

국내자생식물 메탄올추출물의 Wnt/ β -catenin 신호전달체계에 대한 효과

김보라¹, 김현수^{2*}

¹(주)엘리드, ²중원대학교 식품공학과

Effect on Wnt/ β -catenin Pathway of Methanol Extracts from Native Plants in Korea

Bora Kim¹ and Hyun-Soo Kim^{2*}

¹Skin & Bio Research, Ellead Co., Ltd., Seongnam 13590, Korea

²Department of Food Science and Technology, Jungwon University, Goesan 28024, Korea

Abstract - The Wnt/ β -catenin signaling pathway is mandatory in adipogenesis. In this study, we investigated the applicability of functional materials for the treatment of obesity by examining Wnt/ β -catenin pathway reporter activity related to adipocyte differentiation inhibiting with Korean native plant extracts. The luciferase activity of HEK 293-TOP cells increased the reporter activity approximately 152% and 130% by treatment with *Sanguisorba officinalis* and *Thuja orientalis*, respectively. *Ricinus communis* were represented about 90% higher activity, two samples (*Rosa rugosa* and *Sophorae Flos*) showed 80% higher activity than the control. Three samples of plant extracts (*Zanthoxylum piperitum*, *Pueraria thunbergiana*, *Solanum nigrum*) were about 70% higher activity compared with the non-treated control. Cytotoxicity of plant extracts was not detected in the rat neural stem cells. These results suggest that the selected eight plant extracts are safe compounds. Our findings indicate that Wnt/ β -catenin pathway reporter activity could be used for high throughput screening system. In addition, the plant extracts selected as candidates for adipocyte differentiation inhibiting may be potential therapeutic agents for obesity, it will be exploring the possibility of developing an anti-obesity materials through further experiments with selected plant extracts.

Key words - Wnt/ β -catenin pathway, Adipocyte differentiation, Plant extract

서 언

지방세포는 몸 전체의 에너지 대사에 있어 에너지를 저장 혹은 방출하는데 중요한 역할을 하는 세포로서 과도한 에너지의 저장이 유발된 경우 비만과 당뇨, 아테롬성 동맥경화증(atherosclerosis) 등과 같은 질병의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(Fr Beck *et al.*, 2001). 특히, 비만은 전 세계 국가들이 겪고 있는 심각한 건강 문제로 비만 인구는 오는 2025년에 이르면 3억명 이상 될 것으로 예측하고 있으며 국내 비만 인구도 갈수록 급증하고 있는 추세이다. 국내외적으로 비만치료와

관련한 많은 연구가 진행되고 있지만 아직까지 그 효과가 미미하며 두통, 변비, 설사 등의 다양한 부작용이 보고되고 있어, 안정하게 치료효과를 증대시킬 수 있는 천연소재의 개발이 필요하다. 최근 들어 Wnt/ β -catenin 신호전달계가 지방세포의 분화 억제에 관여한다는 것이 알려져 있으며(Kennell and MacDougald, 2005; Liu and Farmer, 2004; Prestwich and MacDougald, 2007), 지방세포 분화에 관여하는 유전자의 발현이 Wnt/ β -catenin 신호전달계의 활성화에 의하여 저해된다는 것이 밝혀졌다(Arango *et al.*, 2005; Bennett *et al.*, 2004). 본 저자도 여귀(*Persicaria hydropiper*) 추출물이 Wnt/ β -catenin 신호전달계를 활성화 시켜서 항비만 효과가 있다고 보고하였다(Lee *et al.*, 2011). 이와 같이 항비만 효과를 위한 지방세포 분화억제 관련 연구들이 있음에도 불구하고 Wnt/

*교신저자: hyun1006@jwu.ac.kr

Tel. +82-43-830-8679

β -catenin 신호전달계를 타겟으로 하는 천연소재 약물의 스크리닝에 대해서는 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 국내 자생식물 추출물중 비만관련 특허가 없는 식물원료를 대상으로 Wnt/ β -catenin 신호전달계 조절에 관여하는 전사인자(transcription factor 4, Tcf4) (Sirakov *et al.*, 2012)반응을 루시페라제(luciferase)리포터 시스템을 이용하여 지방세포의 분화억제 효과를 탐색함으로써 기능성 소재를 확보하기 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

지방세포 분화 억제 활성 스크리닝을 위한 실험은 한국식물추출물은행에서 분양받은 국내 자생식물 추출물 총 3,625종중 비만관련 특허가 없는 186종을 대상으로 실시하였다. 추출조건은 각 식물시료를 각 부위별로 정선, 세척 및 분쇄하여 100% 메탄올을 첨가하고 용매추출장치(ASE300 Accelerated Solvent Extractor, Dionex Corporation, USA)를 이용하여 50°C, 1500 psi에서 20분 동안 추출하였다(Ahn *et al.*, 2015). 이후 건조기(Modul spin 40, Biotron Corporation, Canada)에서 40°C에서 24시간 동안 건조 후 냉동보관 하였으며 10% Dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 녹여 0.22 mm (Merck millipore, France)로 필터 후 멸균 증류수로 농도별 희석하여 실험하였다.

Wnt/ β -catenin 신호전달 활성측정

Wnt/ β -catenin 신호전달계 조절을 확인할 수 있는 Tcf4 response element-luciferase plasmid (pTOPFlash reporter 유전자)(Sirakov *et al.*, 2012)를 염색체내에 가진 HEK 293 cell line (HEK-TOP flash cell line)을 구축한 후, cells(3 x 10⁴)을 96-well plate에 접종하고 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA)을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)에서 하루 동안 배양하였다. 리포터 세포주에 식물추출물을 다양한 농도로 처리하여 luciferase 활성화 최적화 농도를 예비실험을 통하여 1 μ g/ml 로 결정한 후, 세포에 각각 1 μ g/ml 농도의 식물 추출물을 처리하고, 24 시간 동안 배양한 후, total cell lysate를 well 당 25 μ l 1X reporter lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)를 넣어 용출하였다. 대조군으로는 시료 미 처리군을 사용하였으며 reporter activity는 well 당 25 μ l의 luciferin

(USB, Cleveland, OH, USA)을 넣은 후, Microplate Luminometer (BMG Labtech, Offenburg, Germany)를 이용하여 측정하였다.

세포독성평가

스프라그-돌리(Sprague-Dawley, SD) 릿트(Koatech, Gyeonggi, South Korea)의 대뇌 피질에서 분리 된 신경줄기세포를 대상으로 독성평가를 시행하였다(Meli *et al.*, 2014). 분리된 세포들은 100 μ M putrescine, 30 nM selenite, 20 nM progesterone, 1,55 mg/ml D-(+)-glucose, 25 μ g/ml insulin, 0.1 μ g/ml apo-transferrin(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.5 mM Glutamax, 100 IU/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin 이 포함된 N2 medium (DMEM:F12 (1:1)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 배양한 후, 15 μ g/ml poly-L-ornithine 과 10 μ g/ml fibronectin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 코팅된 dish에 접종하였다. 신경관 결손(neural tube defect) 유도제로서 10 μ g/L bFGF (basic Fibroblast Growth Factor; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 또는 valproic acid (VPA)이 포함되어 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 이후 각 추출물들의 독성을 평가하기 위하여 2×10⁵ cells/well 의 농도로 세포를 6 well plate에 접종한 후, 각 식물추출물을 5 μ g/ml 처리하고 48시간동안 배양하였다. 결과는 신경줄기세포의 형상을 Bright field microscopy (Olympus, Tokyo, Japan) images로 관찰하였다. 동물실험은 연세대학교 의과대학 실험동물윤리위원회(The committee for the Care and Use of Laboratory Animals, Yonsei University College of Medicine)의 승인 하에 수행하였다(IRB No. 09-013).

통계처리

모든 실험은 독립적으로 3회 반복 시행하고 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

식물추출물의 Wnt/ β -catenin 신호전달 활성

Wnt/ β -catenin 신호전달 활성을 측정하기 위하여 비만관련 특허가 없는 186종을 대상으로 HEK 293-TOP세포의 luciferase 활성을 측정한 결과, 총 8종의 식물추출물들(까마중 전초; *Solanum nigrum* (whole plant), 칩 줄기; *Pueraria*

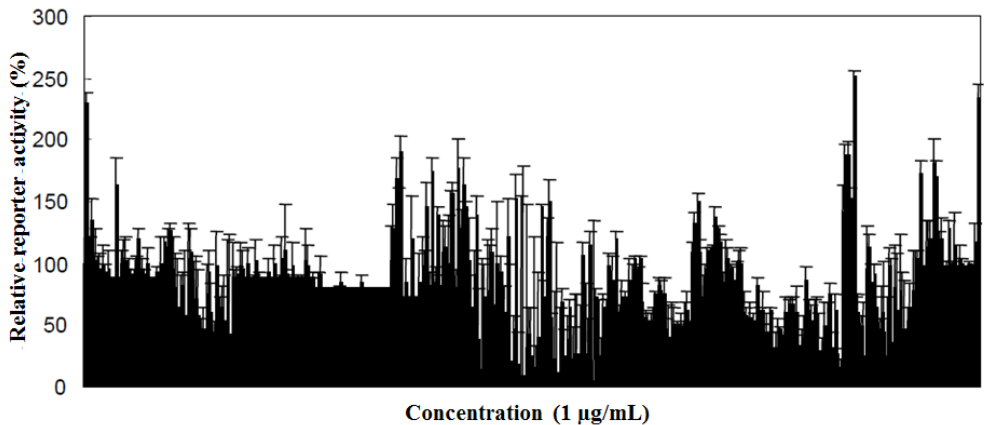


Fig. 1. Screening of 186 plant extracts using the Wnt reporter system. Effect of different plant extracts on the Wnt/ β -catenin pathway reporter activity. H293 cells containing pTOPFlash reporter gene in its chromosome were cultured and treated with different plant extracts at 1 μ g/ml concentration, and cellular extracts were prepared after 24 h as described in the Materials and Methods. No treatment group was used as a control.

thunbergiana (stem), 피마자 전초; *Ricinus communis* (whole plant), 해당화 줄기; *Rosa rugosa* (stem), 측백나무 줄기; *Thuja orientalis* (stem), 괴화 전초; *Sophorae Flos* (whole plant), 지유 전초; *Sanguisorba officinalis* (whole plant), 초피나무 줄기; *Zanthoxylum piperitum* (stem)]가 무 처리한 대조군에 비해 상대적 리포터 활성이 70% 이상으로 측정되어 1차 선별하였다(Fig. 1). 선별된 70%이상 활성을 나타낸 8종을 대상으로 상대적 리포터 활성 재검증한 결과는 Fig. 2에 보는 바와 같이, 무 처리 대조군에 비하여 추출물에 따라 70~150% 더 높은 활성을 나타내고 있었으며 지유(전초), 측백나무(줄기)가 각각 152%, 130%로 가장 높은 활성을 나타내었다. 피마자(전초)는 약 90%대의 활성을, 해당화(줄기), 괴화(전초)의 경우는 약 80%, 초피나무(줄기), 칩(줄기), 까마중(전초)은 약 70%대의 더 높은 활성을 나타내었다. 무 처리한 대조군에 비해 100% 넘는 좋은 활성을 보인 2가지 식물추출물 시료 중 하나인 측백나무는 항 스트레스 효과(Seo *et al.*, 2015)와 꽃 추출물에 대한 항염 효과(Tursun *et al.*, 2016)가 보고되었으며, 가장 좋은 활성을 나타낸 지유의 경우는 항염(Yang *et al.*, 2015) 및 항균(Chen *et al.*, 2015)효과에 대한 보고와 함께 특히, 최근에 연구에서 50% 에탄올 추출물의 경우 항비만 효과가 있는 것으로 보고(Jung *et al.*, 2016)되고 있어 본 연구의 추출방법(100% 메탄올)과 차이가 있을지라도 동일한 우수한 물질로 판단된다. 따라서 본 연구에 제시한 Wnt/ β -catenin 신호전달 활성 측정방법이 향후 High throughput screening 기반기술로 활용될 수 있을 것으로 전망한다.

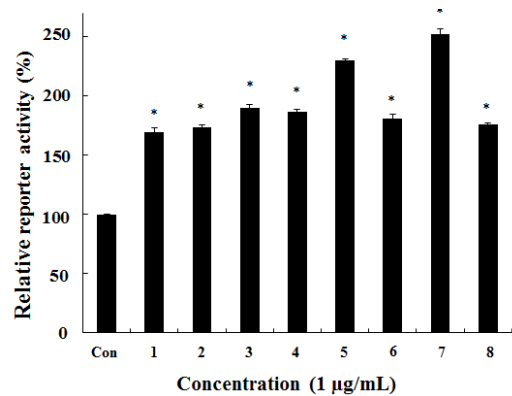


Fig. 2. Effect of 8 plant extracts on the Wnt/ β -catenin pathway reporter activity. H293 cells containing pTOPFlash reporter gene in its chromosome were cultured and treated with different plant extracts at 1 μ g/ml concentration, and cellular extracts were prepared after 24 h as described in the Materials and Methods. 1; *Solanum nigrum* (whole plant), 2; *Pueraria thunbergiana* (stem), 3; *Ricinus communis* (whole plant), 4; *Rosa rugosa* (stem), 5; *Thuja orientalis* (stem), 6; *Sophorae Flos* (whole plant), 7; *Sanguisorba officinalis* (whole plant), 8; *Zanthoxylum piperitum* (stem). No treatment group was used as a control. Values are presented as mean \pm SD. Differences were considered statistically significant when * p < 0.05.

식물추출물의 세포독성

신경줄기 세포는 최근 후보물질에 대한 독성실험에 이용되고 있다(Meli *et al.*, 2014). 본 연구에서는 Wnt/ β -catenin 신호전달 활성이 우수한 것으로 선별된 8종에 대하여 쥐 신경줄

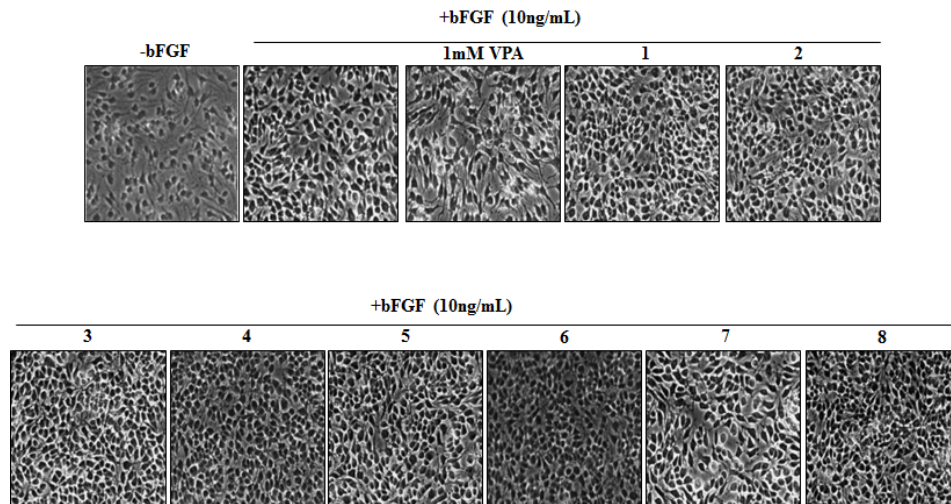


Fig. 3. Morphology of rat neuronal stem cells after treatment of 8 plant extracts. Bright field microscopy images of rat neuronal stem cells. The cells were treated with 8 plant extracts at 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration for 48 h in the presence of 10 $\mu\text{g}/\ell$ bFGF. 1; *Solanum nigrum* (whole plant), 2; *Pueraria thunbergiana* (stem), 3; *Ricinus communis* (whole plant), 4; *Rosa rugosa* (stem), 5; *Thuja orientalis* (stem), 6; *Sophorae Flos* (whole plant), 7; *Sanguisorba officinalis* (whole plant), 8; *Zanthoxylum piperitum* (stem).

기세포 독성 시험결과를 Fig. 3에 나타내었다. 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ bFGF 으로 신경관 결손(neural tube defect)을 유도한 후, luciferase 활성화 최적화 농도(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 비롯하여 여러 농도에서 측정하였으며 선별된 8종을 최대 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 처리하고 관찰한 결과 신경줄기 세포에 대한 어떠한 독성도 보이지 않았다. 이 결과는 본 연구에서 지방세포 분화 억제활성 후보로 선별된 식물 추출물들이 안전한 것으로 사료되며 향후 비만치료를 위한 기능성물질 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

본 연구에서 국내 자생식물 추출물중 비만관련 특허가 없는 식물원료를 대상으로 지방세포의 분화억제 효과를 Wnt/ β -catenin 신호전달계 활성측정방법으로 탐색하여 비만치료를 위한 기능성소재 응용가능성을 검토하였다. HEK 293-TOP세포의 luciferase 리porter 상대적인 활성은 무 처리 대조군에 비하여 지유(전초), 측백나무(줄기)가 각각 152%, 130%로 높은 활성을 나타내었으며, 피마자(전초)는 약 90%대의 활성을, 해당화(줄기), 괴화(전초)의 경우는 약 80%, 초피나무(줄기), 칩(줄기), 까마중(전초)은 약 70%대의 높은 활성을 나타내었다. 또한, 신경줄기 세포에 대한 어떠한 독성도 보이지 않으므로써 안전한 물질인 것으로 사료되었다. 이 결과는 Wnt/ β -catenin 신호전달 활성 측정방법이 향후 High throughput

screening 기반기술로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 지방세포 분화 억제활성 후보로 선별된 식물추출물들에 대한 추가적인 실험을 통하여 항비만 소재 개발 응용 가능성을 타진할 것이다.

사 사

본 연구는 2014년도 교육부와 한국연구재단(NRF)의 이공분야 기초연구지원사업의 지원(2014R1A1A2057651)에 의해 수행되었습니다.

References

- Ahn, J.J., T.Y. Hwang and H.S. Kim. 2015. Study on the physiological activities of *Cleyera japonica* extract. Korean J. Plant Res. 28:153-157.
- Arango, N.A., P.P. Szotek, T.F. Manganaro, E. Oliva, P.K. Donahoe and J. Teixeira. 2005. Conditional deletion of [beta]-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. Dev. Biol. 288:276-283.
- Bennett, C.N., S.E. Ross, K.A. Longo, L. Bajnok, N. Hemati, K.W. Johnson, S.D. Harrison and O.A. MacDougald. 2004. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis.

- J. Biol. Chem. 277:30998-31004.
- Chen, X., F. Shang, Y. Meng, L. Li, Y. Cui, M. Zhang, K. Qi and T. Xue. 2015. Ethanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. inhibits biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an ica-dependent manner. J. Dairy Sci. 98:8486-8491.
- Frühbeck, G., J. Gomez-Ambrosi, F.J. Muruzabal and M.A. Burrell. 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 280:E827-E847.
- Jung, D.W., O.H. Lee and I.J. Kang. 2016. *Sanguisorba officinalis* L. extracts exert antiobesity effects in 3T3-L1 adipocytes and C57BL/6J mice fed high-fat diets. J. Med. Food 10.1089/jmf.2016.3704.
- Kennell, J.A. and O.A. MacDougald. 2005. Wnt signaling inhibits adipogenesis through β -catenin-dependent and -independent mechanisms. J. Biol. Chem. 280:24004-24010.
- Liu, J. and S.R. Farmer. 2004. Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor γ and β -catenin signaling during adipogenesis. J. Biol. Chem. 279:45020-45027.
- Lee, S.H., B. Kim, M.J. Oh, J. Yoon, H.Y. Kim, K.J. Lee, J.D. Lee and K.Y. Choi. 2011. *Persicaria hydropiper* (L.) Spach and its flavonoid components, isoquercitrin and isorhamnetin, activate the Wnt/ β -catenin pathway and inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. Phytother. Res. 25:1629-1635.
- Meli, L., H.S.C. Barbosa, A.M. Hickey, L. Gasimli, G. Nierode, M.M. Diogo, R.J. Linhardt, J.M.S. Cabral and J.S. Dordick. 2014. Three dimensional cellular microarray platform for human neural stem cell differentiation and toxicology. Stem Cell Res. 13:36-47.
- Prestwich, T.C. and O.A. MacDougald. 2007. Wnt/ β -catenin signaling in adipogenesis and metabolism. Curr. Opin. Cell Biol. 19:612-617.
- Seo, E., Y. You, H.G. Yoon, B. Kim, K. Kim, Y.H. Lee, J. Lee, J.W. Chung, S. Shim and W. Jun. 2015. *Rosa rugosa* aqueous extract alleviates endurance exercise-induced stress. J. Med. Food. 18:711-713.
- Sirakov, M.I., S. Skah, I.N. Lone, J. Nadjar, D. Angelov and M. Plateroti. 2012. Multi-level interactions between the nuclear receptor TRa1 and the WNT effectors β -catenin/Tcf4 in the intestinal epithelium. PLoS One 7(4):e34162. doi:10.1371/journal.pone.0034162.
- Tursun, X., Y. Zhao, Z. Alat, X. Xin, A. Tursun, R. Abdulla and H. AkberAisa. 2016. Anti-Inflammatory effect of *Rosa rugosa* flower extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. Biomol. Ther. 24: 184-190.
- Yang, J.H., Y.H. Hwang, M.J. Gu, W.K. Cho and J.Y. Ma. 2015. Ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. suppress TNF- α /IFN- γ -induced pro-inflammatory chemokine production in HaCaT cells. Phytomedicine 22:1262-1268.

(Received 29 July 2016 ; Revised 6 September 2016 ; Accepted 27 September 2016)