

## 도토리 추출물의 3T3-L1 세포 분화억제 효과

김지연 · 이진\* · 이창원\*\* · †김애정

경기대학교 대체의학대학원, \*경기대학교 대학원 대체의학과, \*\*가톨릭대학교 대학원 생명공학과

### Suppressive Effect of Acorn (*Quercus acutissima* Carr.) Extracts in 3T3-L1 Preadipocytes

Ji-Yeon Kim, Jin Lee\*, Chang-Won Lee\*\* and †Ae-Jung Kim

The Graduate School of Alternative Medicine, Kyonggi University, Seoul 120-837, Korea

\*Dept. of Alternative Medicine, Kyonggi University, Seoul 120-837, Korea

\*\*Dept. of Biotechnology, Catholic University, Gyeonggi 420-743, Korea

#### Abstract

This study aimed to investigate the suppressive effect of acorn extracts, by evaluating 70% ethanol extract (AE) and hot water extract (AW) using 3T3-L1 preadipocytes. We applied various levels (0, 100, 200, 300 and 500 µg/mL) of AE and AW to 3T3-L1 preadipocytes. The cell viability of the 3T3-L1 preadipocytes was not affected by up 300 µg/mL of extracts, but was suppressed by level 500 µg/mL of both AE and AW by 20% and 9% respectively. The accumulation of lipid droplets in differentiated 3T3-L1 preadipocytes was dose-dependently suppressed by AE and AW. Especially, at high concentrations (300 µg/mL), AE (42%) was more effective than AW (41%). Reactive oxygen species (ROS) was also dose-dependently suppressed by treatment with AE (58%) and AW (52%). With regard to the mRNA related to differentiated 3T3-L1 preadipocytes, PPAR-γ and aP2 were suppressed by treatment with AE (54 and 40%) and AW (38 and 18%). From our results, acorn extract (AE) has more suppressive effects than AW in differentiated 3T3-L1 preadipocytes. We therefore concluded that acorn has suppressive effects against obesity in differentiated 3T3-L1 cells due to antioxidation.

Key words: acorn, *Quercus acutissima* Carr, antiobesity, 3T3-L1 preadipocytes

#### 서 론

비만은 당뇨병, 담석증, 고혈압, 고지혈증, 관상동맥성 심장질환과 같은 만성질환의 주요 위험인자(Spiegelman & Flier 1996; Spiegelman & Flier 2000)이다. 따라서 비만인구의 증가는 의료비용의 증가뿐만 아니라, 경제활동 인구의 감소를 일으켜 사회적 손실까지 일으키므로, 비만은 전 세계적인 보건 문제로 대두되어 있다(Willett 등 1999).

비만 치료를 위해 1997년에는 지방 흡수 억제제인 Orlistat가 출시되었고, 2012년에는 Lorcaserin와 Qnexa가 출시되어 비만관리를 위해 사용되어 왔다(You SJ 2008). 이러한 비만 억제제들은 미국 FDA 승인을 받아 그 안전성과 유효성이 검

증되었지만, 장기간 복용 시 어지러움, 불면, 두통 및 변비 등의 부작용이 보고되었다(Kang & Park 2012; Kim & Park 2012; Lee CB 2013). 따라서 최근 부작용이 적으면서 지방 분해를 촉진시키거나, 지방 형성(adipogenesis)을 억제시키는 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Wang & Jones 2004).

도토리는 우리나라 전역에서 자생하는 상수리나무, 떡갈나무 등의 참나무과 열매를 일컬으며, 약 28종이 있다. 우리나라는 조선시대 때 흉년을 대비한 구황작물로 도토리 전분을 이용하여 묵을 제조하여 섭취하였다. 세계 여러 나라에서는 죽이나 떡 등의 식품뿐만 아니라, 의약 및 산업분야에서도 활용되어 왔다(Kim & Lee 1976; Lee 등 2005).

도토리에는 전분이 65~69%, 수분이 6.5~13.7%, 조단백질이

† Corresponding author: Ae-Jung Kim, The Graduate School of Alternative Medicine, Kyonggi University, Seoul, 120-837 Korea. Tel: +82-2-390-5044, Fax: +82-2-390-5078, E-mail: aj5249@naver.com

5.8~7.8%, 조지방이 1.1~5.0%, 조섬유가 2.1~3.6%, 조회분이 1.9~3.4%가 함유되어 있다(Kim BN 1995; Yook 등 2002). 또한 도토리에는 기능성 성분인 tannic acid, gallic acid, digallic acid 및 gallotannin이 포함되어 있어서 항산화 작용, 항균 작용, 항종양 및 증금속 제거작용 등이 있다(Yook 등 2002; Lee 등 2005). 도토리의 기능성 성분 가운데 tannic acid의 혈장 지질농도 저하효과 보고되었는데(Park 등 2002), 도토리에는 tannic acid가 4.6~9.3% 포함되어 있다(Kim BN 1995; Yook 등 2002).

현재 도토리에 대한 연구로는 도토리 추출물이 흰쥐의 체내 항산화 효소계에 미치는 영향(Sung 등 1997), 도토리 가루의 성분분석과 항산화능 평가(Shim 등 2004), 도토리 급여가 치매모델 마우스 뇌조직의 아세틸콜린 및 관련 효소 활성에 미치는 영향(Lee 등 2005), 도토리 분말을 첨가한 쿠키의 항산화 활성 및 품질특성(Joo 등 2013), 밤과 도토리 과육 및 내피가 흰쥐의 지방대사, 항산화능 및 항혈전능에 미치는 영향(Yook 등 2002) 등이 보고되었다. 또한 흰쥐에게 6주간 tannic acid 0.1%를 식이를 통해 섭취시켰을 때 혈장지질농도가 저하되었다는 보고(Park 등 2002) 등이 있으나, 도토리 추출물을 3T3-L1 지방전구세포에 처리하여 항비만 효과를 규명한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 3T3-L1 세포를 이용하여 탈피한 도토리 추출물(에탄올 및 열수)의 항비만 효과를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용한 도토리(*Quercus acutissima* Carr.)는 2013년 9월 경기도 평택시 진위면에서 채취 후 탈피한 도토리를 구입하여 시료로 사용하였다. 열수추출은 도토리의 무게 대비 20배 부피의 증류수를 첨가한 후 환류냉각관을 부착한 80°C의 heating mantle(HM250C, Sergrim Lab Tech, Seoul, Korea)에서 2시간 추출하였고, 에탄올추출은 ethanol 70%를 도토리 무게 대비 20배를 첨가한 후 24시간 동안 상온추출 하였다. 이렇게 2, 3차 추출액을 얻어 모두 혼합한 후 여과하여 rotatory vacuum evaporator(HS-2005S-N, Han Shin Scientific Co., Gyeonggi, Korea)로 용매를 증발시켜 농축액을 Freeze Dryer(FD8508, Shin-biobase, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 동결건조 후 사용하였다.

### 2. 세포배양 및 분화

3T3-L1 세포는 10% FBS(Gibco, NY, USA), 1% penicillin-streptomycin(Gibco, NY, USA)을 첨가한 DMEM 배지(Hyclone, Thermo scientific, Waltham, MA, USA)에서 37°C, 5%로 조절된 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 6-well plate에  $7 \times 10^4$  cells/

mL로 seeding 후 세포가 confluent 하게 증식한 것을 확인 후 2일 후에 DMEM 배지에 1 µg/mL insulin(I9278, Sigma, ST Louis, MO, USA), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(I7018, Sigma, ST Louis, MO, USA), 1 µM dexamethasone(D4902, Sigma, ST. Louis, MO, USA)이 첨가된 분화배지(differentiation medium)를 처리하여 분화를 유도하였다. 2일 후에는 1 µg/mL insulin만 포함된 배지로 교환하고, 2일에 한 번씩 4일 동안 10% FBS가 포함된 새로운 DMEM 배지로 갈아주면서 분화를 유도하였다.

### 3. 세포독성 평가

탈피한 도토리 에탄올 추출물 시료(acorn 70% ethanol extract, AE) 및 열수 추출물 시료(acorn hot water extracts, AW)의 3T3-L1 세포에 대한 세포독성(cytotoxicity) 여부를 조사하기 위해 각 시료를 농도별로 처리한 후 Sladowski D(1992)의 MTT (methylthiazolyl-diphenyl tetrazolium bromide) assay법으로 세포 생존률(cell viability)을 측정하였다. 배양시킨 3T3-L1 지방 전구세포를 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/mL로 분주하여 24시간 동안 배양하고, 이후 새로운 배지에 시료를 농도별로 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 PBS 완충용액에 녹인 MTT(5 mg/mL, Sigma, ST. Louis, MO, USA) 용액을 PBS에 희석하여 각 well에 120 µL씩 처리한 후, 4시간 동안 37°C, 5%로 조절된 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 이후 상등액을 제거하고, dimethyl sulfoxide(DMSO, Junsei, Tokyo, Japan)를 100 µL씩 각 well에 첨가하여 formazan 결정을 용해한 다음, microplate reader(BN 02514, Molecular Devices, Toronto, Canada)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. 총 지질량 측정(Oil red O 염색)

탈피한 도토리 에탄올 추출물 시료(AE) 및 열수 추출물 시료(AW)의 3T3-L1 세포에 대한 분화역제 여부를 조사하기 위해 Oil Red O 염색법을 사용하여 총 지질량을 측정하였다. 3T3-L1 세포를 6-well plate에  $7 \times 10^4$  cells/mL로 분주하고, 시료를 농도별로 처리하면서 분화시킨 세포의 배양액을 제거하고, PBS로 세척하였다. 세포를 고정시키기 위해 4% Paraformaldehyde(P6148, Sigma, ST. Louis, MO, USA)를 200 µL씩 각 well에 넣고, 4°C에서 1시간 동안 고정시켰다. 그 후에 Paraformaldehyde를 제거하고, PBS로 3번 세척한 후 Oil Red O 염색약(O0625, Sigma, USA, Oil Red O 500 mg을 2-propanol 100 mL에 녹인 용액을 증류수와 6:4의 비율로 섞은 후 0.45 µm filter로 여과한 용액)을 500 µL씩 넣고, 상온에서 어두운 상태로 30분간 염색한 후 PBS로 3번 세척하였다. 염색이 된 세포는 현미경으로 관찰하였으며, 관찰 후 well 당 200 µL의 2-propanol(I9516, Sigma, ST. Louis, MO, USA)을 넣어 지방세포

내 염색된 염색약을 추출하여 microplate reader(BN02514, Molecular Devices, Toronto, Canada)를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. Triglyceride 함량 측정

탈피한 도토리 에탄올 추출물 시료(AE) 및 열수 추출물 시료(AW)의 3T3-L1 세포 내 중성지방 축적 억제 여부를 조사하기 위해 triglyceride assay Kit(10010303, Cayman, Michigan, USA)를 사용하여 중성지방 함량을 측정하였다. 3T3-L1 세포를 6-well plate에  $7 \times 10^4$  cells/mL로 분주하고, 8일 동안 세포를 분화시키면서 각각의 샘플을 처리하였다. 8일 동안 샘플 처리 후 PBS로 세척한 후 scraper(90020, SPL, Pocheon, Korea)를 이용하여 세포를 모아 초음파 분쇄기(Sonifier 450 sonicator, Branson, USA)를 이용하여 세포 내 중성지방을 추출하였다.

원심분리(12,000 rpm, 15분, 4°C, Micro 200R, Hettich, Germany)하여 중성지방이 포함된 상층액 회수 후 triglyceride kit를 이용하여 중성지방의 함량을 측정하였다.

### 6. 세포내 ROS 생성량 측정

탈피한 도토리 에탄올 추출물 시료(AE) 및 열수 추출물 시료(AW)의 3T3-L1 세포 내의 ROS 억제 효과는 형광을 발산하는 DCF-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 사용하여 모니터링하였다. DCF-DA는 Sigma(ST. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 3T3-L1 세포를 96-well plated에  $2 \times 10^5$  cells/well로 분주하고, DCF-DA를 세포에 첨가하여 45분 동안 37°C에서 배양하였다. 세포는 PBS로 두 번 세척하고, 2,7-dichlorofluorescein diacetate fluorometric을 Ex=495 nm/527 nm에서 측정하였다.

### 7. RT-PCR에 의한 mRNA 발현 측정

탈피한 도토리 에탄올 추출물 및 열수 추출물 시료의 total RNA 추출을 위해 3T3-L1 세포를 6-well plate에  $7 \times 10^4$  cells/mL로 분주하고 분화시키면서 도토리 추출물을 농도별로 처리하였다. 8일 후 PBS로 세척 후 Trizol(15596-026, Life technologies, USA)을 0.5 mL씩 처리한 후 세포를 eppendorf tube에 옮겼다. Chloroform(C2432, Sigma, ST. Louis, MO, USA)을 Trizol 0.5 mL당 100 µL씩 넣고 섞은 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리(Micro 200R, Hettich, Tuttingen, Germany)하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액과 total RNA Extraction Kit(17221, Intron biotechnology, Sungnam, Korea)를 이용하여 total RNA를 추출하였다.

PowerWave™ XS Microplate Spectrophotometer(13030715, VT, Virginia, USA)를 이용하여 total RNA를 정량한 후, DEPC water(95284, Sigma, ST. Louis, MO, USA)와 혼합하여 RNA

**Table 1. Primer sequences of the investigated genes in a RT-PCR analysis**

| Gene                 | Primer sequence(5' to 3')  |
|----------------------|--|
| β-actin              | F 5'-AGGTATCCTGACCCTGAAGTACC-3'<br>R 5'-GTTGCCAATAGTGATGACCTGGC-3' |
| PPAR-γ <sup>1)</sup> | F 5'-GTCTGTGGGGATAAAGCATC-3'<br>R 5'-CTGATGGCATTGTGAGACAT-3'       |
| aP2 <sup>2)</sup>    | F 5'-CCTGGAAGACAGCTCCTCCTC-3'<br>R 5'-ATCCAGGCCTCTCTTTGGCTC-3'     |

<sup>1)</sup> PPAR-γ: peroxisome proliferator-activated receptors γ

<sup>2)</sup> aP2: adipocyte protein 2

의 최종 농도는 1 µg, 최종 volume은 10 µL가 되도록 제조하였다. 이후, High capacity cDNA Reverse Transcription Kit(4368814, Applied Biosystems, CT, USA) 10 µL와 혼합하여 25°C 10분, 37°C 120분, 85°C 5분, 4°C에서 5분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

배양한 세포의 mRNA를 추출한 후 지방전구세포의 분화 과정 중 발현 marker로 알려져 있는 peroxisome proliferator-activated receptor-γ(PPAR-γ), adipocyte protein 2(aP2) 유전자의 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인하였다. RT-PCR을 위해 사용된 primers sequences와 PCR 조건은 Table 1과 같았으며, 이를 통해 얻어진 PCR 산물을 이용해 2% agarose gel 상에서 전기영동(Mupid-2 plus, Takara, Japan) 후 화상분석기(Kodak Image Station 4000 MM, NY, USA)를 이용하여 분석 정량하였다.

### 8. 통계 처리

본 연구 자료의 통계분석은 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, IL, USA, ver. 12.0)를 이용하여 분석하였다. 평균과 표준편차로 산출하여 표시하였으며, 통계적 유의성 검정은 대조군(con)과 탈피한 도토리 에탄올 추출물 및 열수 추출물 시료의 농도별 처리군(100, 200, 300 및 500 µg/mL)의 변수에 대해  $p < 0.05$  수준에서 Student's *t*-test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

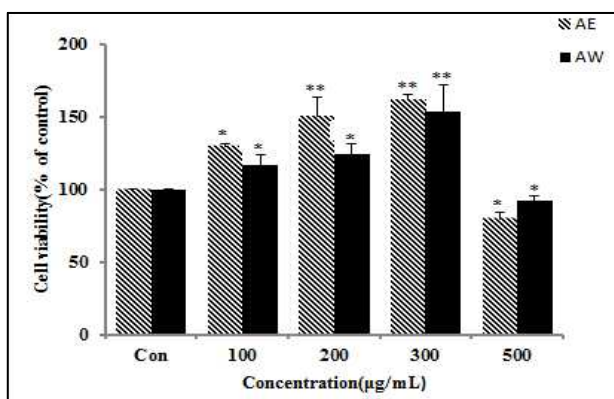
### 1. 도토리 추출물에 의한 세포독성 평가

3T3-L1 세포는 비만과 같은 대사증후군에 대한 연구에 이용되는 세포주 가운데 하나이다(Shin 등 2012). 3T3-L1 세포가 지방세포로 분화될 때 CCAAT(cytidinecytidine-adenosine-adenosine-thymidine)/enhancer binding protein의 종류인 C/EBPβ, C/EBPδ가 insulin, dexamethasone(DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)와 같은 호르몬 자극으로부터 초기 분화가 시작된다.

이러한 호르몬들은 상호적으로 또는 단독으로 peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ) 및 C/EBP $\alpha$ 의 발현을 조절하게 된다. C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 는 지방분화 초기에 발현이 유도되어 분화 후기가 되면 aP2 발현을 유도하여, 분화된 유전 인자의 양을 현저하게 증가시키게 된다. 그러므로 이러한 지방세포 분화 유전 인자의 발현 조절은 지방생성기전을 조절할 수 있는 중요한 방법이 된다(Park 등 2014). 그러므로 본 연구에서는 탈피한 도토리 에탄올 추출물(AE)과 열수 추출물(AW) 시료의 세포독성(cytotoxicity)을 확인하기 위해 3T3-L1 지방전구세포를 사용하였다.

세포 생존율을 측정하기 위해 AE와 AW 시료를 각각 농도별(0, 100, 200, 300 및 500  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리한 후 생존율을 측정하여 Fig. 1에 제시하였다. AE 시료를 0, 100, 200, 300 및 500  $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 결과, 대조군(0  $\mu\text{g/mL}$ )과 비교 시 100  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 129%의 생존율( $p<0.05$ ), 200  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 150%의 생존율( $p<0.01$ ), 300  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 161%의 생존율을 보인 반면( $p<0.01$ ), 500  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 80%의 생존율을 보였다( $p<0.05$ ). 즉, 생존율이 AE 시료 300  $\mu\text{g/mL}$  농도까지 처치 시 증가하다 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 감소되는 결과를 보였다.

AW 시료를 0, 100, 200, 300 및 500  $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 결과, 대조군(0  $\mu\text{g/mL}$ )과 비교 시 100  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 120%의 생존율( $p<0.05$ ), 200  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 126%의 생존율( $p<0.05$ ), 300  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 144%의 생존율을 보인 반면( $p<0.01$ ), 500  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 91%의 생존율을 보였다( $p<0.05$ ). AE



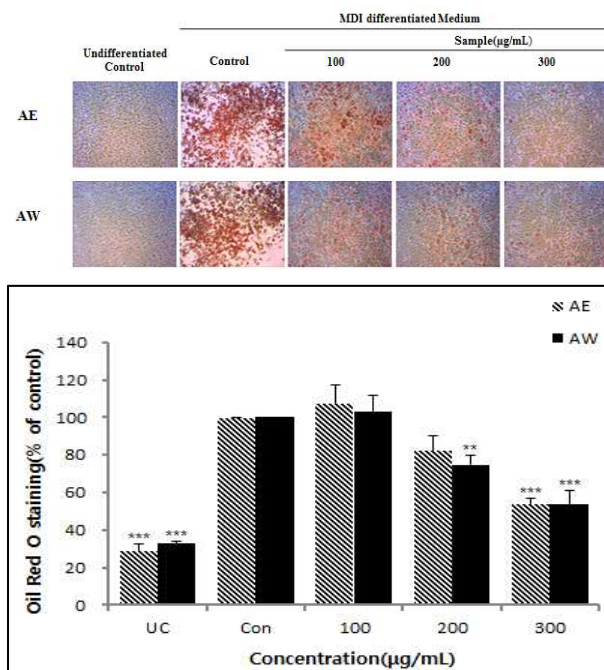
**Fig. 1. Effect of acorn extracts (hot water and ethanol) on the cell viability of 3T3-L1 cells.** The viability of 3T3-L1 preadipocyte cells after treatment with acorn at various concentration. Viability was determined by MTT assay. Cells were pre-treated with 0~500  $\mu\text{g/mL}$  of acorn for 24 h. The data are the means $\pm$ S.D. ( $n=3$ ). Significantly different compared to control (Con) at as determined by student  $t$ -test (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ). AE, acorn 70% EtOH extracts; AW, acorn water extracts; Con, undifferentiated control cells.

시료와 마찬가지로 AW 시료 300  $\mu\text{g/mL}$  농도까지 처치 시는 증가하다 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 감소되는 결과를 보였다. 즉, AE와 AW 시료 모두 300  $\mu\text{g/mL}$  농도까지는 생존율이 증가하다가 500  $\mu\text{g/mL}$  농도까지는 세포독성이 없는 것으로 나타났다.

## 2. 도토리 추출물에 의한 총 지질 축적 억제 효과

본 연구에서는 도토리 에탄올 추출물(AE)과 열수 추출물(AW) 시료의 3T3-L1 세포의 분화 억제 효과를 알아보고자 총 지질 축적량을 측정하여 Fig. 2에 제시하였다. 도토리 추출물시료의 세포의 생존율 실험결과를 토대로 AE 시료를 100, 200 및 300  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였다. 대조군(0  $\mu\text{g/mL}$ )과 비교 시 100  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 총 지질 축적량이 107% 수준으로 7%의 증가를 보이다, 200  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 82% 수준으로 18%의 감소를 보이다가, 300  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 53%의 수준으로 47%의 감소를 보였다( $p<0.001$ ).

AW 시료를 100, 200 및 300  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 결과,



**Fig. 2. Effect of acorn extracts (hot water and ethanol) on the lipid accumulation in differentiation of 3T3-L1 cells.** The levels of intracellular lipids was quantified by Oil Red O staining. Data are expressed as means $\pm$ S.D. ( $n=3$ ). Values with different superscript letters are significantly different as determined by student  $t$ -test. Significantly different compared to control (Con) at as determined by student  $t$ -test (\*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ ). AE, acorn 70% EtOH extracts; AW, acorn water extracts; UC, undifferentiated cells; Con, differentiated control cells.

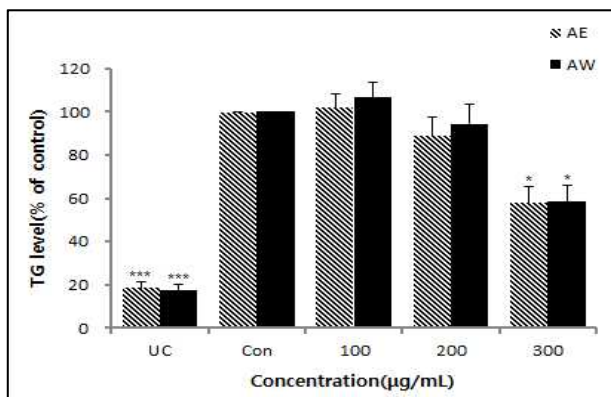
대조군(0  $\mu\text{g/mL}$ )과 비교 시 100  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 총 지질 축적량이 103%의 수준으로 3% 증가를 보이다가 200  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 74%의 수준으로 26%의 감소를 보였으며( $p<0.01$ ), 300  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 53% 수준으로 47%의 총 지질감소를 보였다( $p<0.001$ ). 고농도(300  $\mu\text{g/mL}$ )에서는 AE와 AW 시료간의 총 지질 축적 억제에 차이가 없었으나, 저농도(100, 200  $\mu\text{g/mL}$ )에서는 AW가 AE에 비해 총 지질 축적을 억제하는 효과가 더 좋은 것으로 나타났다.

Yook 등(2002)은 밤과 도토리의 과육 및 내피 분말을 흰쥐에게 4주간 식이로 섭취시킨 결과, 혈장 내 총 지질수준은 밤보다 도토리의 시료를 섭취한 군에서 더욱 감소 효과를 보였다고 보고하였다. 또한 도토리 분말 함유 수준이 증가할수록 혈장 내 지질수준이 효과적으로 감소되었다고 보고하여 본 연구결과와 일치하였다.

### 3. 도토리 추출물에 의한 중성지방 축적 억제 효과

체내에서 중성지방은 포도당과 함께 세포의 중요한 에너지원으로 사용된다. 여분의 중성지방은 지방세포에 흡수되고 저장되어 축적된 지방구는 비만의 원인으로 작용하여 다양한 만성질환의 원인이 된다(Labreuche 등 2009).

따라서 본 연구에서는 분화된 3T3-L1 세포 내에서 도토리 추출물(AE와 AW)의 중성지방 생성 억제 효과를 측정하여 Fig. 3에 제시하였다. AE 시료를 100, 200 및 300  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 결과, 대조군(0  $\mu\text{g/mL}$ )과 비교 시 100  $\mu\text{g/mL}$  처리



**Fig. 3. Effect of acorn extracts (hot water and ethanol) on the triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells.** Intracellular triglyceride was quantified by triglyceride kit. Data are expressed as means $\pm$ S.D. ( $n=3$ ). Values with different superscript letters are significantly different as determined by student  $t$ -test. Significantly different compared to control (Con) at as determined by student  $t$ -test ( $*p<0.05$ ,  $***p<0.001$ ). AE, acorn 70% EtOH extract; AW, acorn water extract powder; UC, undifferentiated cells; Con, differentiated control cells.

시에는 분화된 3T3-L1 세포 내 중성지방 생성량이 1%의 증가율을 보였으나, 200  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 11%의 감소율을 보였고, 300  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 42%의 감소율을 보였다( $p<0.05$ ). AW 시료를 100, 200 및 300  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였을 때, 대조군(0  $\mu\text{g/mL}$ )과 비교 시 100  $\mu\text{g/mL}$  처리에는 6%의 증가율을 보였으나, 200  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 5%의 감소율을 보였고, 300  $\mu\text{g/mL}$  처리 시에는 41%의 감소율을 보였다( $p<0.05$ ).

분화된 3T3-L1 세포에서 AE와 AW 시료간의 중성지방 축적 억제 효과를 비교해 보면, 200  $\mu\text{g/mL}$ 와 300  $\mu\text{g/mL}$  농도 처리 시 AE가 AW에 비해 더 효과적으로 중성지방 축적을 억제한 것으로 나타났다. Kim 등(2015)은 80% EtOH 팔 추출물(1 mg/mL 및 2 mg/mL)을 3T3-L1 세포에 처리하여 중성지방 축적 억제 효과를 측정한 결과, 농도 의존적으로 중성지방이 감소되었다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다.

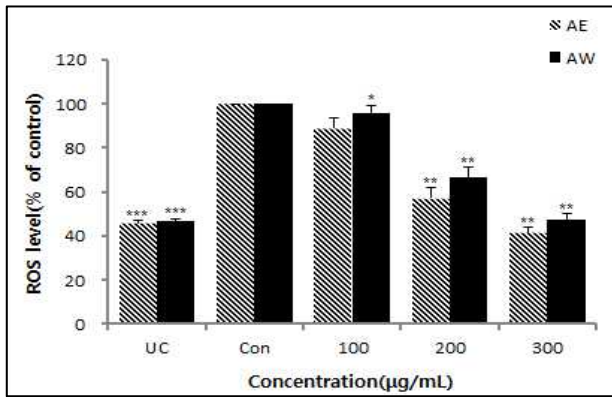
### 4. 도토리 추출물에 의한 세포내 ROS 생성 억제 효과

지방세포로부터 과도하게 생성된 ROS(Reactive oxygen species)는 세포내 산화적 스트레스를 증가시키게 되고, 세포 또는 조직의 손상뿐만 아니라, 염증, 노화 관련 변성, 종양의 생성 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 즉, ROS의 과다한 생성에 대한 세포내의 적절한 방어 기전에 문제가 생길 경우, 이것이 당뇨병을 포함한 여러 질환에 직, 간접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다(Sekiya 등 2008; Adachi 등 2009; Lee 등 2009; Parveen 등 2010). 또한, 지방세포에서 발생된 세포내 ROS가 분화과정에서의 mitotic clonal expansion을 증가시켜 지방세포의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Lee 등 2004).

따라서 본 연구에서는 도토리 추출물(AE와 AW)의 3T3-L1 지방세포에서 ROS 생성 억제 효과를 측정하여 Fig. 4에 제시하였다. 분화된 3T3-L1 세포에 AE 시료를 100, 200 및 300  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 결과, 대조군(0  $\mu\text{g/mL}$ )과 비교 시 100  $\mu\text{g/mL}$  처리 시 10%의 억제율, 200  $\mu\text{g/mL}$  처리 시 42%의 억제율( $p<0.01$ ), 300  $\mu\text{g/mL}$  처리 시 58%의 억제율을 보였다( $p<0.01$ ). AW 시료를 100, 200 및 300  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 결과, 대조군(0  $\mu\text{g/mL}$ )과 비교 시 100  $\mu\text{g/mL}$  처리 시 4%의 억제율, 200  $\mu\text{g/mL}$  처리 시 33%의 억제율( $p<0.01$ ), 300  $\mu\text{g/mL}$  처리 시 52%의 억제율을 보였다( $p<0.01$ ). 분화된 3T3-L1 세포에서 AE와 AW 시료간의 ROS 생성 억제 효과를 비교해 보면, 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$ 와 300  $\mu\text{g/mL}$  농도 처리 시 AE가 AW에 비해 더 효과적으로 ROS 생성을 억제한 것으로 나타났다.

지방세포 내 ROS 생성 억제는 관련효소의 발현 감소에 의한 것이라고 보고된 바 있다(Lee 등 2012; Seo 등 2013). 따라서 추후 탐미한 도토리 추출물의 항산화 효소의 발현 양상을 확인하는 기전연구가 필요할 것으로 사료된다.



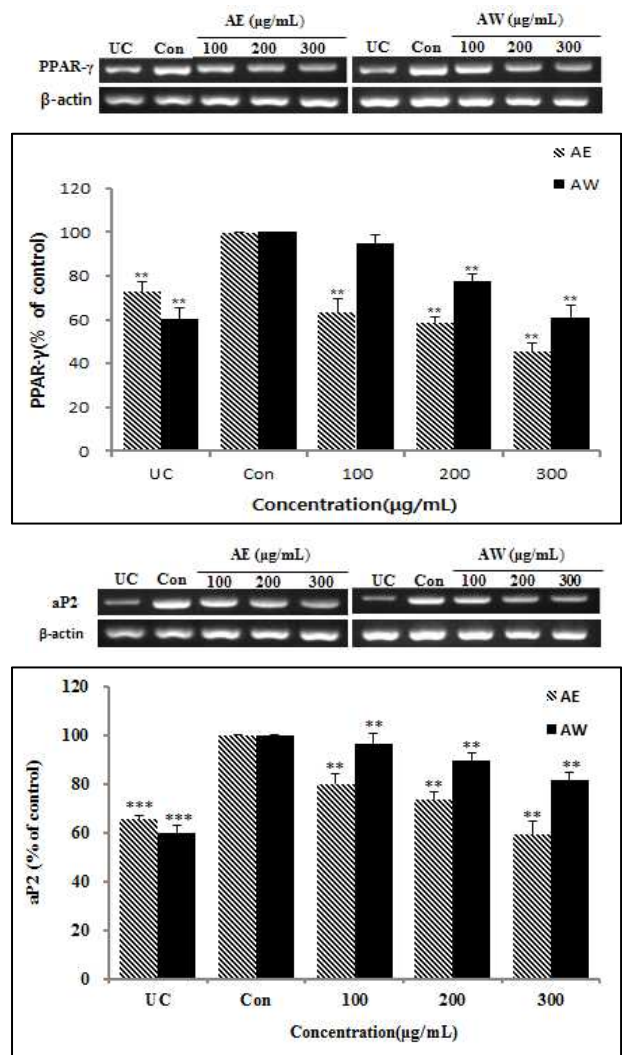


**Fig. 4. Effect of acorn extracts (hot water and ethanol) on ROS suppressive effect in differentiation of 3T3-L1 cells.** ROS production during differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes. Dark-blue formazan (ROS production) was dissolved and the absorbance was determined at 570 nm. Data are expressed as means±S.D. (n=3). Values with different superscript letters are significantly different as determined by student *t*-test. Significantly different compared to control (Con) at as determined by student *t*-test (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001). AE, acorn 70% EtOH extracts; AW, acorn water extracts; UC, undifferentiated cells; Con, differentiated control cells.

**5. 도토리 추출물에 의한 RT-PCR에 의한 mRNA 발현 억제 효과**

Preadipocyte는 insulin, dexamethasone(DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX)의 유도인자를 필요로 하며, PPAR $\gamma$ 는 지방세포분화의 핵심적인 기능을 담당하고 있다(Rosen 등 1999). PPAR $\gamma$ 는 sterol regulatory element-binding proteins-1c (SREBP-1c) 전사인자에 의해 조절되며, 섭취된 잉여 에너지 원으로부터 중성지방의 합성을 촉진하여 지방과 간 조직에 저장한다(Fajas 등 1999). aP2는 fatty acid binding protein 4로 알려져 있으며, adipocyte에서 fatty acid trafficking에 관여하여 비만을 증가시키고, macrophage에서 염증반응과 foam cell 형성 및 cholesterol의 방출을 조절하는 것으로 알려져 있다(Furuhashi 등 2007). 지방생성 및 비만관련 대사질환의 효과적인 예방을 위해서 이들 유전자의 제어가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 3T3-L1 세포의 분화과정 중 AW와 AE 시료의 처리 시 mRNA 발현에 미치는 억제 효과를 알아 보고자 도토리 추출물의 PPAR- $\gamma$ 와 aP2 유전자 발현 억제 효과를 측정하여 Fig. 5에 제시하였다. AE 시료를 100, 200 및 300 µg/mL로 처리했을 때 대조군(0 µg/mL)과 비교 시 100 µg/mL 처리 시 36%의 억제율(*p*<0.01), 200 µg/mL 처리 시 41%의 억제율(*p*<0.01), 300 µg/mL 처리 시 54%의 억제율을 보였



**Fig. 5. Effect of acorn (hot water and ethanol) on the expression of PPAR- $\gamma$  and aP2 mRNA expression in differentiation of 3T3-L1 cells.** Cells were cultured for 8 days with acorn extract at 0, 100, 200 and 300 µg/mL. Results are given as the mean± standard deviation of three replicates. The means without a common letter differ significantly. AE, acorn 70% EtOH extracts; AW, acorn water extracts; UC, undifferentiated cells; Con, differentiated control cells. (A)peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ ), (B)adipocyte protein 2 (aP2). Significantly different compared to control (Con) at as determined by student *t*-test (\*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001).

다(*p*<0.01). AW 시료 100, 200 및 300 µg/mL로 처리한 결과, 대조군(0 µg/mL)과 비교 시 100 µg/mL 처리 시에는 5%의 억제율, 200 µg/mL 처리 시에는 22%의 억제율(*p*<0.01), 300 µg/mL 처리 시에는 38%의 억제율을 보였다(*p*<0.01). 도토리 추

출물의 aP2 유전자 발현 억제 효과를 알아본 결과, AE 시료를 100, 200 및 300 µg/mL 농도로 처리했을 때 대조군과 비교 시 100 µg/mL 처리 시 20%의 억제율( $p < 0.01$ ), 200 µg/mL 처리 시 26%의 억제율( $p < 0.01$ ), 300 µg/mL 처리 시 40%의 억제율을 보였다( $p < 0.01$ ). AW 시료를 처리한 결과, 100 µg/mL 처리 시 3%의 억제율( $p < 0.01$ ), 200 µg/mL 처리 시 10%의 억제율( $p < 0.01$ ), 300 µg/mL 처리 시 18%의 억제율을 보였다( $p < 0.01$ ). 이러한 결과로 미루어 보아 탈피한 도토리 추출물 처리로 1차적으로 PPAR- $\gamma$  발현이 감소되었고, 그 결과로 aP2의 발현 감소를 일으켜, 결과적으로 3T3-L1 세포 내 지질축적 저해 효과를 나타낸 것으로 보여진다. Kim 등(2015)은 80% EtOH 팔 추출물(1 mg/mL)을 처리하였을 때 PPAR- $\gamma$ 의 mRNA 수준은 96.87%로 현저하게 감소되었다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다.

## 요 약

본 연구에서는 만성질환의 주요 위험인자인 비만을 예방하기 위한 식품소재로서 3T3-L1세포를 이용하여 탈피한 도토리의 항비만 효과를 알아보고자 하였다. 3T3-L1 세포에서 생존율(MTT assay)을 측정된 결과, AE와 AW 시료 모두 500 µg/mL 농도에서는 다소 생존율의 감소를 보여, 300 µg/mL를 최종 농도로 정하였다. 3T3-L1 세포의 지질축적 억제 효과를 측정된 결과, 농도 100 µg/mL로 처리하였을 때 두 시료 모두 지질축적량의 증가를 보였으나, 200 µg/mL 처리농도에서 AE 시료는 82%로, AW 시료는 74%로 감소되다가 300 µg/mL 농도에서는 두 시료 모두 약 53% 수준까지 지질축적이 억제되었다. 3T3-L1 세포에서 중성지방 억제 효과를 확인한 결과, AE 시료의 경우 200 µg/mL 농도에서 11%의 감소율, 300 µg/mL 농도에서 42% 수준의 감소율을 보였다. AW 시료도 200 µg/mL 농도에서 5%의 감소율과 300 µg/mL에서 41%의 감소율을 보였다. 3T3-L1 세포의 ROS 생성량을 측정된 결과, 시료 농도 200 µg/mL에서 AE는 42%, AW는 33%로 300 µg/mL에서는 AE는 58%, AW는 52%로 ROS 생성량의 억제를 보였다. 3T3-L1 세포에서 mRNA 발현에 미치는 영향을 대조군과 비교하였을 때 두 시료(AE와 AW) 모두 300 µg/mL 농도에서 PPAR- $\gamma$ 은 54%와 38%, aP2는 40%와 18% 수준의 발현을 억제시키는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 탈피한 도토리는 3T3-L1 세포의 분화를 억제함으로써 새로운 항비만 소재로의 가능성이 있는 것으로 판단된다.

## References

Adachi T, Toishi T, Wu H, Kamiya T, Hara H. 2009. Expression

of extra cellular superoxide dismutase during adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *Redox Rep* 14:34-40

Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J. 1999. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: Implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* 19:5495-5503

Furuhashi M, Tuncman G, Grgn CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, Kono K, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Sulsky R, Robl JA, Parker RA, Hotamisligil GS. 2007. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447:959-965

Joo SY, Kim OS, Jeon HK, Choi HY. 2013. Antioxidant activity and quality characteristics of cookies prepared with acorn (*Quercus species*) powder. *Korean J Food Cookery Sci* 29: 177-184

Kang JG, Park CY. 2012. Anti-obesity drugs: A review about their effects and safety. *Diabetes Metab J* 36:13-25

Kim BN. 1995. A study of the literature review of acorn in Korea. *J Korean Soc Food Sci* 11:158-163

Kim JO, Lee MJ. 1976. Studies on some physico-chemical properties of the acorn starch. *J Korean Food Sci Technol* 8: 230-235

Kim KS, Park SW. 2012. Therapy for obesity. *Korean J Obes* 21:197-202

Kim M, Park JE, Song SB, Cha YS. 2015. Effects of black adzuki bean (*Vigna angularis*) extract on proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes. *Nutrients* 7:277-292

Labreuche J, Touboul PJ, Amarencu P. 2009. Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review of the epidemiological studies. *Atherosclerosis* 203:331-345

Lee CB. 2013. Weight loss drugs recently approved by the FDA. *J Korean Diabetes* 14:58-62

Lee KS, Kim MG, Lee KY. 2004. Anti microbial effect of the extracts of cactus chounnyouncho (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33:1268-1272

Lee OH, Kwon YI, Hong HD, Park CS, Lee BY, Kim YC. 2009. Production of reactive oxygen species and changes in antioxidant enzyme activities during differentiation of 3T3-L1

- adipocyte. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 52:70-75
- Lee OH, Seo MJ, Choi HS, Lee BY. 2012. Pycnogenolinhibits lipidaccumulation in 3T3-L1 adipocytes with the modulation of reactiveoxygen species (ROS) production associated with antioxidantenzyme responses. *Phytother* 26:403-411
- Lee SH, Kim DI, Cho SY, Jung HJ, Cho SM, Park HJ, Hyun SL. 2005. Effects of acorn (*Quercus acutissima* CARR.) supplementation on the level of acetylcholine and its related enzyme activities in the brain of dementia mouse model. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34:738-742
- Park JA, Jin KS, Kwon HJ, Kim BW. 2014 The anti-obesity effect of smilax China extract. *Korean J Microbiol Biotechnol* 42:354-360
- Park JA, Pack Cheol, Han MH, Kim BW, Chung YH, Choi YH. 2011. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by aged black garlic extracts in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Life Science* 21:720-728
- Park SY, Bok SH, Jeona SM, Park YB, Lee SJ, Jeong TS, Choi MS. 2002. Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. *Nutrition Research* 22:283-295
- Parveen K, Khan MR, Mujee BM, Siddiqui WA. 2010. Protective effects of pycnogenolon hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats. *Chem Bio Interact* 186:219-227
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. 1999. PAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell* 4:611-617
- Sekiya M, Hiraishi A, Touyama M, Sakamoto K. 2008. Oxidativestress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 375:602-607
- Seo MJ, Choi HS, Lee OH, Lee BY. 2013. Grateloupia lanceolata (Okamura) Kawaguchi, the edible red seaweed, inhibits lipidaccumulation and reactive oxygen species production during differentiationin 3T3-L1 cells. *Phytother* 27:655-663
- Shim TH, Jin YS, Sa JH, Shin IC, Heo SI, Wang MH. 2004. Studies for component analysis and antioxidative evaluation in acorn powders. *J Korean Food Sci Techno* 36:800-803
- Shin OS, Shin YH, Lee KH, Kim GY, Kim KH, Park JK, Ahn JI, Song KY. 2012. Inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes with ethanol extracts of *Saururus chinensis*. *KSBB Journal* 27: 381-386
- Sladowski D. 1992. An improved MIT assay. *J Immunol Methods* 157:203-207
- Spiegelman BM, Flier JS. 1996. Adipogenesis and obesity: Rounding out the big picture. *Cell* 187:377-389
- Spigelman BM, Flier JS. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543
- Sung IS, Park EM, Lee MK, Han EK, Jang JY, Cho SY. 1997. Effect of acorn extracts on the antioxidative enzyme system. *J Korean Food Sci Nutr* 26:494-500
- Wang TW, Jones PJ. 2004. Conjugated linoleic acid and obesity control: Efficacy and mechanisms. *J Obes Relat Metab Disord* 28:941-955
- Willett WC, Dietz HW, Colditz GA. 1999. Guidelines for healthy weight. *N Engl J Med* 342:427-433
- Yook GJ, Lee HJ, Kim MK. 2002. Effect of chestnut and acorn on lipidmetabolism, antioxidative capacity and anti-thrombotic capacity in rats. *Korean J Nutr* 35:171-182
- You SJ. 2008. Pharmacological treatment of obesity. *J Korean Endocr Soc* 23:223-233

---

Received 22 June, 2015

Revised 4 August, 2015

Accepted 17 August, 2015