

Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria-fermented *Chrysanthemum indicum* L. on Adipocyte Differentiation through Hedgehog Signaling

Jae Young Choi^{1,3*}, Jong Seok Lim², Bo Ram Sim² and Yung Hun Yang³

¹Department of Culinary Arts & Hotel Food Service-Major in Culinary Arts, Yeonsung University, Yanghwa-ro 37beon-gil 34, Manan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do 14011, Korea

²L.FOUNDER INC., 406, Business Incubation Seoul National University of Science & Technology 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

³Department of Biological Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Neuundong-ro 120, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea

Received March 13, 2020 / Revised June 22, 2020 / Accepted June 22, 2020

In this study, we describe the inhibition of adipocyte differentiation by the lactic acid bacteria (LAB) fermentation product of *Chrysanthemum indicum* L. (CI) extract to control obesity. Preparation of LAB-fermented products was performed to overcome the cytotoxicity of CI extract. During fermentation and 3T3-L1 cell line experiment, cytotoxicity was not induced in the CI fermentation products over 1 day in culture. Fermented materials from highly proliferative cultures were selected for treatment of 3T3-L1 cells and for comparison with unfermented control groups. Cell survival and undifferentiated cell populations were decreased differentiation population in all experimental groups compared with controls, as measured using fluorescence-activated cell sorting analysis. Akt pathway activity increased upon treatment with these fermented extracts in 3T3-L1 cells. Gli2 depleted at the protein level in association with adipocyte differentiation. LAB KCTC 3115- and 3109-fermented extract treatment caused controlled Gli2 protein accumulation. Moreover, KCTC 3115 and 3109 were found to reduce C/EBP α and FAS was depleted, whereas pACC was increased at the protein level upon treatment with the fermentation products of each of the four LAB used in this study. With *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115 fermentation, the regulation of adipose differentiation and hedgehog signaling were also suppressed, thereby inhibiting the differentiation of progenitor cells. The basis for the activation of hedgehog signaling may provide insights into the treatment of obesity and the inhibition of adipocyte differentiation.

Key words : Adipocyte, *Chrysanthemum indicum* L., fermentation, hedgehog signal, lactic acid bacteria

서 론

세계보건기구(WHO)에서 1998년에 이미 만성질환으로 규정된 비만은 음식물의 섭취(food intake)와 에너지의 사용(energy expenditure)의 불균형으로 인해 초래되는 질병이다[23]. 비만은 대부분 증상이 없으나, 당뇨병, 동맥경화, 고혈압 등 다양한 만성 질환의 원인이 된다[14]. 최근 비만 인구가 급증함에 따라 비만으로 인해 만성질환에 노출된 인구가 증가하고 있다. 더구나 이러한 현상이 사회적으로 가장 왕성하게 활동하는 사람들에게서 발병하기 때문에 경제적인 손실도 상당할 뿐만 아니라, 이의 예방과 치료를 위해 쓰여지는 비용은 의약학 및 건강 산업의 최고액에 다다를 정도의 수준이다[23].

*Corresponding author

Tel : +82-31-441-1082, Fax : +70-4275-0573

E-mail : juynay@yeonsung.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.

따라서 비만에 대한 심각성을 인식하고, 현재보다 뛰어난 타겟 물질을 근거로 새로운 약물을 개발하려는 노력은 끊임없이 계속되고 있다. 또한 비만이 대사 질환과 관련된 다양한 합병증을 유발하기 때문에 시장성과 효용 가치를 떠나 전 인류가 이 분야의 연구 성과를 기다리고 있다. 하지만 비만에 관련된 신약개발은 매우 더디며, 현재 임상에서 사용되는 비만을 포함한 대사 질환에 대한 약물은 5 종류 안팎에 머물고 있는 실정이다[18, 26].

섭취한 영양소는 중성지방(triglyceride)의 형태로 지방 조직에 축적되며, 이 순환이 반복되면 지방구세포의 비대(hypertrophy)와 과형성(hyperplasia)으로 인해 결국 비만을 초래한다[17]. 따라서 이러한 에너지의 과도한 저장을 막기 위해서는 에너지 흡수를 최소화하고 에너지 사용을 증대시키는 것이 필요하므로 지방구세포 연구는 필수 불가결하다. 특히 지방구세포 연구에서 지방 축적을 감소시키고 지방구세포의 수를 줄이는 방안을 찾아내는 것이 핵심이다.

지방구세포의 분화는 근육세포 분화나 신경세포 분화와는 달리 여러 호르몬과 다양한 전사인자들의 상호작용을 통하여 매우 복잡하게 이루어진다. 지방전구세포가 지방구세포로 분

화해 나가는 과정에는 세포의 형태적 변화와 유전자 발현양상의 변화 등이 함께 일어난다[7]. 대부분의 경우 이러한 변화는 전사단계에서 각 유전자의 발현양의 변화를 나타내는데, 지방구세포의 분화조절은 CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP), peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR), r/retinoid X receptor (r/RXR), adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element binding protein-1c (ADD1/SREBP-1c)라고 불리는 전사인자(transcription factor)가 중추적인 역할을 담당하고 있다[8, 10]. 이들 전사인자는 지방구세포 분화 과정 중 각기 다른 시점에서 발현이 유도되며 서로 상호작용을 통하여 여러 지방구세포 특이 유전자들의 발현을 조절하고, 지방대사의 활성화와 지방구세포 분화를 점진적으로 유도해 나간다.

Hedgehog 신호는 고습도치 형태의 리간드에서 불여진 이름으로 이 신호를 억제하여 암세포 저해 실험 위주의 연구가 이루어졌다. Hedgehog 신호는 줄기세포 및 분화형질을 발현하지 않은 미분화 세포인 전구세포의 주요 증식 신호전달 체계로 세포에서 분비되면 세포표면의 수용체 단백질과 결합하여 세포내 신호전달체계를 작동시킨다. 이때 발현되는 Gli2 단백질은 Gli3와 함께 hedgehog 신호의 리간드를 생성시키고 활성화시킨다. 일부 보고에서는 Gli를 조절하여 미분화된 지방전구세포를 활성화시켜 비만억제를 유도하는 연구가 진행되고 있다[9, 24].

감국(*Chrysanthemum indicum* L.)은 국화과의 여러해살이 풀로 중국, 일본, 한국 등 아시아 지역 햇볕이 잘 드는 지역에서 자란다. 감국차는 감기 예방, 두통, 장염, 변비, 관상동맥, 심장 질환 및 고혈압 치료를 위해 한약으로 널리 사용된다[12, 32]. 감국에 포함된 페놀성 화합물에는 루테올린(luteolin), 아피게닌(apigenin) 및 퀘세틴(querceetin)을 포함한 일부 플라보노이드가 존재하며, 최근 이러한 성분은 다양한 암세포주의 세포주기를 조절하고 세포사멸을 유도하는 것으로 알려졌다[13].

감국 추출물을 이용해 지방구세포 분화억제 효과를 조절하는 타겟 메커니즘에 대한 연구로는 감국 추출물 처리 농도에 따라 triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c)와 leptin이 변화를 보이고, 지방구세포 분화와 관련이 있는 전사인자 CCAAT/enhancer binding protein-a (C/EBPa)를 조절하지만, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), adiponectin 및 peroxisome proliferator-activated receptor-a (PPARa)는 조절하지 못하는 것으로 보고된 바 있다[15].

감국을 포함한 여러 허브차 경우, 대부분 차로 마시기 때문에 다양한 기능성 화합물이 천연화합물로 이루어져 그대로 인체에 쉽게 흡수되기 힘들다. 그러나 장내 미생물에 의해 구조적 변화를 일으켜 흡수될 수 있는 형태로 바뀐다면 천연화합물은 작은 분자로 분해되어 몸에서 잘 흡수될 수 있게 된다.

이것이 미생물에 의한 효소반응이며, 대표적으로 유산균에 의한 효소반응을 꼽을 수 있다[3]. 특히, 유산균은 식품발효 뿐 아니라 식품의 영양 및 흡수 개선을 위해 이용되고 있으며 유산균을 이용한 사례들이 증가하는 추세이다.

체내에 존재하는 유산균의 균주는 다양하지만 주로 이용되는 균주는 11가지(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kitasatonis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*)로 식품발효에 많이 이용되는 것으로 알려져 있다[6]. 이러한 균주를 통한 발효 시 체지방감소 및 비만억제 효과가 있는 것으로 보고되었다. 그 중에서도 특히, *Lactobacillus casei*는 녹차 추출물과 함께 발효 시 고지방식이 섭취 마우스의 혈청 중성지방 및 콜레스테롤 수치를 낮추는 것으로 보고되었다[28]. 이처럼 유산균을 이용하여 추출물을 발효한다면 지방 분해 및 억제에 효과가 있는 것을 알 수 있다. 반면, 감국 추출물이 작용하는 지방구세포 분화억제와 연관이 있는 C/EBPa와 관련된 pathway에 대한 연구는 많이 되어 있을 뿐 감국 추출물과 유산균을 활용한 감국 발효물의 hedgehog 신호 관련 지방전구세포와 지방구세포에 대한 연구는 보고되지 않았다.

이에 따라 본 연구에서는 감국 추출물과 유산균을 활용한 감국 발효물의 hedgehog 신호에 따른 지방전구세포와 지방구세포 분화에 대해 살펴보고자 감국 추출물과 감국 유산균 발효물의 지방전구세포와 지방구세포 기전, 분화 촉진 및 억제 확인과 효과의 차이점을 비교 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

감국(지상부 중 꽃잎 부분)은 서울 경동시장에서 구입하여 본 연구의 시료로 사용하였다. 감국 850.2 g을 상온에서 48시간 80% ethanol (Duksan Reagents, Ansan, Korea) 2,000 ml에서 추출하였다. 추출물은 filter paper (NO. 2, Whatman, Little Chalfont, UK)에 여과 후 45°C에서 감압, 농축 및 동결건조(MCFD8518, Ilshin Bio Base, Dongducheon, Korea) 하여 감국 동결건조분 115 g을 얻었다.

감국 추출물의 유산균 발효

유산균 11종(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3034, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3718, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074, *Lactobacillus casei* KCTC 3109, *Lactobacillus brevis* KCTC 3498, *Lactobacillus*

kitasatonis KCTC 3155, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594, *Lactobacillus fermentum* KCTC 3112)은 생물자원센터(KCTC, Jeongeup, Korea)에서 분양 받아 실험에 이용하였다.

감국 추출물을 발효시키기 위해 MRS (Conda Pronadisa, Madrid, Spain) 배지와 혼합하고(1,000 ml)를 11종의 유산균을 각각 접종하였다. 하지만 감국 추출물에 배양균과 배지를 동시에 처리시 유산균이 죽고, 발효가 안 되는 문제점이 발생하여 감국 동결건조분(40 g)을 유산균이 자란 배지에 20% (v/v)의 비율로 섞어 유산균을 감국 동결건조분 함유 배지에 적응시켰고, 발효의 적절성을 위해 pH 및 발효기간에 따른 OD₆₀₀ 값(SpectraMax i3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)을 측정하였다. 발효과정은 Fig. 1의 과정으로 진행하였으며 최종 발효된 감국 유산균 발효물은 동결건조 후 실험에 이용하였다. 미분화된 세포는 BSC, 분화 유도된 세포는 MDI, 감국 추출물 처리군은 CI, 각 유산균으로 발효된 감국 발효물 처리군은 유산균의 KCTC의 숫자로 표기하였다.

세포배양 및 세포독성 측정

3T3-L1 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 세포의 독성테스트 Cyto-X (LPS Solution, Daejeon, Korea)시약에 이용하였다. 3T3-L1 세포주를 96 well plate (SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 1×10⁴ 세포수로 10% bovine calf serum (BCS, Welgene Inc., Gyeongsan, Korea), 1% penicillin streptomycin (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)이 함유된 Dulbecco's

modified Eagle's media (DMEM, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건의 incubator (WS-180CA, World Science, Bucheon, Korea)에서 배양하였다. 12시간 배양한 뒤 감국 추출물과 감국 발효물을 250, 500 및 1,000 ppm으로 처리한 후 배양 24시간 후 각 well에 10% (v/v) 농도로 Cyto-X 시약을 첨가한 후 호일로 감싸 4시간 동일 조건에서 배양 후 450 nm 흡광도(SpectraMax i3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에서 측정하였다.

세포 분화 및 분화된 세포주의 세포독성

3T3-L1 세포주를 32 well plate (SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 3.5×10⁵ 세포수로10% BCS, 1% penicillin streptomycin가 함유된 DMEM 배지에 배양 후 95% 세포배양이 완료된 후 10 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA), 0.1 mM dexamethasone (DEX, Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)가 포함된 10% fetal bovine serum (FBS, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) 분화 배지로 교환하여 2일간 배양하였다. 2일마다 10 µg/ml insulin이 포함된 10% FBS 배지로 교환하며 감국 추출물과 감국 발효물을 250, 500 및 1,000 ppm으로 처리한다. 10일간 배양을 유지하며 Oil Red O (ORO, Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)염색 후 3T3-L1 세포주를 관찰하고 isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 용출시켜 SpectraMax i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에서 510 nm로 확인한 뒤 실험을 종료하였다.

분화된 3T3-L1 세포주의 독성테스트를 위해 1.5×10⁵ 세포수로 준비 후 pH 7.4 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)로 1회 세척 후 DPBS, 0.5% bovine serum albumin (BSA, Amresco, Solon, OH, USA), 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)로 만든 fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer 500 µl에 LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)시약 5 µl를 첨가하여 30분간 얼음에서 염색하였다. 이후 FACS buffer로 1회 세척 후 Attune ® FACS machine (Life Technologies, Darmstadt, Germany)을 이용하여 635 nm excitation 과정에서 분석하였다.

총 단백질 발현분석

3T3-L1 세포주를 60 mm 세포배양 접시(SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 4.5×10⁵ 세포수로 12시간 배양한 뒤 감국 추출물과 감국 발효물을 250, 500 및 1,000 ppm로 24시간 처리하여 세포를 수집하였다. RIPA lysis buffer (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)에 phosphatase inhibitor cocktail (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)과 protease inhibitor cocktail

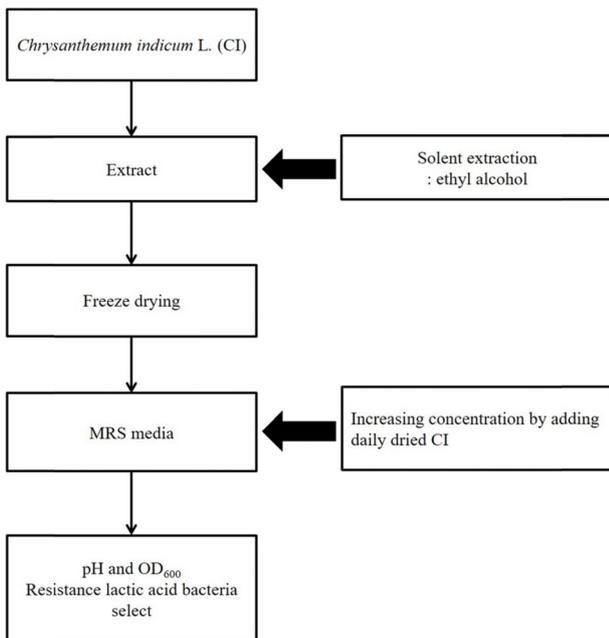


Fig. 1. Lactic acid bacterial fermentation process of *Chrysanthemum indicum* L. (CI) and resistant strain manufacturing method.

(ATTO Corporation, Tokyo, Japan)을 1×로 섞어 얼음에 1시간 동안 lysis 후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리기(Smart R17 Plus, HaniL, Daejeon, Korea)에서 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 상층액을 회수하여 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 활용하여 정량한 후 10~25 µg의 단백질을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel method를 이용하여 전기영동 하였다. Gel transfer된 단백질을 1× phosphate-buffered saline (PBS, LPS Solution, Daejeon, Korea) buffer 1,000 ml과 Tween20 (LPS Solution, Daejeon, Korea) 1 ml를 섞어 만든 PBS-T에 5% skim milk (KisanBio, Seoul, Korea)를 1시간 동안 blocking한 뒤 1차 항체를 각각 1:1,000의 농도로 12시간 4°C의 냉장실에 처리하였다. PBS-T로 3회 세척한 뒤 2차 항체를 각각 1:5,000의 농도로 실온에서 처리한 뒤 다시 PBS-T로 3회 세척 후 Amersham enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)를 이용하여 발색을 측정하였다. 항체는 anti-p21, anti-Akt, anti-PTEN, anti-C/EBPα (BioVision, Milpitas, CA, USA), anti-AMPK1, anti-pACC, anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) 및 anti-Gli2 (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA)를 이용하였다.

통계분석

모든 생리활성 실험은 3회 반복 실험을 통해 수치화했으며, 통계분석은 one-way analysis of variance (ANOVA)로 신뢰구간 p<0.05으로 검정을 실시하였다. 통계프로그램은 Graph Pad Prism 5 software (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하였다.

결과 및 고찰

감국 추출물의 유산균 발효에 따른 OD 및 pH 변화

감국 추출물 및 발효물이 갖는 지방구세포 분화 억제효과를 관찰하기 위해 감국 추출물을 이용하여 저항성 유산균의 제조와 감국 추출물에 저항성을 가진 유산균을 활용한 감국 발효물을 제작하였다. 유산균 발효 시 모든 유산균의 수치가 OD₆₀₀ 값 기준 0.2~0.3에서 0.43~0.67로 증가된 것을 확인하였으며 (Fig. 2A), pH는 7.0~7.2에서 5.0~5.7로 낮아진 것을 확인하였다 (Fig. 2B).

유산균 발효 과정에서 감국 추출물에 저항성을 가진 유산균으로 적응시키지 않으면 초기 유산균 접종 시 모두 사멸되는 것을 확인하였다. 이는 감국 추출물에 균을 사멸시키는 항균 작용이 있는 것으로 판단되며, 이를 극복하기 위해 전배양액(균주 배양액)에 감국 추출물 농도를 조금씩 증가시켜 감국 추출물에 생존하는 저항성 유산균을 제작하였다.

감국에 대한 항박테리아 활성은 이미 다양한 연구를 통해

이루어졌다. 감국의 정유(오일성분)에서 박테리아를 억제하는 헥소키나제(hexokinase), 포스포프рук토키나제(phosphofructokinase) 및 피루베이트키나제(pyruvatekinase) 등이 박테리아의 억제를 보였고, 이 같은 억제효과는 유산균에도 적용되는 것으로 보인다[16, 21].

감국 추출물 및 발효물의 세포독성

3T3-L1 세포주를 활용하여 감국 추출물 및 발효물이 갖는 세포독성을 확인하였다. 세포주의 증식을 억제하는 기전은 다양한 신호를 조절하면서 발생되며, 그 중 세포독성은 세포독성을 갖는 물질을 세포에 처리시 세포의 사멸을 유도하기 때문에 매우 중요한 요소이다. 따라서 감국 추출물 및 발효물의 세포주에 대한 세포 사멸효과를 확인하기 위해 미토콘드리아에서 배출되는 mitochondrial dehydrogenase와 반응하는 WST계열의 시약을 이용하여 세포의 증식률을 측정하였다[2]. 감국 추출물 및 발효물의 세포독성은 모두 확인되지 않았으며, 1,000 ppm 처리시 오히려 세포주의 증식을 유도하였고, 세포독성은 없었다(Fig. 3).

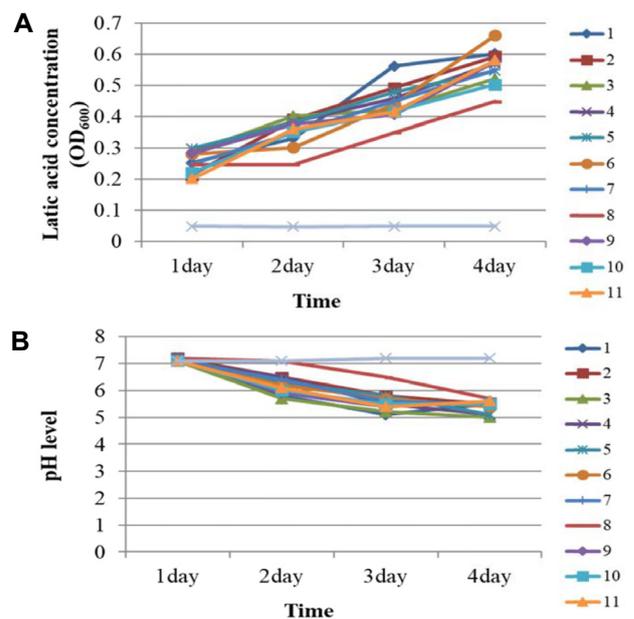


Fig. 2. Changes in lactic acid bacteria concentration and pH during the fermentation process. 1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3034; 2, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140; 3, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3718; 4, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237; 5, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115; 6, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074; 7, *Lactobacillus casei* KCTC 3109; 8, *Lactobacillus brevis* KCTC 3498; 9, *Lactobacillus kitasatonis* KCTC 3155; 10, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594; 11, *Lactobacillus fermentum* KCTC 3112. A, Lactic acid bacteria concentration calculated by OD₆₀₀; B, The pH measurement of fermented CI after incubation with lactic acid bacteria.

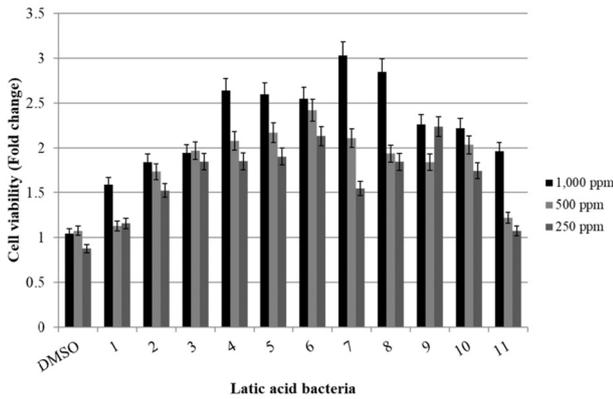


Fig. 3. Cytotoxicity effect of CI fermentation materials on the 3T3-L1 cell line. DMSO, CI solution; 1,000 ppm, 1 mg/ml; 500 ppm, 500 µg/ml; 250 ppm, 250 µg/ml. DMSO, Dimethyl sulfoxide; 1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3034; 2, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140; 3, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3718; 4, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237; 5, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115; 6, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074; 7, *Lactobacillus casei* KCTC 3109; 8, *Lactobacillus brevis* KCTC 3498; 9, *Lactobacillus kitasatonis* KCTC 3155; 10, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594; 11, *Lactobacillus fermentum* KCTC 3112.

천연물 기원 alkaloid는 세포독성이 없으면서 일부 암세포에서만 독성을 갖는 물질이 있다. Fig. 3의 결과를 통해 감국 추출물 및 발효물은 세포독성을 확인할 수 없었으며, 3T3-L1 세포주의 분화 시 감국 추출물 및 발효물을 1,000 ppm까지 처리하여도 무관할 것으로 판단된다. 특히 지방구세포 분화는 7일 이상의 분화기간을 거치는데 세포독성이 있으면 분화 시 단기간 내 세포사멸을 빠르게 유도한다. 하지만 본 실험에 이용된 감국 추출물 및 발효물은 3T3-L1 세포주의 증식을 유도하며, 일부 감국 발효물에선 3배가량의 세포증식을 보이는 것을 확인하였다. 이런 결과를 배경으로 3T3-L1세포주의 세포분화 후 세포독성, 즉 세포생존률에 대한 연구가 추가적으로 이루어졌다.

감국 추출물 및 발효물의 3T3-L1 세포주의 세포생존률을 FACS로 분석한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 미분화된 3T3-L1 세포주(undifferentiated cells)와 염색하지 않은 3T3-L1 세포주(unstained cells)의 패턴을 대조군으로 지정하여 모든 세포의 형광발현을 유도하였다. Negative control로서 undifferentiated cells 패턴을 분석하였으며, 이를 통해서 분화를 유도한 3T3-L1세포주(differentiated cells)의 side scatter (SSC)와 undifferentiated cells의 SSC가 서로 다른 패턴임을 확인하였다(Fig. 4B, Fig. 4C). 이렇게 undifferentiated cell과 differentiated cells의 SSC의 패턴이 다른 이유로는 지방전구세포가 지방구세포로의 분화과정에 따른 패턴으로 유추할 수가 있다. 지방전구세포는 지방구세포로 분화하면 세포모양이 변하는

데, 이때 지방구세포가 늘어나면서 세포소기관의 변화로 SSC가 작은 사이즈로 증가되어 Q8 (4분면 왼쪽아래)의 구성이 증가된다.

FACS 분석에서 Q8의 분포를 통해 감국 추출물을 포함한 모든 발효물에서 지방구세포의 감소를 확인하였다(Fig. 4D, Fig. 4E, Fig. 4F, Fig. 4G, Fig. 4H). 특히, 감국 추출물을 포함한 4가지 감국 발효물에서 나타난 SSC 패턴은 undifferentiated cells SSC의 패턴과 유사했다. 이러한 결과는 감국 추출물과 감국 발효물이 3T3-L1 세포주의 지방구세포로의 분화를 억제한 것으로 사료된다. 또한, Q7 (4분면 오른쪽아래)의 분포로 세포의 독성을 보이는 패턴이 감국 추출물 대비 KCTC 3074와 KCTC 3109를 이용한 감국 발효물에서 월등히 감소되었다. 이 같은 패턴은 세포의 분화 과정에서 좀 더 복잡한 구조를 갖는 세포소기관의 형성으로 발생하는 현상으로 보이며[31], 분석을 통해 분화억제가 얼마나 유도되는지 확인 할 수 있는 메커니즘이라고 판단되며, 이를 뒷받침하기 위해 Gli2의 발현을 분석했다.

감국 추출물 및 발효물의 Akt조절과 지방구세포 분화

세포분화 과정에서 장시간 분화를 조절하는 기전인 cyclin D1, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3k)/Akt 및 mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) 등 다양한 기전이 존재한다. 이 중 Akt는 peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPARγ)와 C/EBP α의 상위를 조절하여 지방구세포 형성에 중요한 역할을 한다 [11, 29]. Akt 활성화가 결여된 섬유아세포 또는 Akt 활성화가 억제된 지방전구세포에서 낮은 Akt 활성은 지방구세포의 분화를 억제한다[5]. Western blot을 통해 감국 추출물과 발효물의 phosphatase and tensin homolog (PTEN)-Akt-p21로 이어지는 Akt pathway 활성의 증가를 확인하였다(Fig. 5A). 하지만 예측한 결과와 다르게 3T3-L1 세포주의 지방구세포로 분화 유도 시 감국 추출물과 발효물을 첨가하면 지방구세포로의 분화를 억제할 뿐 아니라 이미 분화된 지방구세포의 감소도 확인하였다(Fig. 5D). 이 같은 원인은 세포의 증식을 조절하는 Akt 이외의 세포신호가 지방구세포의 분화를 억제하는 것이라 추측 할 수 있다.

위 결과를 토대로 지방전구세포를 조절하는 다양한 신호 기전을 확인하였다(Fig. 5). 3T3-L1 세포주는 지방전구세포로 지방구세포로의 기능적인 역할을 하기 위해서 지방구세포로 분화 시 활성화되는 wnt/β-catenin, notch 및 hedgehog 신호는 세포의 유전자 발현 또는 세포의 성장과 관련하여 다른 신호경로와 함께 작동된다고 보고된 바 있다[19]. 지방전구세포에서 이러한 신호의 감소는 분화시기에 많이 발생하며, 다양한 연구에서 세포의 조절에 제어 역할을 하는 것으로 발표되었다. Fig. 5D의 결과는 감국 추출물 및 발효물의 처리가 3T3-L1 세포주의 분화를 조절하는 신호에 영향을 주었을 것이

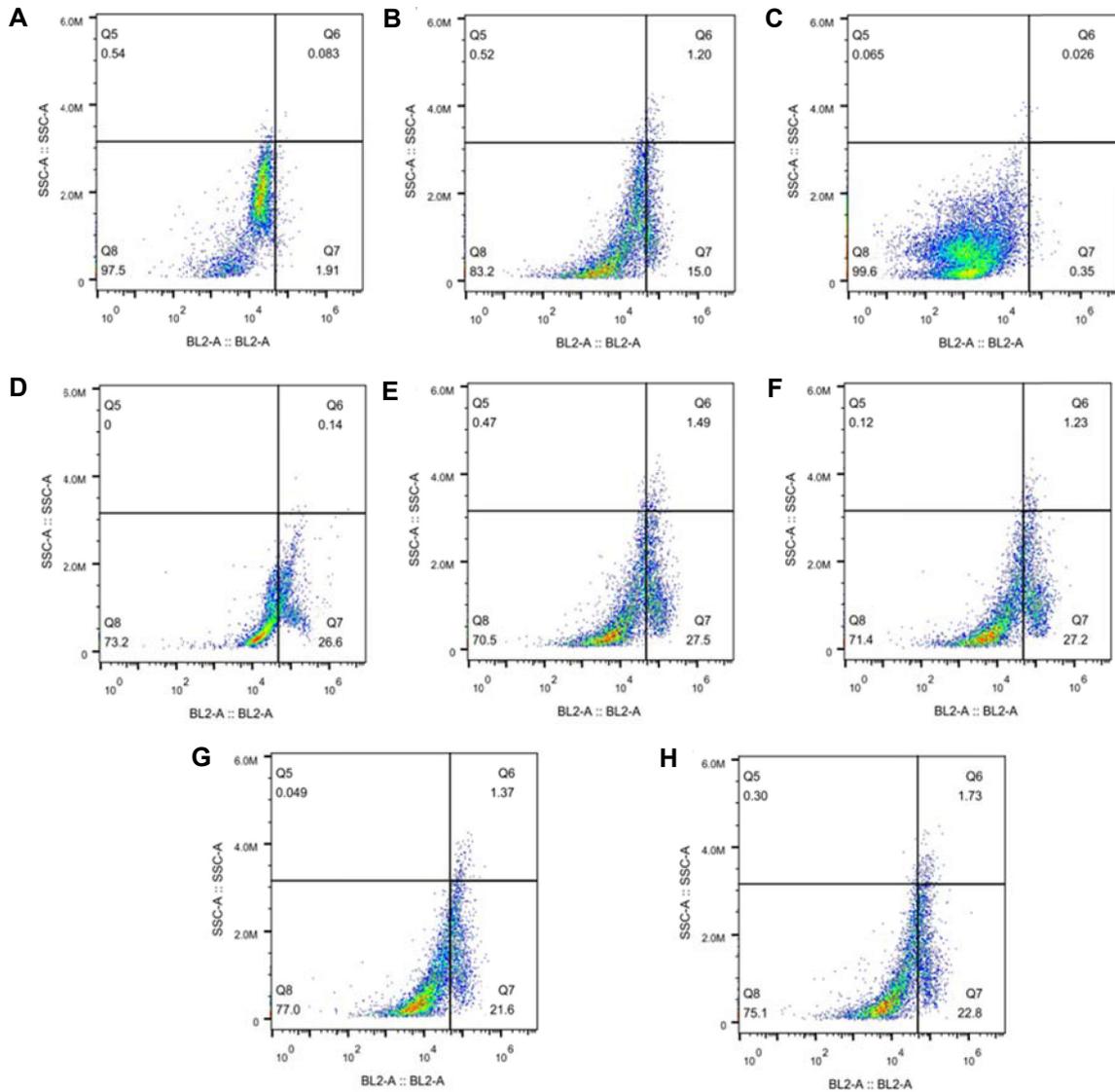


Fig. 4. Live and dead cells distinguished by flow cytometry of cultures incubated with CI fermentation materials. SSC, side scatter; BL2, fixable dead cells. A. Unstained cells; B. Undifferentiated cells; C. Differentiated cells; D. Differentiated and CI-treated cells; E. Differentiated and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115 + CI-treated cells; F. Differentiated and *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237 + CI-treated cells; G. Differentiated and *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074 + CI-treated cells; H. Differentiated and *Lactobacillus casei* KCTC 3109 + CI-treated cells.

라 사료된다. 따라서 지방전구세포의 분화 신호와 hedgehog 신호와 관련이 있음을 확인하고자 하였다.

감국 발효물의 hedgehog 신호의 조절을 통한 지방구세포 분화 억제

Hedgehog 신호는 1980년 초파리에서 발견되어 척추동물에서 3가지 타입의 유전자 상동체가 발견되었다[30]. Sonic hedgehog (Shh), indian hedgehog (Ihh) 및 desert hedgehog (Dhh)의 3가지 타입 중 Shh가 리간드 중 가장 광범위하게 발견되며, 특히 배아 발달에 필수적인 역할을 한다. 리간드와 결합된 12개의 막단백질로 이루어진 patched1 (PTCH1)과 결

합하여 억제된 단백질인 smoothened (SMO)를 유동적으로 조절하고, suppressor of fused (SUFU)가 Glioma-associated oncogene (Gli) 전사 인자(Gli1, Gli2 및 Gli3)를 핵으로 이동할 수 있게 불활성화시켜 이후 타겟 유전자를 전사시킨다[20]. 척추동물에는 존재하는 Gli 전사 인자 중 Gli1, Gli2는 Shh 리간드 비 의존적 자극에 활성화될 수 있기 때문에 이를 표적화하는 다양한 분자경로적 연구가 진행되었다[22].

Western blot을 통한 실험결과에서 Gli2의 발현은 분화대조군(MDI) 대비 감국 추출물(CI), KCTC 3115, KCTC 3237 및 KCTC 3074에서 증가하였으며(Fig. 5B), 3T3-L1 세포주의 지방구세포 분화를 보여주는 ORO염색 결과에서도 감국 추출물과

KCTC 3115, KCTC 3237 및 KCTC 3074에서 분화가 억제되었다(Fig. 5D). 반면, 3T3-L1 세포주의 지방구세포 분화가 증가되면서 Gli2의 발현은 낮아지는 것을 확인하였다(Fig. 5B, Fig. 5D). 다만 KCTC 3109의 억제효과는 hedgehog pathway가 아닌 다른 신호에 의한 영향으로 보인다. Fig. 5의 결과로 독성이 없고 농도의존적으로 3T3-L1 세포주의 지방구세포 분화 억제를 보였던 4가지 유산균 중 hedgehog을 가장 잘 조절하는 유산균은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115 및 *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237인 것을 확인하였다.

Hedgehog 신호는 지방구세포와 암세포 사이에서 전혀 다른 경향으로 보고된다[1, 27]. 암세포는 정상세포의 변이로 인해 발생한 세포로 체내에 존재하는 동안 기능손실을 야기시킨다. 그리고 각 기관의 구조에 침투하여 혈액 내 이동 하기 때문에 전이가 발생되어 생명을 위협한다. 반면 지방구세포는 지방전구세포에서 분화를 통해 형성되기 때문에 지방전구세포의 분화 억제는 지방구세포의 감소와 밀접하게 연결되어

있다[4].

암세포에서 hedgehog 신호가 억제되어 세포의 사멸을 유도하기 때문에[1], hedgehog 신호를 조절하는 인자는 암세포 초점을 맞춰 hedgehog 신호를 억제시키는 약물로 이미 개발이 되었다. 따라서, 지방전구세포 초점에서 hedgehog 신호의 증가가 지방구세포 분화를 억제 및 조절할 수 있기 때문이라는 비만에 대한 또 다른 대안으로 볼 수 있다.

감국 발효물의 lipogenesis 신호의 조절을 통한 지방구세포 분화 억제

지방구세포 분화와 관련된 다양한 신호기전은 서론에서 언급한 바와 같이 C/EBP, PPAR, r/RXR, ADD1/SREBP 1C 등이 존재한다. 특히 C/EBP α 와 PPAR γ 는 서로 발현의 차이를 조절하는 상보적인 역할을 한다[25]. 지방구세포 분화를 억제하는 신호에서 AMP-activated protein kinase (AMPK), acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS) 및

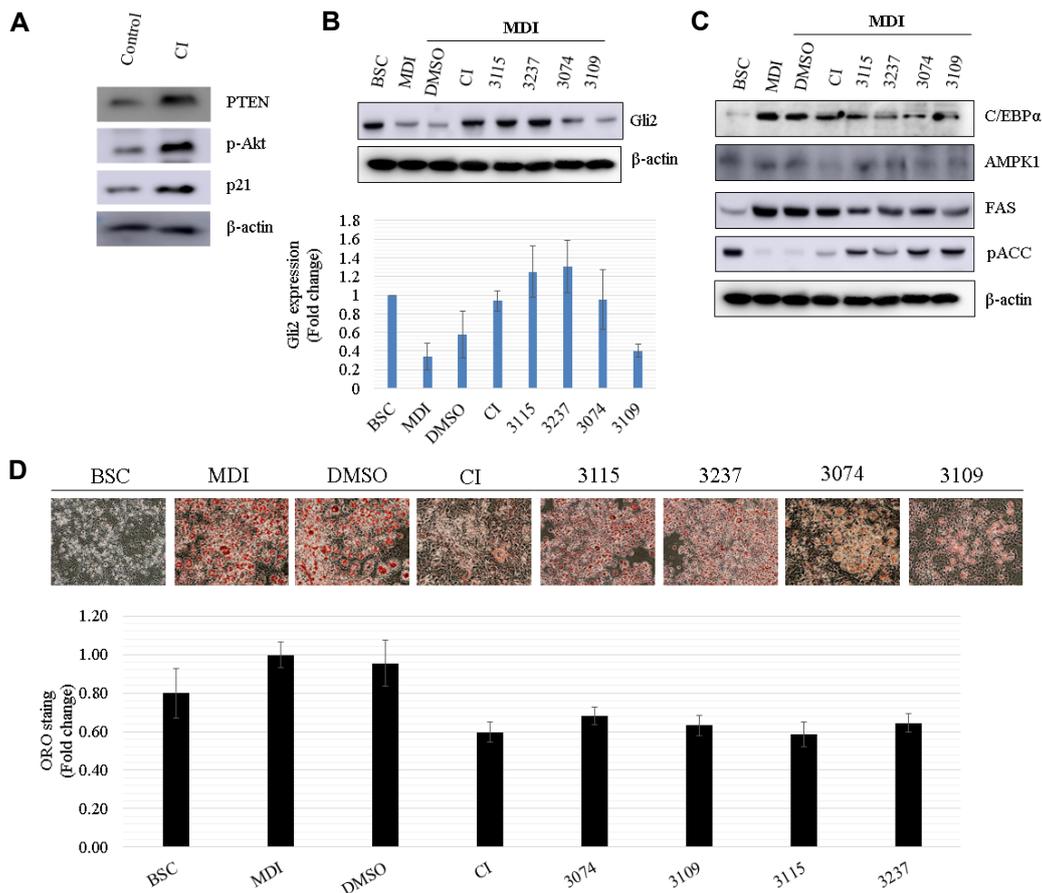


Fig. 5. Hedgehog pathway control of CI fermentation materials on the inhibition of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. 3115, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115 + CI-treated cells; 3237, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237 + CI-treated cells; 3074, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074 + CI-treated cells; 3109, Differentiated and *Lactobacillus casei* KCTC 3109 + CI-treated cells. A, Western blot analysis of proliferation related-signal proteins; B, Western blot analysis of hedgehog pathway protein Gli2; C, Western blot analysis of lipogenesis pathway proteins; D, Phase-contrast microscopic images of Oil-Red-O-stained 3T3-L1 cells 10 days after incubation with induction medium.

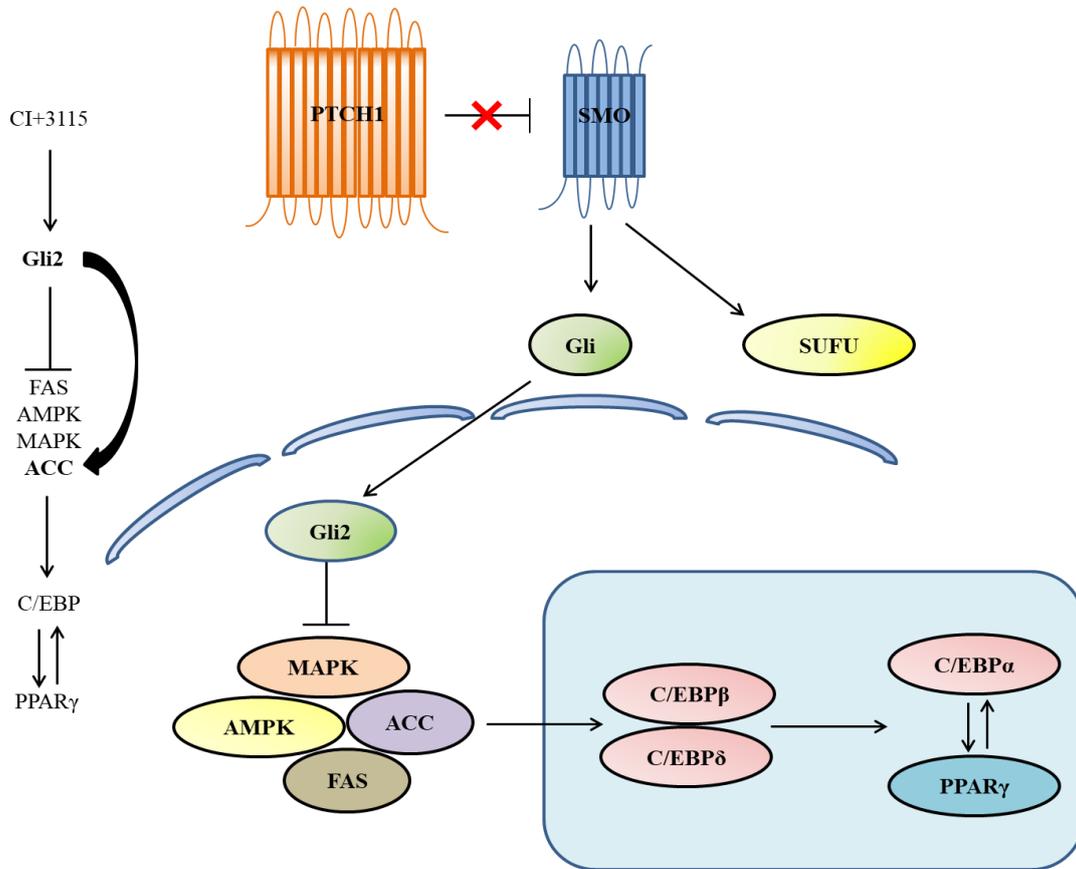


Fig. 6. Schematic representation of inhibition of adipocyte differentiation by CI fermentation materials through PTCH1-Gli2- mediated downregulation of lipogenesis.

C/EBPα를 타겟으로 확인하였고, 분화와 관련된 단백질 수준에서 4가지 유산균 모두 C/EBPα 및 FAS, AMPK1을 감소시키고, phosphor acetyl-CoA carboxylase (pACC)를 효과적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 특히 KCTC 3115, KCTC 3074 및 KCTC 3109에서 pACC가 강하게 증가하는 것을 알 수 있다 (Fig. 5C). Fig. 5C의 결과를 토대로 4가지 유산균 중 효과적으로 3T3-L1 세포주의 지방구세포 분화 신호를 조절하는 유산균은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115, *Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans* KCTC 3074, *Lactobacillus casei* KCTC 3109인 것을 확인하였다.

따라서 감국 추출물과 4가지 유산균 발효물 중 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115 발효물이 지방구세포 분화 신호와 지방전구세포에서의 hedgehog 신호를 같이 조절하여 효과적으로 지방구세포 분화를 억제하는 것으로 알 수 있다. 다만, 분화 후 세포독성이 감국 추출물과 비슷하게 유지되어 있는 문제를 해결하기 위해서는 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115 발효물과 같이 hedgehog 신호를 조절하면서 지방구세포 분화를 억제하는 단일물질에 대한 추가연구가 필요할 것으로 판단된다(Fig. 6). 더불어 감국 추출물과 감국 발효물의 생리활성 물질 중 향후 메커니즘 분석을 위한 활성물질에 대한 자료

가 추가 되어야 할 것으로 여겨지며, 본 연구의 결과로 감국 추출물 및 감국 발효물이 hedgehog 신호조절을 통해 지방전구세포 분화 및 지방구세포 분화억제를 조절하는 새로운 비만 치료제로 개발될 가능성을 제시하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다(과제번호 119116-1).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Carpenter, R. L. and Ray, H. 2019. Safety and tolerability of sonic hedgehog pathway inhibitors in cancer. *Drug Saf.* **42**, 263-279.

2. Chamchoy, K., Pakotiprapha, D., Pumirat, P., Leartsakulpachich, U. and Boonyuen, U. 2019. Application of WST-8 based colorimetric NAD (P) H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochem.* **20**, 4.
3. De Pasquale, I., De Pasquale, I., Pontonio, E., Gobetti, M. and Giuseppe Rizzello, C. 2020. Nutritional and functional effects of the lactic acid bacteria fermentation on gelatinized legume flours. *Int. J. Food Microbiol.* **316**, 108426.
4. Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Yuan Wang, Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., Garrido, I., Escourrou, G., Valet, P. and Muller, C. 2011. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *J. Cancer Res.* **71**, 2455-2465.
5. Guo, L. X., Chen, G., Yin, Z. Y., Zhang, Y. H. and Zheng, X. X. 2019. p-Synephrine exhibits anti-adipogenic activity by activating the Akt/GSK3 β signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J. Food Biochem.* **43**, e13033.
6. Gupta, R., Jeevaratnam, K. and Fatima, A. 2018. Lactic acid bacteria: probiotic characteristic, selection criteria, and its role in human health (A review). *J. Emerg. Technol. Innov. Res.* **5**, 411-423.
7. Gustafson, B., Nerstedt, A. and Smith, U. 2019. Reduced subcutaneous adipogenesis in human hypertrophic obesity is linked to senescent precursor cells. *Nat. Commun.* **10**, 2757.
8. Hildreth, K., Overby, H., Kodani, S., Morisseau, C., Hammock, B., Bettaieb, A. and Zhao, L. 2019. Soluble epoxide hydrolase inhibitor t-AUCB promotes murine brown adipogenesis: role of PPAR gamma and PPAR alpha (P21-069-19). *Curr. Dev. Nutr.* **3**, nzz041.P21-069-19.
9. Ingham, P. W., Nakano, Y. and Segar, C. 2011. Mechanisms and functions of hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 393-406.
10. Jemai, R., Drira, R., Makni, M., Fetoui, H. and Sakamoto, K. 2020. Colocynth (*Citrullus colocynthis*) seed extracts attenuate adipogenesis by down-regulating PPAR γ /SREBP-1c and C/EBP α in 3T3-L1 cells. *Food Biosci.* **33**, 100491.
11. Jiang, T., Shi, X., Yan, Z., Wang, X. and Gun, S. 2019. Isoimperatorin enhances 3T3-L1 preadipocyte differentiation by regulating PPAR γ and C/EBP α through the Akt signaling pathway. *Exp. Ther. Med.* **18**, 2160-2166.
12. Jiang, Y., Ji, X., Duan, L., Ye, P., Yang, J., Zhan, R., Chen, W. and Ma, D. 2019. Gene mining and identification of a flavone synthase II involved in flavones biosynthesis by transcriptomic analysis and targeted flavonoid profiling in *Chrysanthemum indicum* L. *Ind. Crops Prod.* **134**, 244-256.
13. Jung, C. H., Han, A. R., Chung, H. J., Ha, I. H. and Um, H. D. 2019. Linarin inhibits radiation-induced cancer invasion by downregulating MMP-9 expression via the suppression of NF- κ B activation in human non-small-cell lung cancer A549. *Nat. Prod. Res.* **33**, 3582-3586.
14. Kahan, S. and Manson, J. E. 2019. Obesity treatment, beyond the guidelines: practical suggestions for clinical practice. *JAMA* **321**, 1349-1350.
15. Lee, J., Moon, J., Kim, Y., Lee, B., Choi, S., Song, B., Kim, D. and Lee, Y. 2019. Effect of enzymatic treatment of *Chrysanthemum indicum* linné extracts on lipid accumulation and adipogenesis in high-fat-diet-induced obese male mice. *Nutrients* **11**, 269.
16. Lin, L., Mao, X., Sun, Y., Rajivgandhi, G. and Cui, H. 2019. Antibacterial properties of nanofibers containing chrysanthemum essential oil and their application as beef packaging. *Int. J. Food Microbiol.* **292**, 21-30.
17. Meln, I., Wolff, G., Gajek, T., Koddebusch, J., Lerch, S., Harbrecht, L., Hong, W., Bayindir-Buchhalter, I., Kronic, D., Augustin, H. G. and Vegiopoulos, A. 2019. Dietary calories and lipids synergistically shape adipose tissue cellularity during postnatal growth. *Mol. Metab.* **24**, 139-148.
18. Paccosi, S., Paccosi, B., Cresci, B., Pala, L., Maria Rotella, C. and Parenti, A. 2020. Obesity therapy: how and why? *Curr. Med. Chem.* **27**, 174-186.
19. Patel, V. B., Gyamfi, D., Awuah, E. O., Owusu, S., Carreiro, A. L., Buhman, K. K., Quin, C., Gibson, D. L., Andrade, I., Snotos, L., Ramos, F., Arashiki, N., Takakuwa, Y., Lin, P., Zhou, D. H., Park, C. Y., Han, S. N., Norde, M. M., Oki, E., Rogero, M. M., Gao, R., Chilibeck, P. D., Xiang, M. S. W., Tan, J. K., Macia, L., Rincon, A., Garcia-Puente, L., Lopez-Gomez, J. M., Enkhmaa, B., Berglund, L., Pase, C. S., Burger, M. E., Matz-Soja, M., Yahfoufi N., Amine, Z. E., Mauger, J., Imbeult, P., Lopes, P. A., Prstana, J. M., Coelho, D., Madeira, M. S., Alfaia, C. M., Prates, J. A. M., Iwanoto, S., Bhandari, S., Choe, S., Tejada, S., Martorell, M., Capo, X., Tur, J. A., Pons, A. and Sureda, A. 2018. The molecular nutrition of fats, pp. 201-212. In: Matz-Soja, M. Hedgehog Signaling and Liver Lipid Metabolism. Academic Press: Cambridge, MA, USA.
20. Pession, A., Lonetti, A., Bertuccio, S., Locatelli, F. and Masetti, R. 2019. Targeting hedgehog pathway in pediatric acute myeloid leukemia: challenges and opportunities. *Expert Opin. Ther. Targets* **23**, 87-91.
21. Rajanna, L., Santhosh Kumar, N., Suresha, N. S. and Lavanya, S. 2019. Antibacterial activity of floral petals of some angiosperms. *Eur. J. Med. Chem.* **30**, 1-5.
22. Rimkus, T. K., Carpenter, R. L., Qasem, S., Chan, M. and Lo, H. W. 2016. Targeting the sonic hedgehog signaling pathway: review of smoothened and GLI inhibitors. *Cancers* **8**, 22.
23. Rubinstein, M. and Low, M. J. 2017. Molecular and functional genetics of the proopiomelanocortin gene, food intake regulation and obesity. *FEBS Lett.* **591**, 2593-2606.
24. Shi, D., Lv, X., Zhang, Z., Yang, X., Zhou, Z., Zhang, L. and Zhao, Y. 2013. Smoothened oligomerization/higher order clustering in lipid rafts is essential for high hedgehog activity transduction. *J. Biol. Chem.* **288**, 12605-12614.
25. Sohn, E. J., Jung, D. B., Lee, J., Yoon, S. W., Won, G., Ko, H. S. and Kim, S. H. 2015. CCR4-NOT2 Promotes the differentiation and lipogenesis of 3T3-L1 adipocytes via upregulation of PPAR γ , C/EBP α and inhibition of P-GSK3 α/β and β -Catenin. *Cell Physiol. Biochem.* **37**, 1881-1889.
26. Steinberg, G. R. and Carling, D. 2019. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 527-551.

27. Virca, N. J. and O'Donnell Jr, F. E. 2019. Treatment of lung cancer using hedgehog pathway inhibitors. US Patent 10,328,072 B2.
28. Wang, L. C., Pan, T. M. and Tsai, T. Y. 2018. Lactic acid bacteria-fermented product of green tea and *Houttuynia cordata* leaves exerts anti-adipogenic and anti-obesity effects. *J. Food Drug Anal.* **26**, 973-984.
29. Wang, N., Li, Y., Li, Z., Ma, J., Wu, X., Pan, R., Wang, Y., Gao, L., Bao, X. and Xue, P. 2019. IRS-1 targets TAZ to inhibit adipogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through PI3K-Akt and MEK-ERK pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **849**, 11-21.
30. Xia, T., Zhang, H., Zhang, L., Yang, X., Sun, G., Chen, J., Xu, D. and Zhao, C. 2019. Comparative and evolutionary analysis of the reptilian hedgehog gene family (Shh, Dhh, and Ihh). *PeerJ* **7**, e7613.
31. Xiao, L., Yang, X., Lin, Y., Li, S., Jiang, J., Qian, S., Tang, Q., He, R. and Li, X. 2016. Large adipocytes function as antigen-presenting cells to activate CD4⁺ T cells via upregulating MHCII in obesity. *Int. J. Obes.* **40**, 112-120.
32. Zhong, L., Yuan, Z., Rong, L., Zhang, Y., Xiong, G., Liu, Y. and Li, C. 2019. An optimized method for extraction and characterization of phenolic compounds in *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* flower. *Sci. Rep.* **9**, 7745.

초록 : 감국의 유산균 발효물이 hedgehog 신호를 통한 지방구세포 분화 억제효과

최재영^{1,3*} · 임종석² · 심보람² · 양영현³

(¹연세대학교 호텔외식조리과, ²㈜엘파운더, ³건국대학교 생물공학과)

본 연구는 지방감소를 위한 소재개발로 감국 유산균 발효물이 갖는 지방구세포 분화 억제효과를 관찰하였다. 감국 추출물의 세포독성을 극복하는 유산균의 발효물을 제작하였다. 3T3-L1 세포주에서 감국 추출물 및 발효물이 갖는 세포독성은 모두 없었다(1day culture). 감국 추출물 처리 대조군과 비교하여 3T3-L1 세포주에 처리시 증식 유도된 발효물을 선별하였다. 감국 추출물 및 발효물의 분화억제 및 세포생존률 FACS분석은 분화 유도된 세포가 모든 실험군에서 줄어들었다. 3T3-L1 세포주에서 감국 추출물과 발효물 처리가 protein kinase B (Akt) pathway 활성이 증가하였고, 단백질 발현은 지방구세포로 분화되면서 Gli2의 수준은 감소하였다. Hedgehog를 조절하는 유산균은 KCTC 3115인 것을 알 수 있었다. 분화와 관련된 KCTC 3115 및 KCTC 3109 발효군에서 단백질 수준에서 C/EBP α 및 FAS를 감소, pACC는 증가시키는 것을 확인하였다. 감국 추출물과 4개의 감국 유산균 발효물 중 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115 발효물이 지방구세포 분화 신호를 더 효과적으로 조절하고, hedgehog 을 같이 조절하여 지방구세포의 분화를 억제하는 것을 알 수 있었다. Hedgehog 신호를 조절하면서 분화를 억제하는 물질에 대한 연구가 더 필요할 것으로 판단된다. 따라서 감국 발효물의 생리활성 물질 중 향후 매커니즘 분석을 위한 활성물질의 자료가 더 필요할 것으로 여겨지며, 감국 추출물 및 감국 발효물의 hedgehog 신호조절이 새로운 비만치료제로 개발될 수 있음을 위한 가능성을 제시하고자 한다.