

Leaves of *Cudrania tricuspidata* on the Shoot Positional Sequence Show Different Inhibition of Adipogenesis Activity in 3T3-L1 Cells

Ju Ha Park, Lu Guo, He Mi Kang, Beung Gu Son, Jum Soon Kang, Yong Jae Lee, Young Hoon Park, Byoung Il Je and Young Whan Choi*

Development of Horticultural Bioscience, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Received December 8, 2020 / Revised January 26, 2021 / Accepted January 29, 2021

This study aimed to evaluate the anti-obesity effects of *Cudrania tricuspidata* leaf extract in the order of leaf development on the shoot (L0, L1, L2, L3, L4, and L5). The leaves at the apex of a *Cudrania tricuspidata* shoot were classified as L0; the next leaves of the apex were classified as L1, L2, L3, and L4 from highest to lowest; and the lowest leaf was classified as L5. A series of 70% ethyl alcohol leaf extracts were screened for the inhibitory effects of adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. We found that the apical leaf extract of *Cudrania tricuspidata* (CTL0) was the most effective. Next, a study was conducted on the inhibitory action mechanism of CTL0. Treatment with CTL0 significantly suppressed the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in a dose-dependent manner, as confirmed by the decrease in lipid droplet content observed with Oil Red O staining. Treatment with 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, and 50 µg/ml of CTL0 significantly reduced the lipid droplet content. Glucose and cellular triglyceride concentrations were reduced in the 3T3-L1 cells on the CTL0-treated medium compared to the differentiation medium (DM control, DMEM + insulin + dexamethasone + rosiglitazone). Compared with DM, CTL0 significantly inhibited the expression of key pro-adipogenic transcription factors, including peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), LPL, A-FABP, and Glut4. These findings show that CTL0 extract has potent anti-obesity effects.

Key words : 3T3-L1, A-FABP, *Cudrania tricuspidata*, obesity, PPAR γ

서 론

비만은 세계적으로 가장 빠르게 증가하고 있는 심각한 질병으로서, 우리나라의 국민건강영양조사 자료에 의하면 19세 이상 성인비만(체질량 지수(BMI) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) 유병율이 남성은 약 40%, 여성은 26%라고 하였으며[26], 2030년에는 남성은 62%, 여성은 37%에 달할 것으로 예측하였다[3]. 비만의 주요 원인은 부적절한 식습관, 에너지의 섭취와 소비의 불균형, 지방섭취량의 증가, 내분비계 장애, 유전적인 원인, 운동 부족 및 스트레스 등으로 인해서 지방조직이 과잉 축적되면 비만이 가속화되는 것으로 알려져 있다[20]. 이러한 비만은 지방세포 수와 크기의 증대 등으로 인한 지방 조직의 증가를 의미하며[15], 비만과 연관된 질병인 제2형 당뇨, 고혈압, 암, 심혈관 질환 등의 위험도를 크게 증가[20]시키는 것으로 알려져 있다. 비만조절에 관한 연구는 전구지방세포인 mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocyte에 insulin, dexamethasone 및 rosiglita-

zone를 처리하여 지방세포로 분화시킨 다음[11, 12] 비만연구에 활용하고 있다. 비만의 예방 및 치료제 개발에 대한 사회적 관심도가 증가하면서 인체의 건강에 유익한 식물유래 화합물[29]을 이용한 기능성 소재개발에 관한 연구가 다양하게 수행되고 있다[27].

꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*)은 낙엽교목으로 뽕나무과(Moraceae)에 속하며, 한국, 일본, 중국 등지에 주로 분포하고 있다. 잎은 한방에서 폐결핵, 만성요통, 타박상 및 급성관절염 등의 치료[24]에 사용되며, 민간요법에서는 꾸지뽕을 다려서 마시면 간암치료에 효과적인 것으로 알려져 있다[36]. 이러한 꾸지뽕의 약학 및 경제적 가치로 인해서 다양한 연구를 수행하였는데, 잎과 뿌리 껍질의 성분인 prenylated xanthenes과 플라보노이드는 항염증[16], 항종양[21], 간 보호[1], 신경 보호[22] 및 항응고[37] 등에 효과가 있는 성분으로 밝혀졌다. 또한 줄기 껍질의 주요성분인 hydroxybenzyl flavonoid glycosides는 항종양[23], 과일 주요성분인 prenylated isoflavonoids과 benzylated flavonoids는 항염증과 항산화 활성[13]이 높다고 하였다. 이 외에도 꾸지뽕에는 kaempferol, kaempferol 7-O- β -D-glucopyranoside, kaempferide 7-O- β -D-glucopyranoside, naringenin 7-O- β -D-glucopyranoside [28], 6,8-p-hydroxybenzenyltaxifolin, 8-p-hydroxybenzenyltaxifolin, 6-p-hydroxybenzenyltaxifolin [8] 등이 보고되었다.

기존의 연구 결과에서는 꾸지뽕의 뿌리, 잎 및 줄기 등의

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5522, Fax : +82-55-350-5529

E-mail : ywchoi@pusan.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.

식물체 기관별 주요 성분, 다양한 약리작용 및 활용방법 등에 대한 연구들이 보고되었으나, 신초에 부착되어 있는 잎의 위치가 비만억제에 관련되어 있다는 연구는 현재까지 보고된 바 없었다. 따라서 본 연구에서는 꾸지뽕 신초에 부착된 잎을 정단에서 기부까지 순차적으로 6등분으로 분류한(L0, L1, L2, L3, L4, L5) 다음 70% 에틸알콜 추출물에 대하여 항비만 효과를 조사하였다. 그 결과 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물이 가장 효과가 좋다는 것을 확인하였으며, CTL0가 지방세포의 분화 억제작용에 미치는 영향을 규명하고자 본 연구를 수행하게 되었다.

재료 및 방법

꾸지뽕 잎 추출물의 제조

본 시험에 사용된 꾸지뽕의 잎은 부산대학교 부속농장에서 재배한 것을 2018년 8월 중순에 채취하여 실험의 재료로 사용하였다. 신초에 부착된 정단의 잎을 L0로하고 중간 잎을 정

단에서부터 순서대로 L1, L2, L3, L4 및 가장 기부의 잎을 L5로 분류하여 시료로 채취하였다(Fig. 1C). 각각의 잎을 70℃ 열풍 건조기에서 건조시킨 후 70% 에틸알콜(Fisher scientific, Waltham, MA, USA)로 추출하여 회전증발기로 용매를 완전히 증발시킨 후 냉동 보관하여 사용하였다. 꾸지뽕 잎 추출물의 처리는 분화 유도된 3T3-L1 세포에 50, 100 µg/ml로 처리하여 지방 세포의 증식을 조사하였다.

3T3-L1 지방전구세포 배양 및 지방세포로의 분화유도

실험에 사용된 mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocyte는 한국세포주은행(KCLB; Korean Cell Line Bank, 서울대학교 의과대학 암연구소, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ incubator에서 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (v/v) (FBS) (Welgene, Gyeongsan-si, Korea), 25 mM NaHCO₃ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 및 25 mM HEPE (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 100

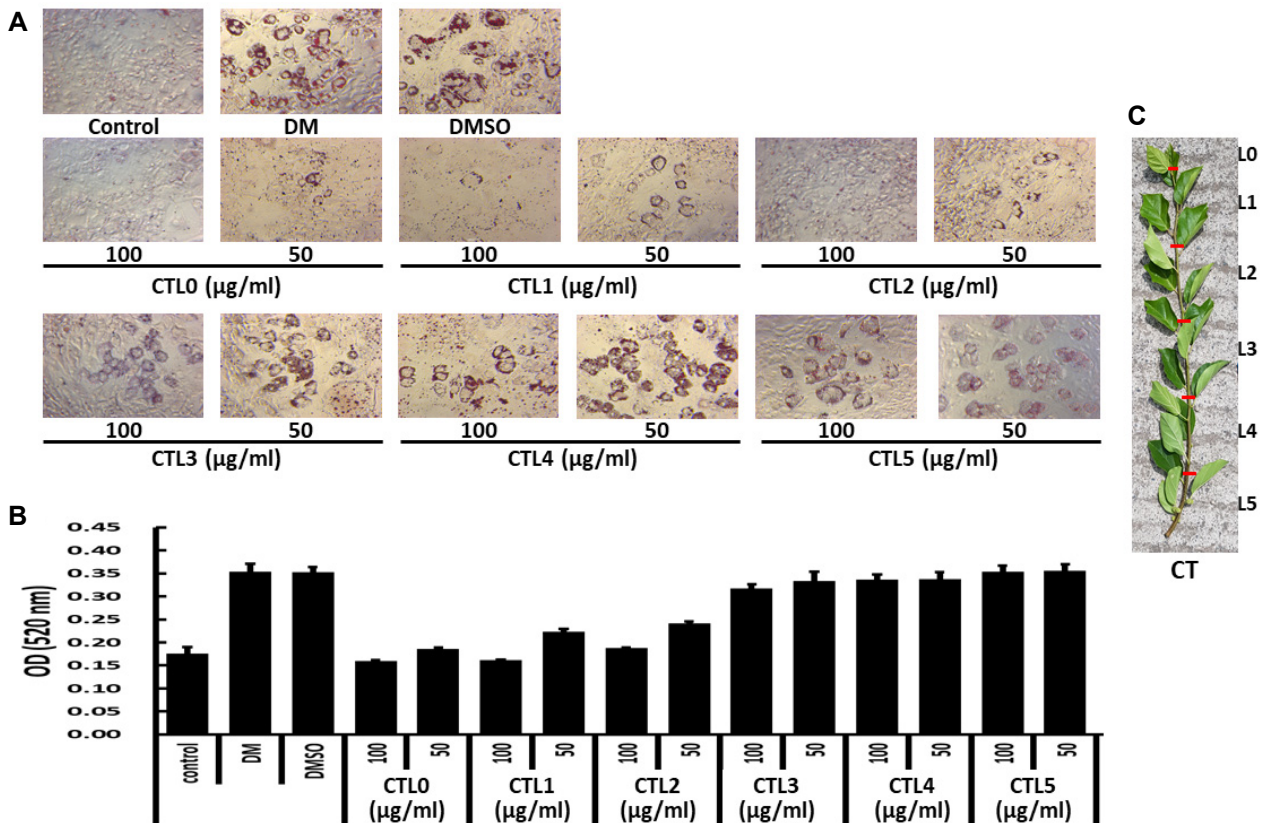


Fig. 1. *Cudrania tricuspidata* leaf extracts were inhibited adipogenesis in 3T3-L1 cell line. 3T3-L1 cell line was cultured in DMEM containing 10% FBS, 25 mM NaHCO₃, and 25 mM HEPES (culture medium, Control) and adipogenesis was induced in the cells using culture medium containing 10 µM rosiglitazone, 10 µg/ml insulin, and 1 µM dexamethasone (differentiation medium, DM). DMSO or leaf extracts were dissolved in DMSO was added to the medium during the whole inducing period. Images were captured after oil red O staining on day 8 (A). OD value of each sample at 520 nm was measured using an ELISA reader (B). The leaves at the apex of *Cudrania tricuspidata* shoots were classified as L0, the next leaves as L1, L2, L3, L4 in order from the apex, and the lowest leaf as L5 (C). Values represent mean ± SD (n=3).

units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (P/S) (Welgene, Gyeongsan-si, Korea)이 포함된 배지에서 배양하였다. 세포의 배양은 90% 이상 confluence된 세포를 phosphate buffered saline solution (PBS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 씻어내고 trypsin-EDTA (Welgene, Gyeongsan-si, Korea)를 처리하여 세포를 모은 후 계대배양하고 배지를 2일 간격으로 교환하였다. 지방세포 분화는 DMEM에 10% fetal bovine serum (FBS), P/S, 10 µg/ml insulin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 1 µM dexamethasone (Dex) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 10.0 µM rosiglitazone (ROS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)가 첨가된 분화배지(DM)에 세포를 seeding하여 48-well plates에서 지방 세포로 유도하였다. 그 후 2일마다 분화배지 또는 꾸지뽕 잎 추출물이 첨가된 배지로 교환하였으며, 8일까지 분화시켰다. 꾸지뽕 잎의 분화억제 효과를 조사하기 위해서 분화배지에 꾸지뽕 잎 추출물을 DMSO에 녹여 함께 처리하였으며, 꾸지뽕 잎 추출물을 처리하지 않고 분화 유도한 것을 대조군으로 하였다.

분화된 3T3-L1 세포의 중성지방 축적 분석

세포는 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하고 10% formaldehyde로 1시간 동안 고정시킨 후 PBS로 세척하여 4% Oil red O 염색액으로 2시간 동안 염색하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 중성지방축적정도를 광학현미경으로 분석하였다.

Oil red O 염색 및 total lipid 정량

3T3-L1 세포 내 지방 축적율은 Oil Red-O staining법으로 측정하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 분화유도 8일 후에 조사하였다. 배지를 제거한 뒤 PBS로 2회 세척하고, 3.7% formalin 용액으로 상온에서 30분간 고정한 다음 PBS로 3회 세척하였다. 세척된 세포는 생성된 lipid droplet과 특이적으로 반응하는 Oil Red O 용액(0.5% Oil Red O-isopropanol solution : water=3:2)을 이용하여 1시간 동안 염색하고, 증류수로 3회 세척 후 지방세포의 염색 정도를 현미경을 통해 관찰하였다. Total lipid 정량은 현미경 관찰 후에 well을 완전히 건조시킨 다음 100% isopropyl alcohol을 150 µl 첨가하여 세포 내 염색된 Oil red O solution을 녹여낸 다음 96 well plate에 100 µl씩 옮겨서 ELISA reader (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현 분석

DMEM에 10 µg/ml insulin, 1 µM dexamethasone 및 10 µM rosiglitazone이 첨가된 분화배지(DM)에 꾸지뽕 신초 정단잎(CIL0) 추출물을 농도별로 처리한 다음 8일 동안 분화시킨 3T3-L1 지방전구세포에 적당량의 lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Triton, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50

mM Tris-HCl, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 첨가하여 4°C에서 15분 동안 반응시킨 후, 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액에 있는 총 단백질을 회수하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 조제하였다. 동량의 sample과 protein marker를 12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, PVDF membrane (Bio-Rad)으로 Semi Dry Transfer system (Bio-Rad, USA)를 이용하여 20 V에서 20분 동안 electroblotting에 의해 전이시켰다. 단백질이 전이된 PVDF membrane을 PBST buffer (0.1% Tween-20/PBS)에 3% BSA가 첨가된 용액을 실온에서 2시간 동안 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 각각의 1차 항체(PPAR-γ, A-FABP, LPL 및 Glut4)를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 세척(3분간 3회)하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체(PBS-T로 1 : 1,000으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 Enhanced Chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp.)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현양을 분석하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 SPSS ver. 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타났다. 각 실험군의 분석 항목별 통계의 유의성은 Student t-test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

꾸지뽕 잎의 위치별 추출물의 지방세포 분화 억제 효과

꾸지뽕의 신초 잎을 정아에서 기부까지 6단계로 구분하여 정아부분의 완전히 전개되지 않은 잎(L0), 완전히 전개된 잎(L1), 그 다음의 잎을 순차적으로 L2, L3, L4 구분하고, 가장 기부의 잎을 L5로 분류한 잎을 70°C 열풍건조기에서 건조시킨 후 70% 에탄올로 추출하였다. 꾸지뽕 신초의 잎 위치에 따른 추출물이 지방전구세포에서 지방세포로의 분화 억제효과를 확인하기 위해서 3T3-L1 지방 전구세포에 insulin, dexamethasone 및 rosiglitazone이 첨가된 분화배지를 처리하여 지방 세포로 분화를 유도시킴과 동시에 꾸지뽕잎 추출물 50, 100 µg/ml을 2일 간격으로 8일 동안 처리하여 Oil Red O 시약을 이용하여 염색하였다.

3T3-L1 지방전구세포에서 축적된 lipid droplet은 phospholipid monolayer에 의해 둘러싸인 중성지방과 cholesterol ester만이 Oil red O에 염색이 되는 특성[4]을 이용하여 세포 내 중성지방을 확인하고 축적된 lipid droplet을 관찰하였다

(Fig. 1). 그 결과 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물이 지방세포 분화 억제효과가 가장 좋았으며, L1, L2 및 중간엽인 L3까지는 상위엽에서 기부로 갈수록 효과가 감소하였고, 하위엽인 L4와 L5은 100 µg/ml의 고 농도에서도 억제효과가 전혀 없었다(Fig. 1).

따라서 본 연구에서는 지방분화를 유의하게 억제시켰던 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물을 2.5 µg/ml, 25 µg/ml 및 50 µg/ml의 농도로 처리하여, Oil red O로 염색한 다음, lipid droplet을 isopropyl alcohol 용액으로 용해하고 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 CTL0 추출물의 농도가 높을수록 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포로의 분화 및 지방생성을 억제하였다(Fig. 2).

꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물의 3T3-L1 세포내로 glucose 흡수 억제

꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물이 glucose의 흡수에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배지내의 glucose의 함량을 조사하였다. 대조군에 비해서 분화배지(DM)와 분화배지에 DMSO를 첨가한 배지(DMSO)에서 유의하게 증가하여서 지방세포의 분화는 세포내로 glucose의 흡수를 촉진시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 분화배지에 의해서 감소된 배지내 glucose의 함량은 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물을 12.5, 25 및 50 mg/ml로 처리하였을 경우에 농도가 증가할수록 감소하였다. 이러한 결과로부터 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물이 3T3-L1 세포의 glucose 흡수를 농도 의존적으로 억제한다는 것을 증명할 수 있었다.

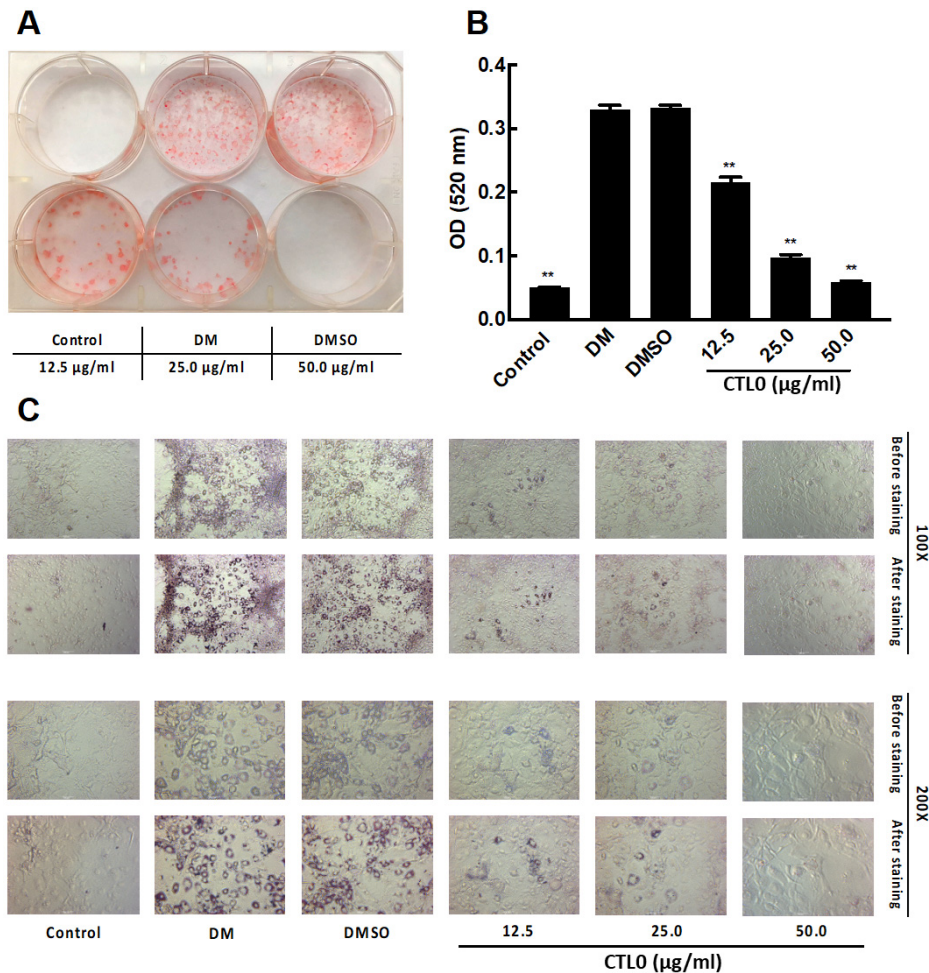


Fig. 2. CTL0 inhibited adipogenesis in 3T3-L1 cell line. 3T3-L1 cell line was cultured in DMEM containing 10% FBS, 25 mM NaHCO₃, and 25 mM HEPES (culture medium, Control) and adipogenesis was induced in the cells using culture medium containing 10 µM rosiglitazone, 10 µg/ml insulin, and 1 µM dexamethasone (differentiation medium, DM). DMSO or CTL0 dissolved in DMSO was added to the medium during the whole inducing period. Images were captured after oil red O staining on day 8 (A). OD value of each sample at 520 nm was measured using an ELISA reader (B). Images were captured at 100 × and 200× magnification before and after oil red O staining (C). CTL0 sample was extracted with 70% ethyl alcohol extract of *Cudrania tricuspidata* at leaf position 0. Values represent mean ± SD (n=3), ** as p<0.01 vs. DM with DMSO group.

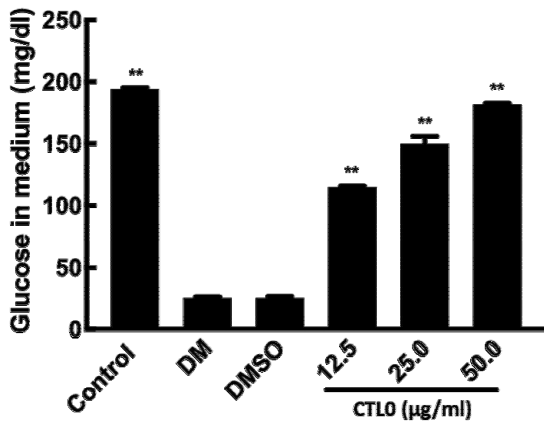


Fig. 3. CTL0 inhibited glucose consumption in 3T3-L1 cell line. 3T3-L1 cell line was cultured in DMEM containing 10% FBS, 25 mM NaHCO₃, and 25 mM HEPES (culture medium, Control) and adipogenesis was induced using culture medium containing 10 µM rosiglitazone, 10 µg/ml insulin, and 1 µM dexamethasone (differentiation medium, DM). DMSO or CTL0 dissolved in DMSO was added to medium during the whole inducing period. Medium of each well was collected to measure glucose content on day 8, and then, glucose content was using a commercial glucose determination kit. CTL0 sample was extracted with 70% ethyl alcohol extract of *Cudrania tricuspidata* at leaf position 0. Values represent mean ± SD (n=3), ** as $p < 0.01$ vs. with DMSO group.

꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물의 3T3-L1 세포내 중성지방 축적 억제

Oil Red O 분석결과 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물은 세포내 지방의 축적을 억제시켰으며(Fig. 2), 세포내 중성지방의 축적은 지방세포의 지질을 축적한다[11, 12]고 하였다. 따라서 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물 처리가 3T3-L1세포내 중성지방의 축적에 미치는 영향을 조사한 결과, 대조군에 비해서 분화배지(DM)와 분화배지에 DMSO를 첨가한 배지(DMSO)에서 유의하게 증가한다는 것을 확인 할 수 있었는데, 이러한 결과는 분화배지가 세포내에 중성지방의 축적을 촉진한다는 것을 확인할 수 있었다. 분화배지에 의해서 축적된 중성지방의 함량은 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물을 12.5, 25 및 50 mg/ml로 처리하였을 경우에 처리 농도가 증가할수록 감소하였다(Fig. 4).

꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물의 단백질 발현에 미치는 영향

Adipogenesis는 지방전구세포가 분화되는 과정을 거쳐 지방세포로 성숙되는 과정으로서 여러 종류의 adipogenic factor들이 관여하고 있으며, 특히 지방세포 특이적 단백질[4]인 PPAR γ 는 전사인자로서 adipogenesis를 전체적으로 조절하고, 지방세포의 분화상태를 유지하게 하는[31] 것으로 보고되

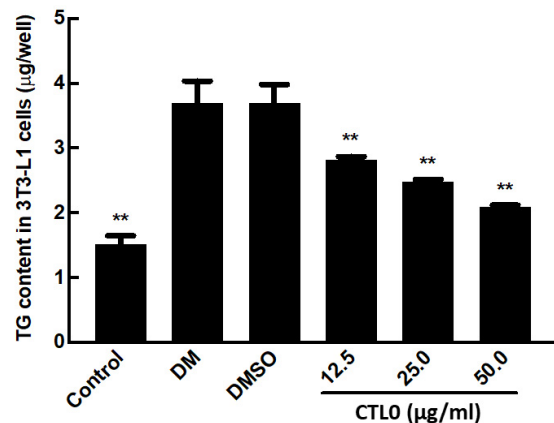


Fig. 4. CTL0 inhibited triglycerides (TG) accumulation in 3T3-L1 cell line. 3T3-L1 cell line was cultured in DMEM containing 10% FBS, 25 mM NaHCO₃, and 25 mM HEPES (culture medium, Control) and adipogenesis induced using culture medium containing 10 µM rosiglitazone, 10 µg/ml insulin, and 1 µM dexamethasone (differentiation medium, DM). DMSO or CTL0 dissolved in DMSO (DMSO) was added to medium during the whole inducing period. Cells were collected on day 8, TG was extracted with 5% Triton X-100 and the quantity was determined using a commercial TG kit, according to manufacturer's protocol. CTL0 sample was extracted with 70% ethyl alcohol extract of *Cudrania tricuspidata* at leaf position 0. Values represent mean ± SD (n=3), * as $p < 0.05$ and ** as $p < 0.01$ vs. DMSO group.

었다. 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물의 PPAR γ 활성 억제 효과를 조사하기 위해서 CTL0를 12.5, 25 및 50 µg/ml의 농도로 2일 간격으로 처리한 다음 8일 후에 Western blot방법으로 PPAR γ 의 발현 정도를 조사하였다(Fig. 5). 분화 중기 단계에 관여하는 유전자인 PPAR γ 의 발현은 DMEM배지에 insulin, dexametasone 및 rosiglitazone이 첨가된 비만 유도배지[11, 12]에서 유의하게 증가하였다. 분화배지에 의해서 증가된 PPAR γ 의 발현은 CTL0 12.5 µl/ml의 저농도에서도 유의하게 감소되었으며($p < 0.05$), 50 µl/ml까지 농도가 증가할수록 감소 효과가 현저하였다(Fig. 5). 또한 Oil red O 염색을 통하여 확인된 중성지방 생성 감소와 일치하는 경향을 보였다(Fig. 2). 이러한 결과는 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물이 3T3-L1지방전구세포에서 adipogenic factor인 PPAR γ 의 발현을 억제시킴으로써 세포 내 lipid droplet와 중성지방의 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시킨 것으로 추측된다.

LPL (lipoprotein lipase)은 lipoprotein triglyceride를 free fatty acid와 monoglyceride로 분해하는 첫 번째 효소로서 지방의 분해와 조직내 지방의 축적에 주요 기능을 하는 것으로 알려져 있다[9]. 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물의 LPL 발현 억제 효과를 조사한 결과, 지방세포분화배지(DM)에서는 유의하게 증가되었으며, DM배지에서 증가된 LPL의 발현은

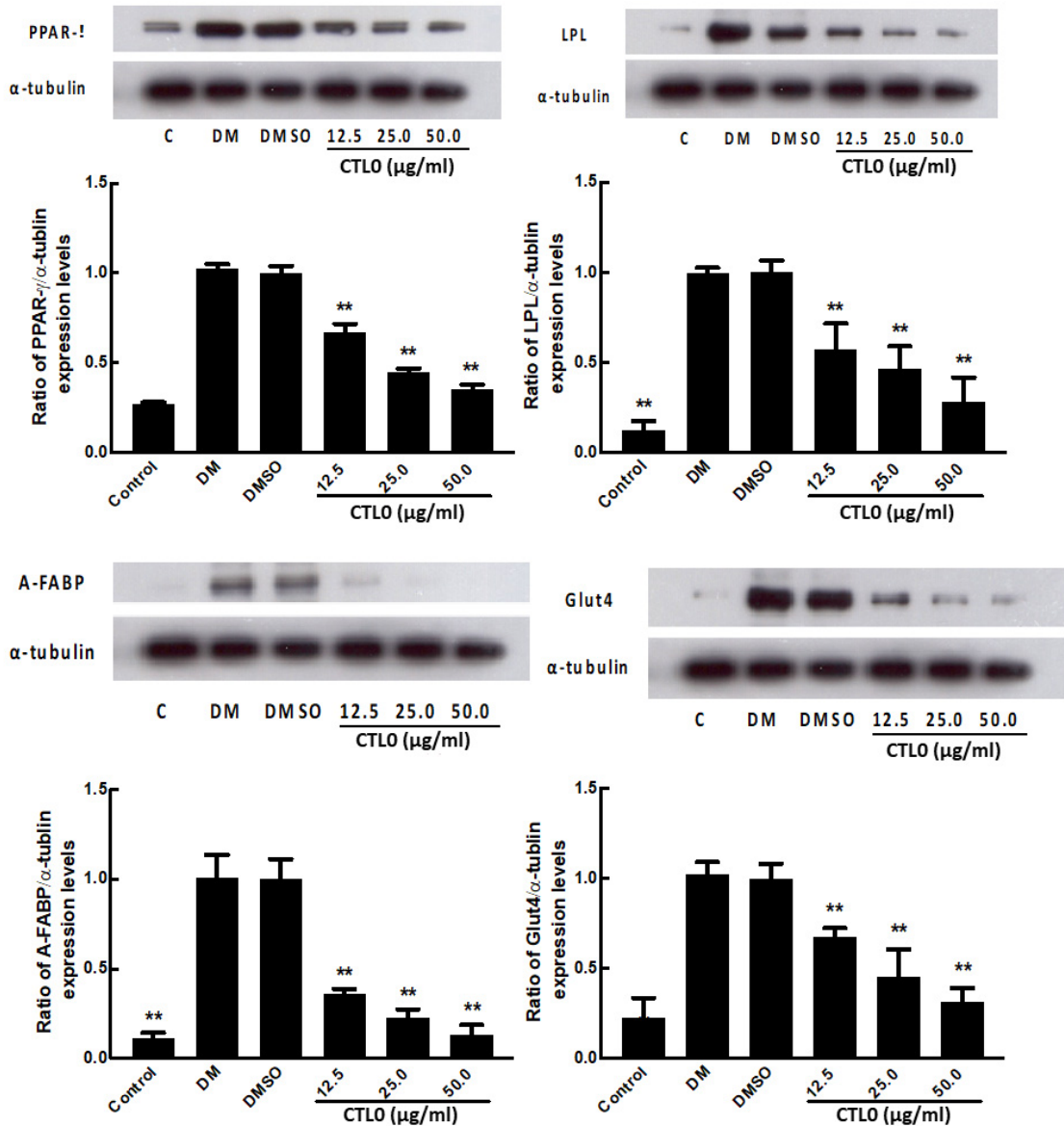


Fig. 5. CTL0 inhibited expression of PPAR- γ and its target genes in differentiated 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cell line was maintained in DMEM containing 10% FBS, 25 mM NaHCO₃, and 25 mM HEPES (culture medium, Control) and adipogenesis was induced using culture medium containing 10 μ M rosiglitazone, 10 μ g/ml insulin, and 1 μ M dexamethasone (differentiation medium, DM). DMSO or CTL0 dissolved in DMSO was added to the medium during the whole inducing period. The total proteins were extracted with RIPA buffer, and analyzed by Western blotting. CTL0 inhibited expression of PPAR- γ and its target genes after 8 days. CTL0 sample was extracted with 70% ethyl alcohol extract of *Cudrania tricuspidata* at leaf position 0. Values represent mean \pm SD (n=3), * as $p < 0.05$ and ** as $p < 0.01$ vs. DMSO group.

꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물 12.5 μ g/ml의 저 농도에서도 통계적으로 유의하게 감소하였고, 고농도일수록 발현 억제 효과는 현저하였다.

지방산의 저장이나 지방분해를 조절하는데 중요한 역할을 하는 A-FABP (adipocyte fatty acid-binding protein)의 발현은 지방세포분화배지(DM)에 의해서 유의하게 증가하였으며, 지방세포분화배지(DM)지에 의해서 증가된 A-FABP의 발현은 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물 처리시에는 저 농도인

12.5 μ g/ml에서는 물론 농도가 높아질수록 통계적으로 유의하게 발현을 억제시켰다.

Glut4 (glucose transporter 4)는 세포내로 포도당을 수송하는 단백질로, 발현이 증가하면 세포내 포도당의 유입이 증가하여 중성지방 합성도 증가하는 것으로 알려져 있다. Glut4의 발현은 지방세포분화배지(DM)에 의해서 유의하게 증가하였다. 지방세포분화배지(DM)에 의해서 증가된 배지에 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물을 동시에 처리하였을 경우에 저

농도인 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의하게 감소하였으며, 처리농도가 증가할수록 발현억제 효과는 현저하였다.

고 찰

콩나무류에는 플라보노이드 화합물들이 다량 함유되어 있어 혈중 중성지방, 고콜레스테롤, 고지혈증, 동맥경화와 더불어 지질 과산화로 인한 대사성질환을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다[6]. 콩나무류 중에서 꾸지뽕 잎 추출물은 *in vitro*에서 lipase활성(IC_{50} value of 9.91 $\mu\text{g/ml}$) 억제뿐만 아니라[18], *In vivo* 실험결과에서도 lipase 활성 억제, 혈장 중성지방의 감소, 지방억제 지연 등의 효과가 있다고 하였다[18]. 꾸지뽕의 뿌리, 잎 및 과일 추출물을 3T3-L1 세포에 처리하여 Oil red O 염색 결과, 뿌리 추출물이 지방세포 내 중성지방의 축적을 가장 효과적으로 억제한다고 하였다[17]. 특히 기능성을 가진 천연물 소재는 채취시기, 재배조건 등에 따라서도 생리활성 효과가 다른 것으로 보고되고 있는데, 본 실험에서는 꾸지뽕의 신초에 부착된 잎을 정단부에서부터 기부의 순서로 L0, L1, L2, L3, L4 및 L5로 분류하여 채취한 다음 70% 에탄올 추출물의 항비만 효과를 스크린 한 결과, 정단의 잎일수록 효과가 좋았으며, 기부에 가까운 잎은 효과가 없었다. 식물체의 생리활성 성분의 함량은 잎의 위치에 따라서 다른데, 특히 콩나무 잎 추출물의 주요 생리활성 성분인 1-deoxynojirimycin의 함량은 정단 잎일수록 높고 기부에 가까운 잎일수록 감소하며, 1-deoxynojirimycin이 다량 함유된 잎의 추출물일수록 혈액내 당의 함량이 감소하여 당뇨병자에 도움을 줄 수 있을 것이라고 하였다[19]. 선행의 연구결과와 본 연구의 결과를 종합하면 꾸지뽕 잎 추출물 역시 정단부의 잎일수록 효과가 좋은 것으로 나타나(Fig. 1) 뽕잎의 위치별 당의 감소효과[19]와 유사한 경향이었다. 또한 가장 효과가 좋았던 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물은 배지로부터 세포내로 당의 흡수를 억제시키고 세포내 triglyceride의 함량을 감소시켰다. 따라서 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물이 비만세포형성 특이 유전자인 PPAR γ 와 PPAR γ target gene인 LPL, A-FABP 및 Glut4의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

지방전구세포에 분화유도물질을 처리하면 C/EBP β 및 C/EBP δ 의 발현이 분화 초기에 증가하는 반면, C/EBP α 및 PPAR γ 는 분화 후기에 발현이 촉진되어 지방세포로 분화[34]되는 것으로 알려져 있다. 지방세포의 분화 유도 과정 중에서 전사 조절인자인 PPAR γ 는 지방대사 관련 유전자의 발현을 증가시키고[10], PPAR γ 의 발현 증가는 체내 당의 흡수 증가와 지방세포의 분화를 유발한다[32]. PPAR γ 는 target 유전자인 A-FABP, LPL 및 Glut4 등의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있으므로[12, 32] 꾸지뽕 잎 추출물의 항비만 효과를 증명하기 위하여 이들 단백질의 발현 정도를 분석하였다(Fig. 5).

지방분화(adipogenesis)는 지방전구세포(pre-adipocyte)가

증식과 분화과정을 거쳐 성숙한 지방세포(adipocyte)로 분화되는 과정 중에 지질의 축적, 호르몬에 대한 민감성 변화, lipogenesis 및 lipolysis 유전자의 발현에 일련의 변화가 일어나게 된다. PPAR γ 는 호르몬에 의해 adipogenesis가 유도되는 과정에서 중요하게 작용하는 전사인자[31]로서 지방의 분화에 매우 중요한데, 본 연구에서 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물의 처리 농도가 증가할수록 발현을 억제하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물이 지방생성에 주요 역할을 하는 유전자에 작용하며 비만의 조절 가능성이 있다는 것을 시사한다.

지방분해효소인 LPL은 내피세포에 존재하다가 혈장지질단백질(chylomicron) 또는 초저밀도지질단백질(very low-density lipoprotein, VLDL)에 있는 중성지방을 지방산과 글리세롤로 분해하고, 분해된 지방산을 세포 내로 유입시킨다. 세포 내로 유입된 지방산은 근육조직에서 에너지대사를 통하여 소모되고 지방조직에서 소모되지 못한 지방산은 중성지방으로 전환되어 지방조직에 저장되는 것으로 알려져 있다[35]. 또한 지방세포는 체내에 필요한 에너지를 축적하고 중성지방을 분해시켜서 이용하고, 지방과 당 대사 등을 통해서 체내 에너지 대사를 조절한다[14]. LPL 활성은 고지방 식이 후 증가하여 과잉의 에너지를 중성지방의 형태로 지방세포에 저장시키는 것으로 알려져 있다[2]. 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물이 3T3-L1세포의 adipogenic enzyme인 LPL의 발현에 미치는 영향을 측정된 결과, LPL의 발현은 비만 유도군에서는 현저하게 증가하였으며, 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물을 12.5, 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 경우에 농도가 증가할수록 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물이 LPL의 활성을 감소시켜 지방산의 분해를 저해하고, 지방조직에 중성지방의 저장을 억제함으로써 지방축적을 감소시킨 것으로 판단되었다.

A-FABP는 성숙한 지방세포의 분화 후기 단계에 발현되는 단백질로서 지방분해를 조절하고, 지방조직과 성숙한 지방세포에서만 감지되며, 세포 내 A-FABP 유전자의 발현 양은 지방산의 대사비율에 비례한다고 하였다[33]. 본 연구에서 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물 처리시에 A-FABP의 발현을 농도의존적으로 감소시켰으므로 지방세포로의 변화가 가속화되는 중기 이후에 지방 분화 과정을 유의적으로 억제하여 항비만 효과를 나타내는 것으로 판단되었다.

3T3-L1 지방전구세포의 분화과정은 PPAR γ 를 중심으로 다양한 adipogenic marker들의 작용에 의해 조절되는데 분화 후기에는 Glut4와 같은 termination marker들의 발현이 크게 증가하게 된다[25]. 지방세포와 근육세포에서 발현되는 Glut4는 세포내로 포도당을 수송하는 단백질로서 비만시에 발현이 증가하고, 인슐린이 존재할 때[5]에는 세포내로 포도당의 유입이 증가하여 중성지방 합성도 증가한다[30]. 따라서 지방세포의 분화와 지방축적에 있어 포도당의 흡수는 비만형성에 중요

한 반응으로 보고되고 있으므로 glucose의 흡수와 관련되어 있는 Glut4 단백질 발현을 조사하였다. 3T3-L1 지방전구세포 분화에 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물 12.5, 25 및 50 µg/ml을 처리한 결과, Glut4의 발현은 농도가 증가할수록 감소하였다(Fig. 5). 특히 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물 50 µg/ml 처리는 Glut4의 발현을 90% 이상 억제하였다(Fig. 5). 따라서 70% EtOH 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물은 Glut4 단백질 발현을 억제시켜서 세포내로 포도당의 유입을 감소시키고, 중성지방 합성도 감소시킴으로써 비만이 억제된 것으로 판단되었다.

꾸지뽕 잎의 항비만 효과는 채취하는 위치에 따라서 상당한 차이를 나타내었으며, 꾸지뽕의 잎을 사용한 항비만 소재를 개발하기 위해서는 신초의 상단부 잎(L0~L2)을 사용하는 것이 효과적인 것으로 판단되었다. 비만 분화배지에서 배양한 3T3-L1 세포의 PPAR γ 발현은 현저하게 증가되었으나, 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물의 처리는 분화유도 과정에서 PPAR γ 의 발현 현저하게 감소시켰다(Fig. 5). 이러한 결과는 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물이 지방생성에 주요 역할을 하는 유전자에 작용하며 비만의 조절 가능성이 있다는 것을 시사한다. 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물의 처리가 비만세포 특이 전사인자인 PPAR γ 와 PPAR γ target 유전자인 A-FABP, LPL과 Glut4의 발현 모두 억제하였는데, 이러한 결과는 세포내 lipid droplet 형성(Fig. 2) 및 triglyceride 축적 억제(Fig. 4)와 매우 일치하였다. 이상의 결과를 종합하면 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 adipogenic transcription factor인 PPAR γ 의 발현 억제와 adipogenic target 유전자인 A-FABP, LPL과 Glut4를 억제함으로써 lipid droplet 생성[7]을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시키는 것으로 추측된다. 따라서 꾸지뽕 잎의 추출물을 이용한 항비만 천연 기능성소재 개발시에는 식물체의 부위는 물론 채취하는 잎의 위치도 충분히 고려하여서 선정하여야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 과정은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음

The Conflict of Interest Statement

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

References

- An, R. B., Sohn, D. H. and Kim, Y. C. 2006. Hepatoprotective compounds of the roots of *Cudrania tricuspidata* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 838-840.
- Auwerx, J., Leroy, P. and Schoonjans, K. 1992. Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **29**, 243-268.
- Baik, I. 2018. Forecasting obesity prevalence in Korean adults for the years 2020 and 2030 by the analysis of contributing factors. *Nutr. Res. Pract.* **12**, 251-257.
- Choi, J. H., Park, Y. H., Lee, I. S., Lee, S. P. and Yu, M. H. 2013. Antioxidant activity and inhibitory effect of *Aster scaber* Thunb. extract on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **45**, 356-363.
- Chung, M. J., Lee, Y. S., Kim, B. C., Lee, S. B., Moon, T. H., Lee, S. J. and Park, K. H. 2006. The hypoglycemic effects of acarviosine-glucose modulate hepatic and intestinal glucose transporters *in vivo*. *Food Sci. Biotechnol.* **15**, 851-855.
- Enkhmaa, B., Shiwaku, K., Katsube, T., Kitajima, K., Anuurad, E., Yamasaki, M. and Yamane, Y. 2005. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J. Nutr.* **135**, 729-734.
- Fox, K. E., Fankell, D. M., Erickson, P. F., Majka, S. M., Crossno, J. T. and Klemm, D. J. 2006. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) α , C/EBP β , or PPAR γ 2. *J. Biol. Chem.* **281**, 40341-40353.
- Fujimoto, T. and Nomura, T. 1985. Components of root bark of *Cudrania tricuspidata*; 3.1,2. Isolation and structure studies on the flavonoids. *Planta Med.* **51**, 190-193.
- Goldberg, I. J. and Merkel, M. 2001. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front. Biosci.* **6**, 388-405.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783-809.
- Guo, L., Kang, J. S., Kang, N. J., Je, B. I., Lee, Y. J., Park, Y. H. and Choi, Y. W. 2020. Pelargonidin suppresses adipogenesis in 3T3-L1 cells through inhibition of PPAR- γ signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **686**, 108365.
- Guo, L., Li, K., Kang, J. S., Kang, N. J., Son, B. G. and Choi, Y. W. 2020. Strawberry fermentation with *Cordyceps militaris* has anti-adipogenesis activity. *Food Biosci.* **35**, 100576.
- Han, X. H., Hong, S. S., Jin, Q., Li, D., Kim, H. K., Lee, J., Kwon, S. H., Lee, D., Lee, C. K., Lee, M. K. and Hwang, B. Y. 2009. Prenylated and benzylated flavonoids from the fruits of *Cudrania tricuspidata*. *J. Nat. Prod.* **72**, 164-167.
- Heimburger, D. C., Lucas, C. P., Robbins, D. C., Chung, J. and Heymsfield, S. B. 1999. Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* **281**, 235-242.
- Hirsch, J. and Batchelor, B. 1976. Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin. Endocrinol. Metab.* **5**, 299-311.
- Jeong, G. S., Lee, D. S. and Kim, Y. C. 2009. Cudraticusxanthone A from *Cudrania tricuspidata* suppresses pro-inflammatory mediators through expression of anti-inflammatory

- heme oxygenase-1 in RAW264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 241-246.
17. Kim, G. H. and Kim, E. 2019. Antioxidative activities and inhibitory effects on lipid accumulation of extracts from different parts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *Kor. J. Food Nutr.* **32**, 138-147.
 18. Kim, Y. S., Lee, Y., Kim, J., Sohn, E., Kim, C. S., Lee, Y. M., Jo, K., Shin, S., Song, Y., Kim, J. H. and Kim, J. S. 2012. Inhibitory activities of *Cudrania tricuspidata* leaves on pancreatic lipase *in vitro* and lipolysis *in vivo*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **100**, 277-293.
 19. Kimura, T., Nakagawa, K., Kubota, H., Kojima, Y., Goto, Y., Yamagishi, K., Oita, S., Oikawa, S. and Miyazawa, T. 2007. Food-grade mulberry powder enriched with 1-Deoxyojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5869-5874.
 20. Kopelman, P. G. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* **404**, 635-643.
 21. Kuang, L., Wang, L., Wang, Q., Zhao, Q., Du, B., Li, D., Luo, J., Liu, M., Hop, A. and Qian, M. 2011. Cudraticusxanthone G inhibits human colorectal carcinoma cell invasion by MMP-2 down-regulation through suppressing activator protein-1 activity. *Biochem. Pharmacol.* **81**, 1192-1200.
 22. Kwon, J., Hiep, N. T., Kim, D. W., Hwang, B. Y., Lee, H. J., Mar, W. and Lee, D. 2014. Neuroprotective xanthones from the root bark of *Cudrania tricuspidata*. *J. Nat. Prod.* **77**, 1893-1901.
 23. Lee, I. K., Song, K. S., Kim, C. J., Kim, H. M., Oh, G. T. and Yoo, I. D. 1994. Tumor cell growth inhibition and antioxidative activity of flavonoids from the stem bark of *Cudrania tricuspidata*. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **37**, 105-109.
 24. Lee, Y. J., Kim, S., Lee, S. J., Ham, I., Whang, W. K. 2009. Antioxidant activities of new flavonoids from *Cudrania tricuspidata* root bark. *Arch. Pharm. Res.* **32**, 195-200.
 25. MacDougald, O. A. and Lane, M. D. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 345-373.
 26. Ministry of Health and Welfare, Korea Centers for Disease Control and Prevention. Korea Health Statistics 2015: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES VI-3). Cheongju: Korea Centers for Disease Control and Prevention; 2016.
 27. Noh, S. K. 2002. Functional action of flavonoids for treatment of obesity. *Food Ind. Nutr.* **7**, 27-29.
 28. Park, J. C., Young, H. S. and Choi, J. S. 1992. Constituents of *Cudrania tricuspidata* in Korea. *Yakhak Hoeji* **36**, 40-45.
 29. Perez-Vizcaino, F., Duarte, J. and Andriantsitohaina, R. 2006. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic. Res.* **40**, 1054-1065.
 30. Ranganathan, G., Unal, R., Pokrovskaya, I., Yao-Borengasser, A., Phanavanh, B., Lecka-Czernik, B., Rasouli, N. and Kern, P. A. 2006. The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J. Lipid Res.* **47**, 2444-2450.
 31. Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 145-171.
 32. Spiegelman, B. M. and Flier, J. S. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* **104**, 531-543.
 33. Spiegelman, B. M., Frank, M. and Green, H. 1983. Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J. Biol. Chem.* **258**, 10083-10089.
 34. Tang, Q. Q. and Lane, M. D. 2012. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 715-736.
 35. Wang, H. and Eckel, R. H. 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol.-Endoc. M.* **297**, E271-E288.
 36. Xin, L. T., Yue, S. J., Fan, Y. C., Wu, J. S., Yan, D., Guan, H. S. and Wang, C. Y. 2017. *Cudrania tricuspidata*: an updated review on ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology. *RSC Adv.* **7**, 31807-31832.
 37. Yoo, H., Ku, S. K., Lee, W., Kwak, S., Baek, Y. D., Min, B. W., Jeong, G. S. and Bae, J. S. 2014. Antiplatelet, anti-coagulant, and profibrinolytic activities of cudraticusxanthone A. *Arch. Pharm. Res.* **37**, 1069-1078.

초록 : 꾸지뽕 신초 엽위별 잎 추출물의 항비만 효과

박주하 · 귀루 · 강혜미 · 손병구 · 강점순 · 이용재 · 박영훈 · 제병일 · 최영환*
(부산대학교 원예생명과학과)

본 연구는 꾸지뽕 신초에 부착된 잎을 6단계 즉 정아의 잎(L0), 정아부에서 하부의 순서대로 L1, L2, L3, L4 및 기부 잎을 L5로 분류하여 채취하였다. 신초의 위치에 따라서 분류한 잎을 70% 에틸알콜로 추출한 다음 3T3-L1 cell line을 이용하여 지방분화 억제 효과를 스크린하고, 가장 효과가 좋았던 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물의 작용기작을 규명하였다. 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물의 지방분화 억제효과가 가장 좋았으며, 신초의 중간 잎인 CTL2까지는 정단 잎에서부터 중간 잎 추출물일수록 효과가 감소하였으며, 신초의 중간 하부 잎인 CTL3부터 기부 잎인 CTL5 추출물은 100 µg/ml의 고농도에서 효과가 없었다. 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물을 12.5, 25 및 50 µg/ml의 농도로 처리하여 Oil Red O를 분석한 결과, 농도 의존적으로 3T3-L1세포의 지방분화를 억제시켰다. 3T3-L1 세포에 지방분화물질인 insulin, dexamethasone 및 rosiglitazone을 첨가한 분화배지(DM)에서는 배지내에 glucose의 함량이 낮았으나, CTL0 추출물의 처리는 배지에 glucose함량이 많이 남아있었기 때문에 세포내로 glucose의 흡수를 억제시켰으며, 세포내 중성지방의 함량도 감소하였다. CTL0처리는 전구지방세포에서 지방세포로 분화될 때에 주요 전사인자로 알려진 PPAR γ 와 PPAR γ 의 target 유전자인 LPL, A-FABP 및 Glut4 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 따라서 꾸지뽕 신초 정단잎(CTL0) 추출물은 항비만 효과가 우수한 소재로서 활용가치가 높을 것으로 사료된다.