 효율적으로 억제시키고, 이 후의 지방세포 분화 관련 핵심 전사인자인 PPARγ와 C/EBPα의 발현을 저해하는 것을 확인하였으며, 결과적으로 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 억제하여 지방구의 형성을 억제하였다고 사료된다. 현재까지 보고된 바에 따르면, 유근피에 함유된 성분에는 flavonoid계인 catechin 7-O-β-D-apiofuranoside, (+)-catechin, taxifolin 6-C-glucopyranoside과 coumarin계인 fraxin 등이 있으며[16], 이 중 catechin은 여러 연구에서 항산화, 항암, 항균 및 항비만의 효과가 밝혀져 있으므로[17, 19, 20], 본 연구에서 사용한 유근피 추출물이 catechin에 의해 항비만 효과를 나타낸 것일 가능성이 있다. 본 연구는 유근피 추출물의 낮은 세포 독성과 지방세포 분화 억제에 의한 높은 항비만 활성을 과학적으로 규명함으로써 향후 지속적인 연구를 위한 근거자료를 제시하고, 또한 유근피 추출물의 새로운 항비만 활성부 유 천연 소재로의 이용을 가능하게 할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부의 「해조류의 발효 대사산물을 이용한 항비만 소재 및 제품 개발 사업(70011411)」의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

References

1. Bong, J. G. and Park, Y. Y. 2010. Antioxidant Effect of Hederagenin 3-O-b-D-Glucopyranosyl(1→3)-a-L-Rhamnopyranosyl (1→2)-a-L-Arabinopyranoside (HDL) Isolated from Root Bark of Ulmus davidiana. *J Life Sci* **20**, 281-291.
2. Chawla, A., Schwarz, E. J., Dimaculangan, D. D. and Lazar, M. A. 1994. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* **135**, 798-800.
3. Clarkson, R. W., Chen, C. M., Harrison, S., Wells, C., Muscat, G. E. and Waters, M. J. 1995. Early responses of trans-activating factors to growth hormone in preadipocytes: differential regulation of CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and C/EBP delta. *Mol Endocrinol* **9**, 108-120.
4. Cornelius, P. O., MacDougald, A. and Lane, M. D. 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* **14**, 99-129.
5. Darlington, G. J., Rose, S. E. and MacDougald, O. A. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **273**, 30057-30060.
6. Fühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F. J. and Burrell, M. A. 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism

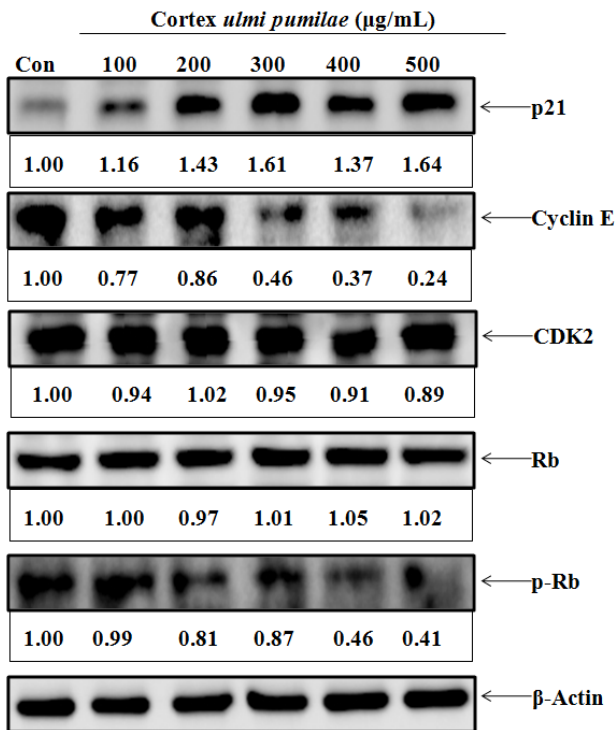


Fig. 7. Modulation of G1/S transition-related protein expression by Cortex *ulmi pumilae* extract in differentiation-induced 3T3-L1 cells. Post-confluent 3T3-L1 preadipocytes were treated with indicated concentration of Cortex *ulmi pumilae* extract in a medium containing adipogenic inducer for 2 days. After incubation, cells were lysed and proteins were subjected to Western blot analysis.

- regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, 827-847.
7. Furuyashiki, T., Nagayasu, H., Aoki, Y., Bessho, H., Hashimoto, T., Kanazawa, K. and Ashida, H. 2004. Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPARgamma2 and C/EBPalpha in 3T3-L1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 2353-2359.
 8. Green, H. and Kehinde, O. 1974. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* **1**, 113-116.
 9. Green, H. and Meuth, M. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-133.
 10. Green, H. and Kehinde, O. 1975. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5**, 19-27.
 11. Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* **78**, 783-809.
 12. Kawaji, A., Nishizuka, M., Osada, S. and Imagawa, M. 2010. TC10-like/TC10 β long regulates adipogenesis by controlling mitotic clonal expansion. *Biol Pharm Bull* **33**, 404-409.
 13. Kim, C. Y., Le, T. T., Chen, C., Cheng, J. X. and Kim, K. H. 2011. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. *J Nutr Biochem* **22**, 910-920.
 14. Kim, M. H. 2004. Updates in treating obesity. *Korean J Health Psychol* **9**, 493-959.
 15. Kim, S. H., Park, H. S., Lee, M. S., Cho, Y. J., Kim, Y. S., Hwang, J. T., Sung, M. J., Kim, M. S. and Kwon, D. Y. 2008. Vitisin A inhibits adipocyte differentiation through cell cycle arrest in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **372**, 108-113.
 16. Kwon, J. H., Kim, S. B., Park, K. H. and Lee, M. W. 2011. Antioxidative and anti-inflammatory effects of phenolic compounds from the roots of *Ulmus macrocarpa*. *Arch Pharm Res* **39**, 1459-1466.
 17. Lee, M. S., Kim, C. T., Kim, I. H. and Kim, Y. H. 2009. Inhibitory effects of green tea catechin on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* **23**, 1088-1091.
 18. Lim, Y. S. 2010. Antioxidant effects of *Ulmus davidiana* extracts on various oil. *Korean J Food Preserv* **17**, 107-116.
 19. Liu, Q., Shin, E. J., Ahn, M. J., Hwang, B. Y. and Lee, M. K. 2011. Anti-adipogenic activity of acer tegmentosum and its constituent, catechin in 3T3-L1 cells. *Nat Prod Sci* **17**, 212-215.
 20. Mochizuki, M. and Hasegawa, N. 2004. Effects of green tea catechin-induced lipolysis on cytosol glycerol content in differentiated 3T3-L1 cells. *Phytother Res* **18**, 945-946.
 21. Na, S. Y. and Myung, S. J. 2012. Obesity and colorectal cancer. *Korean J Gastroenterol* **59**, 16-26.
 22. Popkin, B. M., Adair, L. S. and Ng, S. W. 2012. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev* **70**, 3-21.
 23. Rosen E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J. and Spiegelman, B. M. 2001. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR: a unified pathway. *Genes Dev* **16**, 22-26.
 24. Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A. M., Heyman, R. A., Briggs, M., S., Deeb, Staels, B. and Auwerx, J. 1996. PPAR alpha and PPAR gamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* **15**, 5336-5348.
 25. Sherr, C. J. and Roberts, J. M. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes* **9**, 1149-1163.
 26. Spiegelman, B. M. and Flier, J. S. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* **104**, 531-543.
 27. Tang, Q. Q. and Lane, M. D. 1999. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev* **13**, 2231-2241.
 28. Tang Q. Q., Otto, T. C. and Lane, M. D. 2003. Mitotic clonal expansion : A synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 44-49.
 29. Tang, Q. Q., Otto, T. C. and Lane, M. D. 2003. CCAAT Enhancer-binding protein β is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 850-855.
 30. Tintignac, L. A., Leibovitch, M. P., Kitzmann, M., Fernandez A., Ducommun, B., Meijer, L. and Leibivitch, S. A. 2000. CyclinE-Cdk2 phosphorylation promotes late G1-phase degradation of MyoD in muscle cells. *Exp Cell Res* **259**, 300-307.
 31. Yang, Y., Hyun, J. W., Lim, K. H., Sung, M. S., Kang, S. S., Paek, W. H., Bae, K. W., Cho, H., Kim, H. J. and Woo, E. R. 1996. Antineoplastic effect of extracts from traditional medical plants and various plants (III). *Korean J Pharmacogn* **27**, 105-110.
 32. Yeh, W. C., Cao, Z., Classon, M. and McKnight, S. L. 1995. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* **9**, 168-181.
 33. Yun, J. H., Lee, J. H., Kim, T. H., Lyu, Y. S. and Kang, H. W. 2008. Study on antigastric and anti helicobacter pylori effects from water extract of *Ulmus davidiana* var. Japonica Nakai. *Korean J Orient Physiol Pathol* **22**, 108-114.
 34. Zhang, J. W., Klemm, D. J., Vinson, C. and Lane, M. D. 2004. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer binding protein beta gene during adipogenesis. *J Bio Chem* **279**, 4471-4478.

초록 : 유근피 추출물의 3T3-L1지방전구세포의 분화 억제 효능에 관한 연구정현영¹ · 진수정¹ · 남수완^{1,2} · 현숙경^{1,3} · 김성구⁴ · 김병우^{1,5} · 권현주^{1,5*}¹동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화 지원센터, ²동의대학교 생명공학과, ³동의대학교 식품영양학과, ⁴㈜바이오포트코리아, ⁵동의대학교 생명융합학과)

유근피(*Cortex ulmi pumilae*)는 항산화, 항염증, 항균, 항암 등 다양한 생리활성이 보고되어 있으며, 뛰어난 소염 효과로 예로부터 약재로 사용되어 왔다. 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 유근피 추출물의 지방세포 분화에 미치는 영향과 그 기전을 검토하였다. 유근피 추출물을 분화유도제와 동시에 처리한 결과, 3T3-L1 지방전구세포의 세포질 내 triglyceride 생성을 농도의존적으로 감소시켰으며, 지방세포분화 관련 전사인자인 C/EBP α , C/EBP β 및 PPAR γ 의 발현을 유의적으로 저하시켰다. 다음으로 유근피 추출물을 지방세포 분화 유도 단계별로 처리한 결과, 분화유도제와 동시에 처리한 경우 즉 분화 초기에 처리한 경우가 가장 효과적인 지방세포 분화 억제 효능을 보였으며, 이 때 분화초기에 발현되는 C/EBP β 의 발현량은 현저하게 감소되었다. 또한 유근피 추출물에 의해 mitotic clonal expansion 단계의 세포증식이 농도의존적으로 억제되는 것을 확인하였으며, 세포주기분석을 통해 G1 arrest를 유발함으로써 증식이 억제 된다는 것을 확인하였다. 또한, G1 arrest는 G1/S 전이 관련 단백질인 p21의 발현 증가, cyclin E의 발현 감소 및 Rb의 인산화 감소에 의한 것임을 확인하였다. 이러한 연구결과들로부터 유근피 추출물은 지방세포 분화 초기 단계에 작용하여 지방세포 분화 관련 전사인자의 발현을 억제하고 mitotic clonal expansion을 저해하여, 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 억제하는 항비만 효능을 가지는 천연 소재임을 확인하였으며, 따라서 본 연구는 향후 이를 활용한 지속적인 연구를 위한 기초자료로 그 가치가 매우 높을 것이라 생각된다.