

Inhibitory Effect of the Ethanol Extract of *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey on Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells

Gun He Nam¹, Ji-Hyang Wee², Sang Yung Kim², Ji-Young Baek³ and Young Min Kim^{1*}

¹Department of Biological Science and Biotechnology, Hannam University, Daejeon 34054, Korea

²Department of Food Science & Bio Technology, Shinansan University, Deahakro Danwon-gu, Ansan-City, Gyeonggi-do 15435, Korea

³Department of Pharma-Gene Co., Ltd., Yuseongde-ro 1646, Yuseong-gu, Daejeon 34054, Korea

Received September 9, 2019 / Revised October 2, 2019 / Accepted October 4, 2019

Rudbeckia laciniata var. *hortensis* Bailey is used in home remedy for colic and gastritis in South Korea. Although *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey is used extensively for home remedies, no single study on its efficacy exists. In this study, we investigated the anti-obesity effects of *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey. The anti-obesity effect of a 70% ethanol extract from *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey on the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes to adipocytes was investigated with an Oil Red O assay, western blot analysis, and mRNA analysis. Compared to the control (only treated with DM), the 70% ethanol extract of *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey significantly inhibited adipocyte differentiation and intracellular triglyceride (TG) levels at a concentration of 100 µg/ml. To determine how the TG content was reduced, we measured the level of protein and mRNA expression of obesity-related agents, such as peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α), AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation, LPL, and FAS. As a result, the 70% ethanol extract of *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey significantly increased the expression of AMPK and decreased the expression of genes related to adipogenesis and fat storage, such as PPAR γ , C/EBP α , LPL, and FAS.

Key words : Adipocytes, C/EBP α , FAS, PPAR γ , *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey

서론

현대 사회에서 전 세계적으로 확산이 되고 있는 비만 현상은 고에너지 식품의 섭취, 유전적 감수성의 증가, 감소된 육체적 활동 등으로 발생하며 독립적으로 혹은 다른 질병과 연합하여 많은 건강상의 문제를 일으킨다[4]. 비정상적인 지방세포의 크기와 숫자로 지방세포는 지방축적의 직접적인 원인이며, 비만 뿐만 아니라 염증, 당뇨 등 만성대사 질환에 영향을 미친다[3, 5, 7, 21]. 지방세포의 체내기능은 에너지 항상성 유지 및 지질대사에 중요한 역할을 하고, 지방전구세포인 3T3-L1은 여러 호르몬과 다양한 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되면서 세포 내 지방을 축적한다. 이러한 지방세포 형성(adipogenesis) 과정에 관여하는 중요한 인자로 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ)와 CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α)가 있다[6]. 이들은 분화 후기에 발현되어 adipose-specific 유전자 발현을 활성화함

로서 분화를 촉진 시켜 분화과정을 완성하는데 관여한다. 아울러 C/EBP α 는 PPAR γ 의 활성화 및 지속적인 유지와 함께 성숙한 지방세포 생성을 위한 insulin 감수성에 중요한 역할을 한다[17]. 분화된 세포는 백색 지방세포에서 나타나는 triglyceride의 축적 등과 같은 형태적 특징과 더불어 PPAR γ , fatty acid synthase (FAS) 및 lipoprotein lipase 등과 같은 지방세포 특이적인 유전자의 발현이 유발되는 생화학적 특징을 가진다[8]. 따라서 효과적인 비만억제 및 비만과 관련된 대사성 질환의 치료를 위해서는 지방세포 특이적인 분비 물질의 조절과 더불어 지방세포 분화과정에 관여하는 전사 인자들의 활성을 억제하는 것이 중요하다.

겉삼잎국화(*Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey)는 국화과의 원추천인국속의 여러해살이풀로 북아메리카가 원산지지만 우리나라의 산기슭의 풀밭이나 강가에 자라는 식물로 번식력이 아주 강한 특징을 가지고 있다. 보통 7~9월에 꽃이 피고 줄기와 가지 끝에 노란색의 두상화가 달리는데 꽃이 삼잎국화를 닮았고 겹으로 핀다고 하여 겉삼잎국화라고 불린다[9]. 식용이 가능한 겉삼잎국화는 국내는 물론 해외에서도 연구된 바가 없다. 나고야 의정서의 발표 등에 따른 국내 자생종인 식물 자원에 대한 관심이 높아지고있는 추세에 따라, 아직 잘 알려지지않은 국내 자생 식물인 겉삼잎국화에 대해서 연구하고자 한다.

본 연구에서는 겉삼잎국화의 70% 에탄올 추출물이 지방세

*Corresponding author

Tel : +82-42-629-8753, Fax : +82-42-629-8873

E-mail : kym@hnu.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.

포분화 및 지방 축적에 미치는 영향을 분석해 봄으로써 겹삼 잎국화 에탄올 추출물의 산업적 이용 가능성 및 가치를 검토해 보고자 한다.

재료 및 방법

겹삼잎국화 추출물

겹삼잎국화 g당 8배 용량의 70% ethanol을 첨가하여 완전히 침지한 후, 상온에서 72시간 동안 환류추출을 실시하였다. 얻어진 70% ethanol 추출물을 pore size 6 μm paper filter (Advantec, Korea)로 여과를 진행 한 후 5 μm paper filter (Advantec, Korea)로 2차 여과를 진행하여 잔사를 모두 제거하였다. 여과가 완료된 추출물은 감압농축기(EYELA N-1200A, SB1200, A-1000S, CCA1111)를 이용하여 40°C의 heating bath에서 감압농축 한 후, 동결건조하여 분말화시켜 실험에 사용하였다.

3T3-L1 세포 배양 및 분화 유도

실험에 사용된 3T3-L1 세포는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 3T3-L1 세포는 10% bovine calf serum, 1% 페니실린-스트렙토마이신항생물질(penicillin-streptomycin antibiotics, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 넣은 Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM: Gibco BRL) 배지에서 5% 이산화탄소(CO₂), 37°C 조건으로 배양하였다.

세포의 분화는 6-well 플레이트에 well 당 1×10⁶ 세포를 분주하여 세포가 100% 밀집되게 배양하였다. 2일 후 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum)와 MDI 용액(0.5 mM 3-isobuty-1-methylxanthine, 0.5 μM dexamethasone, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin)을 포함한 DMEM 배지를 3일 동안 처리하였고 다시 10% 소태아 혈청과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린을 포함한 DMEM을 3일 동안 2회 총 6일 동안 배양하며 세포 내 지방구의 형성을 근거하여 지방 세포로 분화시켰다. 모두 12일 동안의 분화를 통해 80% 이상의 세포가 분화되었음을 확인하였다. 시료의 처리는 분화유도 배지 첨가 시점부터 같이 처리 하였다.

세포독성시험

시료의 세포 증식과 독성을 측정하기 위해 Green 등의 방법 [10]에 따라 3-(3,4-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다. MTT assay는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 보라색 formazan으로 환원되는 원리를 이용한 방법으로, 생성된 formazan의 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 24 well culture cell plate에 1×10⁵ Cells/well로 3T3-L1 세포를 분주하고 24시간 동안 부착 시킨 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안

배양하였다. 시료 처리 후 MTT solution 5 mg/ml (sigma M2128)을 20 μl 씩 넣어 2~3시간 동안 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Oil Red O 염색(staining)에 의한 지방 축적량 측정

3T3-L1 preadipocyte의 지방세포로의 분화는 Chu 등[2]이 사용한 방법을 이용하였다. 분화용 배지는 10% FBS, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 0.1 μM dexamethasone (Dex), 0.5 μM isobutyl-1-methylxanthine (IBM)가 포함된 DMEM 배지를 사용하였다.

24-well plate에 well 당 1×10⁶ 3T3-L1 세포를 분주하여 세포가 100% 밀집되게 배양되었을 때, MD(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 0.1 μM dexamethasone (Dex), 0.5 μM isobutyl-1-methylxanthine (IBM))가 든 배지로 교체하면서 시료를 농도 별로 처리하였다. 2일 후에 10% FBS, insulin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin이 포함된 DMEM 배지와 시료를 처리하고 2일 간격으로 배지를 교환하면서 8일 동안 분화를 시켰다. 분화 억제 정도를 위상차 현미경으로 관찰, 촬영하고 Oil-Red-O staining을 통해 분석하였다. 지방 세포 분화가 끝난 세포를 phosphate buffered saline (PBS: Gibco BRL)을 넣어 3회 세척한 후 10% formalin으로 고정하고, Oil-Red-O staining solution으로 10분간 염색하였다. 염색 완료 후 100% isopropanol을 사용하여 지방을 추출하고 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포안(intracellular) 중성지방 함량

세포 내 중성지방의 함량은 AdipoRedTM 분석시약(LONZA, Walkersville, MD, USA)에 지시되어 있는 정량법에 따라 수행하였는데, 이 방법은 Nile Red 염색법으로서 트라이글리세라이드(triglyceride)에 특이성이 높은 것으로 알려져 있다[12]. 세포 내 중성지방 함량 측정은 6-well 플레이트에 well당 1×10⁶ 세포를 분주하여 세포가 100% 밀집되게 배양하였다. 2일 동안 배양한 후에 분화유도배지에 추출물을 함께 처리하였다. 세포 분화 유도는 2일 동안 유도한 후 2일 마다 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 교환하여 9일 동안 배양하였다. 배양하는 배양액에 추출물을 같이 처리하였다. 분화가 완료된 3T3-L1은 배지를 제거한 뒤, PBS로 2회 세척한 후, AdipoRedTM 시약을 well 당 1 ml 처리하여 37°C에서 10분간 배양한 후 형광 정도를 excitation 485 nm, emission 572 nm에서 측정하였다.

웨스턴블롯(Western blot)

세포내 단백질의 발현은 SDS-PAGE를 사용하여 확인하였다[20]. 시험이 완료된 세포를 PBS 용액으로 세척한 후, RIPA lysis buffer (Life technologies, Seoul, Korea)를 넣고 4°C에서 1시간 용해시켰다. 세포를 수거하여 16,600×g, 4°C에서 20분간 원심분리 한 후 상층액을 회수하여 BSA 단백질(Amersham, Waltham, MA, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 단백

질 30 µg을 4-10% 젤(Life technologies, Seoul, Korea)을 사용하여 전개(running)한 후 PVDF membrane (Life technologies, Seoul, Korea)에 transfer 시켰다. transfer된 membrane은 blocking 용액(TBS, 0.1% tween 20, 5% BSA)에 담귀 상온에서 1시간 동안 교반하고, TBS-T 용액으로 세척하였다. 그 후 PPAR γ 항체, C/EBP α 항체, AMPK 항체, 그리고 β -actin 항체 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 1:1000 비율로 희석하여 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 세척 후, anti-Rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 2차 항체로 반응시켰다. 그 후 Amersham ECL prime western blotting detection reagent (Piscataway, NJ, USA)를 처리하고 이미지 리더(Supernova 1800, Lugen Sci Co., Ltd., Bucheon, Korea)로 분석하였다.

Real-time PCR법

충분히 분화된 지방세포에 각각의 농도의 겐삼잎국화 추출물을 배지와 혼합한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거한 뒤 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 그 후 NanoDrop ND-1000(NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)을 이용하여 정량하고, 정량된 RNA는 reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)를 이용하여 역전사 한 다음 cDNA로 합성하였다. 만들어진 cDNA는 thermal cycler BioRad CFX-96 real time system (BioRad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 각각의 primer와 cDNA를 함께 넣은 후 증폭하여 발현된 유전자를 분석하였다. House keeping 유전자로 18S rRNA를 사용하였고, fatty acid synthase (FAS), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), CCAAT enhancer binding protein-alpha (C/EBP α), lipolprotein lipase (LPL) 유전자의 발현을 분석하였다[16]. 유전자 증폭을 위한 primer는 FAS forward GCTTTGCTGCCGTGTCCTTCT, backward TCTAGCCCTCCCGTACTACTCA, PPAR γ forward TTTTCAAGGGTGCCAGTTTCG, backward AATCCTTGGC CCGTIGAGAT, C/EBP α forward TAGGTTTCTGGGCTTT GTGG, backward TGGTTTAGCATAGACGTGCAC, LPL forward AGTAGACTGGTTGTATCGGG, backward AGCGT CATCAGGAGAAAGG로 제작하여 실험하였다. 중합효소 연쇄반응의 조건은 95°C 3분 동안 초기 활성화한 뒤에 95°C 10초, PPAR γ 는 61°C 35초, C/EBP α , LPL, FAS는 54°C 30초 반응 후, 72°C 30초 반응을 40회 반복하였다.

통계분석

실험설계에 대한 분석은 통계프로그램인 SPSS (20.0, SPSS, Chicago, IL, USA)의 Student's t-test로 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻은 결과로 검정하였고 $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

겐삼잎국화 추출물의 3T3-L1 지방전구세포 생존율에 미치는 영향

겐삼잎국화의 70% Ethanol 추출물에 대한 3T3-L1 adipocytes의 세포 생존율을 측정하기 위해 10, 50, 100, 200, 300, 400 µg/ml의 농도로 각 시료를 처리한 후, MTT assay를 실시한 결과(Fig. 1), 겐삼잎국화 70% Ethanol 추출물은 400 µg/ml의 고농도에서도 100% 이상의 세포생존율을 나타내어 독성이 없는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통해 겐삼잎국화 추출물은 3T3-L1 adipocytes에 세포 독성이 보이지 않아 항비만 기능성 소재로서의 가능성이 제시되었다.

Oil Red O 결과

선행연구에서 3T3-L1세포를 지방세포로 분화시키는 과정에서 분화 억제 소재를 처리하고 oil red O 염색을 통해 중성지방의 축적량을 시각화함으로써 지방세포분화 억제함을 보고하였으며[11], 본 실험에서는 겐삼잎국화 70% ethanol 추출물이 3T3-L1 세포의 분화 및 지방축적 형성을 얼마나 저해할 수 있는지 확인하기 위하여 Oil Red O 염색을 실시하였다. 지방세포전구물질(pre-adipocyte)에서 지방세포로 분화가 완료된 control 그룹과 지방세포에 겐삼잎국화 추출물을 세포 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 농도별로 처리한 결과(Fig. 2), 100, 200, 300, 400 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 지방분해 억제율이 각각 74, 48, 44, 51%로 나타나 농도 의존적

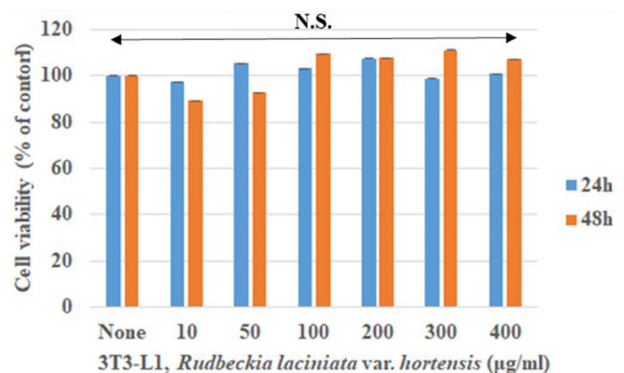


Fig. 1. Effect of 70% ethanol extract of *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey on cell viability in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 preadipocytes were maintained with adipocyte-induction media for 9 days and treated with extracts from *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey every 2 days. Cell viability was calculated as a percentage of MTT metabolism in controls. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. The statistical analysis of the data was carried out by use of a *t*-test. N.S. means Not Significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared to Negative control. The error bars represent the standard error.

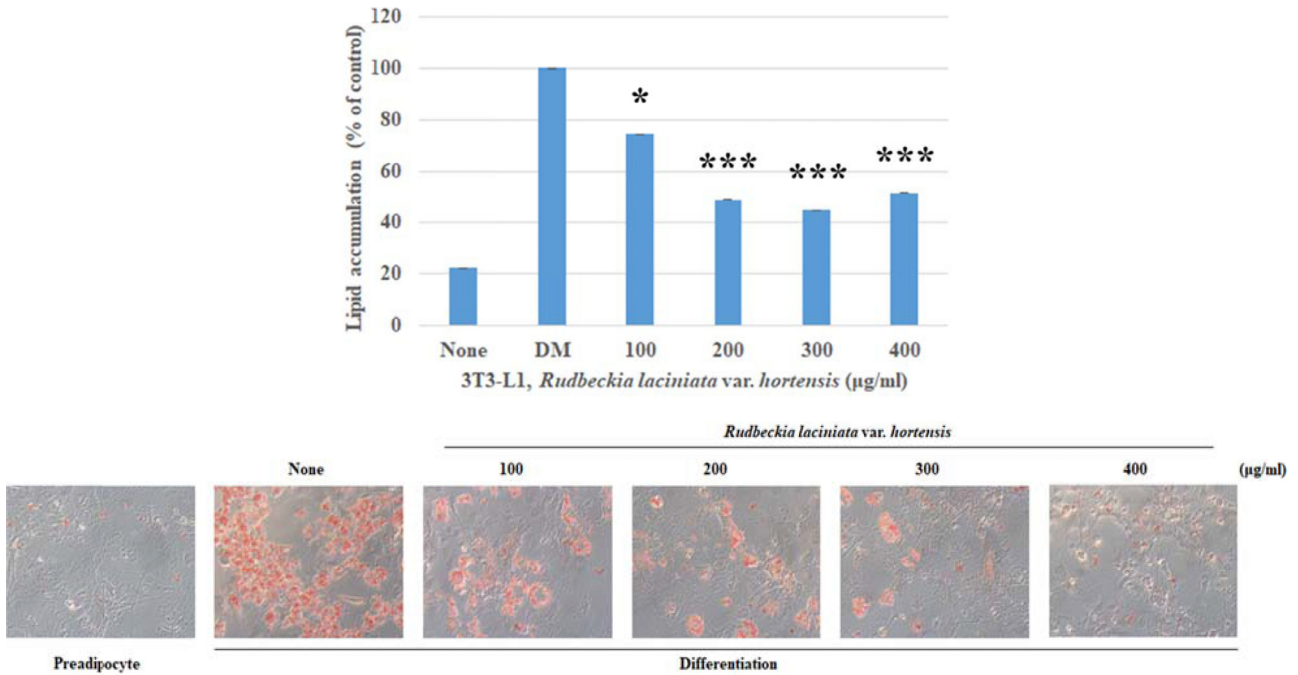


Fig. 2. Inhibitory effects of extracts from 70% ethanol extract of *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey on the lipid accumulation in 3T3-L1. The lipid accumulation was quantified by Oil Red O staining and calculated as relative values versus untreated control cells. (A) lipid levels were measured colorimetrically using a spectrophotometer. (B) Cells were observed using microscope (BX41-PH; Olympus Co., Tokyo, Japan). The statistical analysis of the data was carried out by use of a *t*-test. N.S. means Not Significant. **p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001 compared to DM. The error bars represent the standard error.

으로 지방세포의 분화가 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 안전성이 확보된 검삼잎국화 추출물이 세포 독성없이 효과적으로 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제한다는 것을 확인하였다.

검삼잎국화 추출물이 지방세포 내 triglyceride 생성에 미치는 영향

선행연구에 따르면, 지방세포에 존재하는 중성지방은 3T3-L1 전지방 세포에서 지방세포로 분화되는 단계에서 다음의 과정에 의해 생성된다[15]. 첫째로 세포내로 유입되는 포도당의 대사 과정, 둘째로 지단백 분해효소(lipoprotein lipase)에 의해 분해되어 유리된 지방산과 모노글리세롤, 그리고 세포내 de novo 지방산 합성 과정 등으로 인해 종합적으로 세포내 중성지방이 생성되어 최종분화 단계까지 계속적으로 지방구를 형성하게 되고 시간이 지날수록 지방구끼리 결합하여 그 크기가 점점 증가하게 된다[13]. 본 연구에서는 검삼잎국화 70% ethanol 추출물의 지방구 감소효과를 확인하기 위하여 지방 세포 내에 축적된 중성지방의 함량을 확인해 본 결과 (Fig. 3), 검삼잎국화 추출물을 처리한 군의 중성지방 함량이 농도 의존적으로 유의적으로 낮아지는 것이 확인되었다. 본 실험을 통하여 검삼잎국화 추출물이 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 억제함으로써 비만 예방에 효과적인 것으로 생각된다.

Western blot에 의한 단백질 발현 조사

선행연구에 따르면, 지방세포는 전구 세포(preadipocyte)에서 지방세포로 분화되고, 지방세포에서 지방 합성이 증가하면서 성숙된 지방세포로 변화되어 지방조직이 증가하므로 지방 전구 세포를 지방세포로의 분화를 촉진하는 전사인자들(per-

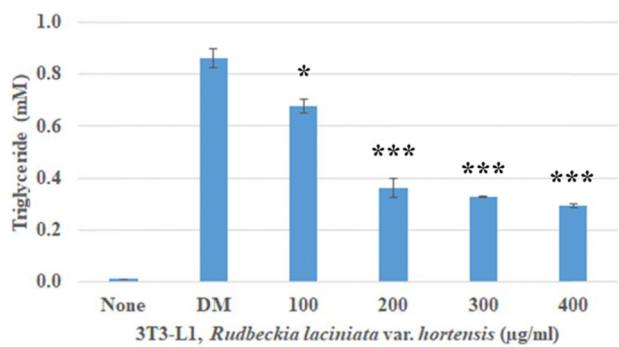


Fig. 3. Inhibitory effects of extracts from 70% ethanol extract of *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey on the intracellular triglyceride in 3T3-L1. Each value was expressed as the mean ± SD of three independent experiments. Different letters show a significantly difference at *p*<0.05 as determined by Duncan's multiple range test. The statistical analysis of the data was carried out by use of a *t*-test. N.S. means Not Significant. **p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001 compared to DM. The error bars represent the standard error.

oxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α)의 발현을 억제하면 지방세포로의 분화 및 체지방 합성에 관련된 효소들의 활성이나 발현을 억제 하므로 체지방 합성을 억제할 수 있다고 보고되었다[18]. 또한 AMPK는 PPAR γ 의 발현을 억제하고 FAS와 같은 지방 합성 효소의 발현을 억제함으로써 중성 지방의 생성을 억제시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 겹삼잎국화 70% ethanol 추출물이 adipogenic transcription factor의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 단백질 수준에서 확인해 본 결과(Fig. 4), 겹삼잎국화 70% ethanol 추출물에 의해서 에너지 대사 조절 지표인 PPAR γ , C/EBP α 의 발현이 농도 의존적으로 감소하며 p-AMPK의 발현은 증가시키는 것을 알 수 있었다. 본 실험결과를 통하여 겹삼잎국화 추출물이 AMPK의 발현을 증가시켜 지방 전구세포를 지방세포로의 분화를 촉진하는 전사인자인 PPAR γ , C/EBP α 의 발현을 억제시킴으로서 지방세포내의 중성지방의 함량을 낮추는 데도 영향을 준 것을 확인하였다.

Real-time PCR을 이용한 mRNA 발현조사

지방세포분화에 핵심적인 기능을 담당하고 있는 PPAR γ 는 CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α)와 결합하여 지단백질의 중성지방을 분해하여 지단백질의 지방산을 조직으로 이동시켜 지방 조직 등 체조직에 지방을 축적하는 역할을 하는 효소인 lipoprotein lipase (LPL)와 아세틸 CoA와 말로닐 CoA로부터 지방산을 합성하는 역할을 하는 fatty acid synthase (FAS)를 조절함으로써 지방세포의 유지에도 주요한 역할을 한다고 알려져 있다[1]. 이에 PPAR γ 의 발현이 감소되면 지방조직에서의 중성지방 합성이 감소하여 혈중 중성지방 개선의 효과도 기대된다. C/EBP α 는 PPAR γ 의 활성화 및 지속적인 유지와 함께 성숙한 지방세포 생성을 위한 insulin 감수성에 중요한 역할을 한다. Wang 등[22]의 연구에 따르면 지방세

포를 가지는 동물모델에서 C/EBP α 를 제거하였을 경우에 지방축적을 하지 못하는 것으로 보고되었다. 따라서 효과적인 비만 억제를 위해서는 지방세포 분화과정에 관여하는 전사인자들의 활성을 억제하는 것이 중요하다고 판단된다. 이에 겹삼잎국화 70% ethanol 추출물의 adipogenic transcription factor 및 관련 유전자들에 미치는 영향을 확인하기 위해 real-time PCR을 이용하여 확인한 결과는 Fig. 5와 같다. 본 실험에서는, 분화를 유도한 control에서 PPAR γ , C/EBP α 의 mRNA 발현이 증가되었으나, 겹삼잎국화 추출물을 100 μ g/ml 이상의 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 이들 유전자의 발현이 감소됨을 확인하였다. 체내에서 지방 합성과 관련된 효소인 LPL과 FAS의 경우에는 겹삼잎국화 추출물을 100 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때는 mRNA 발현이 더 증가하였으나 FAS는 200 μ g/ml, LPL은 300 μ g/ml 이상의 농도로 처리할 경우 이들 유전자의 발현이 감소됨을 확인하였다.

본 연구결과를 PPAR γ 는 C/EBP α 와의 상호 작용을 통해 지방 세포 분화 및 성숙 지방 세포의 유지에 중요한 핵 수용체이며, 그 이후의 상호 작용으로 LPL 및 FAS의 전사를 조절하여 지방 저장 및 지방 생성에 대한 억제 효과가 지방 생성 및 지방 저장에 관여하는 유전자인 PPAR γ , C/EBP α , LPL 및 FAS의 억제로부터 초래 될 수 있다고 제시한 Ko 등[14]의 연구결과와 일치한다. 이상의 결과로부터 겹삼잎국화 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 adipogenic transcription factor인 PPAR γ , C/EBP α 의 발현을 억제하여 지방 합성에 관여하는 효소인 LPL과 FAS의 발현을 억제함으로써 lipid droplet 및 triglyceride 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시켜 체지방감소에 도움을 줄 수 있는 것으로 확인되었다.

결론적으로, 겹삼잎국화 70% ethanol 추출물을 대상으로 3T3-L1 세포에서 Oil Red O 염색법을 이용한 지방 축적 저해 정도 및 세포내 중성지방 함량을 측정한 결과, 지방 축적 저해 및 중성지방의 함량이 감소하는 것을 확인하였다. 겹삼잎국화 70% ethanol 추출물이 지방 합성 및 에너지 조절 효소에 미치는 영향을 알아보기 위해 지방 대사에 관여하는 인자들의 단백질 및 mRNA 발현을 확인한 결과, AMPK 단백질 발현은 증가시키면서 PPAR γ 와 C/EBP α 단백질 및 mRNA 발현을 억제시키는 것을 알 수 있었으며, 지방 합성에 관여하는 것으로 잘 알려진 FAS와 LPL mRNA 발현도 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. 이상의 결과로부터 겹삼잎국화는 추후 체지방 감소 효능을 갖는 천연물 소재로도 활용이 가능하며, 기존의 항비만 기능성 식품의 부작용인 위장염 및 대장염, 구토, 설사 등을 최소화하는 안전성이 확보된 기능성 소재로써 가능성이 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부에서 지원하는 2017년도 창업성

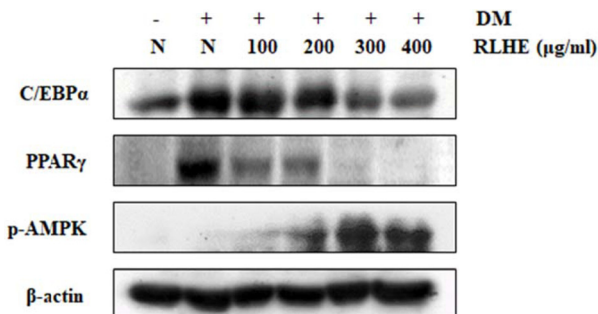


Fig. 4. Effects of extracts from 70% ethanol extract of *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey on PPAR γ , C/EBP α , and p-AMPK protein expressions in 3T3-L1. Each value was expressed as the mean \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

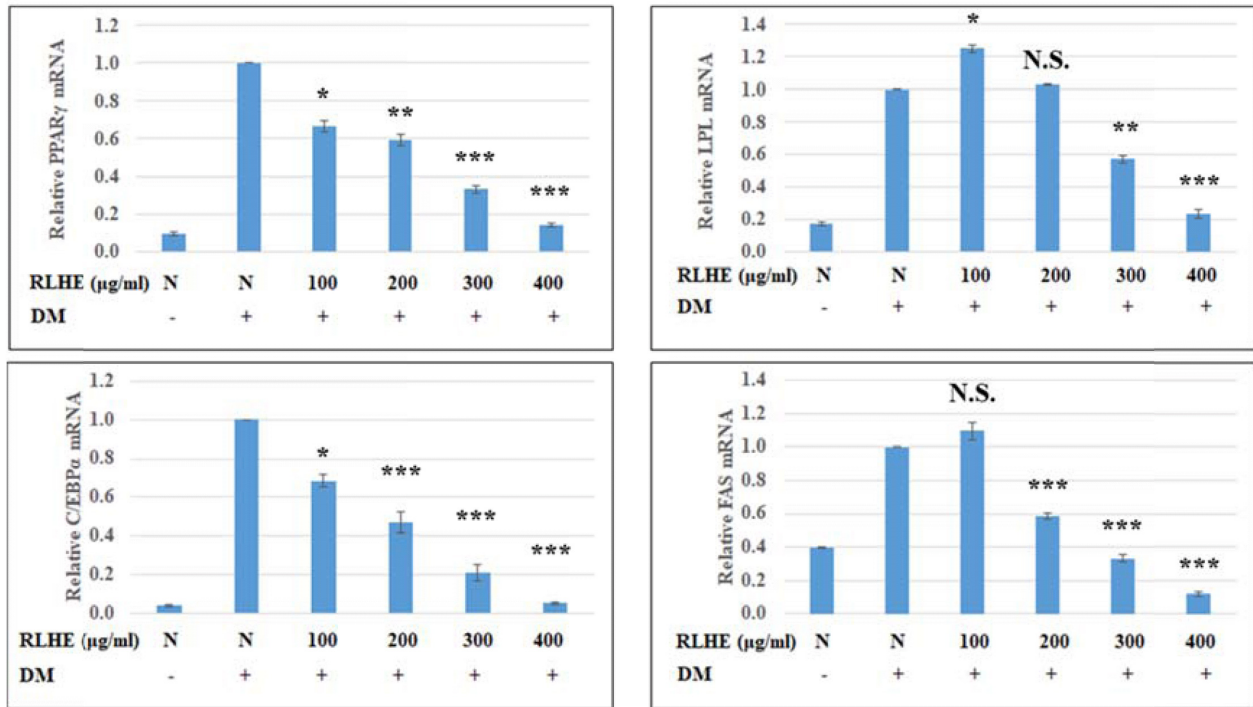


Fig. 5. Effect of extracts from 70% ethanol extract of *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* Bailey on C/EBP α , PPAR γ , LPL, and FAS gene expression in 3T3-L1 preadipocyte. Differentiating 3T3-L1 cells were treated every 2 days with Aster scaber Thunb for 9 days in adipocyte induction media. At day 9, adipocytes RNA was isolated and mRNA expressions were determined by real-time PCR analysis. Results were presented as means \pm SD in triplicate. The statistical analysis of the data was carried out by use of a *t*-test. N.S. means Not Significant. * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001 compared to DM. The error bars represent the standard error.

장기기술개발사업(팁스프로그램, No. S2519751)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

- Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R. and Pepper, M. S. 2013. Adipocyte and adipogenesis. *Eur. J. Cell. Biol.* **92**, 229-236.
- Chu, C. S., Rhim, T. J., Kim, D. H. and Kwon, K. R. 2008. The effects of hot pepper extract and capsaicin on adipocyte metabolism. *J. Pharmacopuncture* **11**, 149-162.
- Flier, J. S. and Maratos-Flier, E. 1998. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* **92**, 437-440.
- Friedman, J. M. 2000. Obesity in the new millennium. *Nature* **404**, 632.
- Gesta, S., Tseng, Y. H. and Kahn, C. R. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* **131**, 242-256.
- Goodwin, P. J. and Stambolic, V. 2015. Impact of the obesity epidemic on cancer. *Annu. Rev. Med.* **66**, 281-296.
- Gregoire F. M., Smas C. M. and Sul H. S. Under standing adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783-809.
- Green, H. and Kehinde, O. 1976. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* **7**, 105-113.
- Grulke, N. E., Neufeld, H. S., Davison, A. W., Roberts, M. and Chappelka, A. H. 2007. Stomatal behavior of ozone sensitive and insensitive coneflowers (*Rudbeckia laciniata* var. *digitata*) in Great Smoky Mountains National Park. *New. Phytol.* **173**, 100-109.
- Green, L. M., Reade, J. L. and Ware, C. F. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* **70**, 257-268.
- Jang, M. J., Yang, J. H. and Kim, E. J. 2018. Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5) Regulates Adipogenesis of 3T3L-1 Cells. *J. Life Sci.* **28**, 765-771.
- Kim, J., Park, J. and Jun, W. 2014. Anti-obesity effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* L. in 3T3-L1 cells. *Prev. Nutr. Food. Sci.* **43**, 1681-1687.
- Kim, J. B. and Park, J. Y. 2002. Molecular insights into fat cell differentiation and functional roles of adipocytokines. *Endocrinol. Metab.* **17**, 1-9.
- Ko, J. H., Kwon, H. S., Yoon, J. M., Yoo, J. S., Jang, H. S., Kim, J. Y. and Kang, J. H. 2015. Effects of *Polygonatum sibiricum* rhizome ethanol extract in high-fat diet-fed mice. *Pharm. Biol.* **53**, 563-570.
- Kwon, D. H., Choi, Y. H., Kim, B. W. and Hwang, H. J.

2019. Effects of Ethanol Extract of *Sargassum horneri* on Adipocyte Differentiation and Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *J. Life Sci.* **29**, 209-214.
16. Liu, F., Kim, J. K., Li, Y., Liu, X. Q., Li, J. and Chen, X. 2001. An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake - stimulatory and adipocyte differentiation - inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *J. Clin. Nutr. Food. Sci.* **131**, 2242-2247.
17. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402-408.
18. Park, S. J., Lee, I. S., Lee, S. P. and Yu, M. H. 2013. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by supercritical fluid extracts and marc from *Cinnamomum verum*. *J. Life Sci.* **23**, 510-517.
19. Rosen, E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J. and Spiegelman, B. M. 2002. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes. Dev.* **16**, 22-26.
20. Rosen, E. D. and MacDougald, O. A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 885.
21. Song, M. Y., Bose, S. and Kim, H. J. 2013. Effect of probiotics-fermented Samjunghwan on differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *Prev. Nutr. Food. Sci.* **42**, 1-7.
22. Wang, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D. and Darlington, G. J. 1995. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* **269**, 1108-1112.

초록 : 겉삼잎국화 에탄올 추출물의 지방세포 분화 억제 효과

남건희¹ · 위지향² · 김상용² · 백지영³ · 김영민^{1*}

(¹한남대학교 생명나노대학 생명시스템학과, ²신안산대학교 식품생명과학과, ³(주)파마진)

겉삼잎국화는 한국에서 북동, 위염에 민간요법으로 사용되는 약초로 알려져있다. 하지만, 겉삼잎국화를 민간요법으로 사용되고 있으나 이 약초에 대한 연구는 거의 수행되지 않았었다. 본 연구에서는 겉삼잎국화의 의학적 효과를 증명하기 위해 항비만 관련 연구를 수행하였다. 70% 에탄올을 이용한 겉삼잎국화 추출물의 항 비만 효과에 대한 연구를 위해 3T3-L1 지방전구세포를 사용하였으며, 지방전구세포가 지방세포로 성숙하는 것을 방지하고 이에 관련된 단백질 인자의 발현을 확인하기 위해 Oil Red O 염색법과 웨스턴 블롯, PCR을 통한 mRNA 분석이 수행되었다. DM (인슐린 캅테일)을 처리하여 지방전구세포의 성숙을 유도한 후, 겉삼잎국화 에탄올 추출물을 처리한 결과, 100 μ g/ml 농도에서 지방세포 분화 억제 효과와 세포 내 트리글리세리드(TG)의 수준이 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 또한, 지방전구세포의 성숙에 관여하는 여러가지 단백질 등의 인자 발현을 또한 확인하였다. 겉삼잎국화 에탄올 추출물로 인해 PPAR γ , C/EBP α , LPL, FAS와 같은 지방 세포의 성숙을 유도하는 인자가 조절되었으며, Acetyl-CoA carboxylase, AMP-activated protein kinase (AMPK) 등과 같은 단백질의 발현도 억제하여 분자적 기전 또한 규명하였다. 결론적으로, 겉삼잎국화 에탄올 추출물은 지방전구세포의 활성화에 영향을 끼치지 않으며 지방세포로의 성숙을 유도하는 인자 및 단백질의 발현을 선택적으로 조절하여 항 비만 효과를 갖는 것으로 확인되었다.