

## Research Article



# 뽕나무 열매 착즙 분말이 3T3-L1 지방세포의 염증 및 microRNA-132/143 조절에 미치는 영향

이막순 <sup>1</sup>, 김양하 <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>이화여자대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>이화여자대학교 시스템헬스융합전공

## OPEN ACCESS

Received: Jul 29, 2021

Revised: Sep 27, 2021

Accepted: Oct 19, 2021

### Correspondence to

Yangha Kim

Department of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, 52 Ewhayeodae-gil, Seodaemun-gu, Seoul 03670, Korea.

Tel: +82-2-3277-3101

E-mail: yhmoon@ewha.ac.kr

© 2021 The Korean Nutrition Society

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.

### ORCID iDs

Mak-Soon Lee

<https://orcid.org/0000-0002-7010-4185>

Yangha Kim

<https://orcid.org/0000-0002-7280-7597>

### Funding

This study was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korean Government (MSIT) (No. 2019R1A2C1002861).

### Conflict of Interest

There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest.

## Effects of mulberry fruit juice powder on inflammation and microRNA-132/143 regulation in 3T3-L1 adipocytes

Mak-Soon Lee <sup>1</sup> and Yangha Kim <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, Seoul 03670, Korea

<sup>2</sup>Graduate Program in System Health Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 03670, Korea

## ABSTRACT

**Purpose:** Mulberry (*Morus alba* L.) fruit is widely grown in Asia and consumed as fresh fruit, jam, and juices. The fruit has beneficial health effects, including anti-diabetic, anti-tumor, and anti-obesity properties. However, the mechanisms by which mulberry fruit juice powder (MJ) regulates inflammatory microRNAs (miRs) are not yet known. This study investigated the effect of mulberry fruit juice powder on the regulation of inflammation and miR-132/143 during 3T3-L1 adipocyte differentiation.

**Methods:** The 3T3-L1 cells were induced to differentiate for 2 days and then treated with various concentrations of MJ for 7 days. Cytotoxicity was determined by evaluating cell viability using a water-soluble tetrazolium salt-8 assay kit. Intracellular lipid accumulation was evaluated by oil-red O staining. The levels of the expression of genes involved in adipogenesis and inflammation, and miR-132/143 were measured by quantitative real-time polymerase chain reactions.

**Results:** MJ showed no cytotoxic effect on 3T3-L1 adipocytes at concentrations below 100 ng/mL. Intracellular lipid accumulation was reduced by MJ treatment at concentrations of 100 ng/mL. The messenger RNA (mRNA) levels of proliferator-activated receptor- $\gamma$ , cytosine-cytosine-adenosine-adenosine-thymidine/enhancer-binding protein- $\alpha$ , and adipocyte protein 2, which are involved in adipogenesis, were suppressed by MJ. A reduction was also seen in mRNA levels of genes related to the inflammatory response, such as tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, monocyte chemoattractant protein-1, and inducible nitric oxide synthase. The expression of the inflammatory miR-132 and miR-143 was also decreased by MJ.

**Conclusion:** These results suggest that MJ may suppress adipogenesis and inflammation through the regulation of miR-132/143 expression in 3T3-L1 adipocytes. Thus, MJ may be useful as a food agent that prevents obesity-associated inflammation.

**Keywords:** Morus, fruit, inflammation, microRNAs, adipocytes

## 서론

비만은 우리나라를 포함하여 전세계적으로 증가하고 있으며, 제2형 당뇨병, 심혈관 질환 및 고혈압 등과 같은 대사성질환의 발생 원인이 된다 [1]. 비만도가 높을수록 염증이나 조직의 손상이 있을 때 증가하는 단백질인 C-reactive protein (CRP) 및 염증 매개 물질들이 증가한다고 보고하고 있다 [2]. 특히, 만성 저등급 염증반응 (chronic low-grade inflammatory response)은 주로 대식세포가 지방 조직으로 침투하고 활성화를 자극하는 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) 및 monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)과 같은 전염증성 사이토카인 (pro-inflammatory cytokines)의 생성으로 지방 세포에 의해 매개된다 [3]. 또한, TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 포함하는 염증 매개체 합성을 코딩하는 유전자 활성화는 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)에 의해 제어되기 때문에 이들은 염증반응 조절에서 주요 인자로 여겨지고 있다 [4].

뽕나무 (*Morus alba* L.)는 뽕나무과 (Moraceae)의 교목성 활엽수로서 아시아를 비롯한 우리나라 전역에 주로 분포하고 있으며, 열매에서 잎, 뿌리 및 껍질까지 전통적인 약용으로 사용되어 왔다 [5]. 특히, 뽕나무 열매는 cyanidin 3-O-glucoside 및 cyanidin 3-O-rutinoside와 같은 안토시아닌을 다량 함유하고 있으며 뽕나무 열매의 추출물과 활성 성분은 항산화, 항당뇨, 항종양, 항 죽상 경화증, 고지혈증, 면역 조절, 및 신경 보호 활성 등 다양한 생리활성 효과들이 보고되었다 [6,7]. 최근 우리는 뽕나무 열매의 초고압 (high hydrostatic pressure)추출물이 간의 microRNA (miR)-33 조절과 함께 항 콜레스테롤 활성 효과가 있음을 보고하였으며 이와 더불어 이 추출물이 3T3-L1 지방세포에서 AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성화와 miR-21/143 조절을 통한 지질축적 억제 효과가 있음을 보고하였다 [8,9]. 지금까지 뽕나무 열매 추출물에 대한 다양한 생리활성 기전 연구는 알려져 있지만 뽕나무 열매 착즙 분말 (mulberry fruit juice powder, MJ)의 염증반응에서 miRs 조절기전에 대한 연구는 아직까지 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 MJ가 3T3-L1 지방세포 분화 동안 지방대사 및 염증조절에 관여하는 유전자 발현과 염증성 miR-132 및 miR-143 조절에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

## 연구방법

### 뽕나무 열매 착즙 분말 준비

뽕나무 열매는 경상북도 상주누에 영농협회 (Sangju Silkworm Farming Association, Sangju, Korea)에서 5월에서 6월 사이 수확한 것을 사용하였다. 뽕나무 열매 착즙 분말 (MJ)는 한국식품연구원 (Korea Food Research Institute, Wanju, Korea)으로부터 제공받았다. 뽕나무 열매는 습식 분쇄기 (Super Masscolloider, MKZA 10-15J IV; Masuko Sangyo Co., Saitama, Japan)를 이용

하여 분쇄하고, 15°C, 11,000 × g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조 한 다음 실험에 사용하였다.

### 총 페놀성 화합물, 총 플라보노이드 및 안토시아닌 분석

총 페놀성 화합물 함량은 Folin-Denis [10]의 방법으로 측정하였으며 gallic acid equivalent (mg GAE/100 g)로 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 aluminum chloride 방법 [11]에 따라 측정하였으며 quercetin equivalent (mg QE/100 g)로 표시하였다. 안토시아닌 함량은 ultra-performance liquid chromatography (UPLC) 방법 [12]으로 분석하였으며 cyanidin 3-O-glucoside와 cyanidin 3-O-rutinoside를 기준으로 시료 100 g당 mg으로 나타내었다.

### 3T3-L1 지방세포 배양 및 분화

3T3-L1 전구지방세포 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 10% fetal calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 2 mM glutamine (Invitrogen)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다 [13]. 3T3-L1 전구지방세포를 지방세포로의 분화를 유도하기 위하여 세포가 약 80%의 밀집도 (confluency)를 나타낼 때 분화유도물질 (10 µg/mL insulin, 0.25 µM dexamethasone, 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylwanthine; Invitrogen)을 첨가한 DMEM 배지에서 2일간 지방세포 분화를 유도한 다음 10% fetal bovine serum를 함유하는 DMEM 배지에서 7일간 배양하였다.

### 세포 독성 평가

세포 독성 평가는 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)를 사용하여 water-soluble tetrazolium salt-8 assay 방법으로 세포 생존율을 측정하였다 [13]. MJ 시료는 0, 10, 50, 100, 500 ng/mL 농도로 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 1, 2, 5 및 7일 동안 각각 배양하였으며 배양액은 배양기간 동안 2-3일마다 교체하였다. 흡광도는 microplate reader (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였다. 각 세포에 대한 독성은 각각의 대조군의 평균 흡광도 값을 구하여 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

### Oil red O 염색

지방세포는 PBS로 세척하고 10% formalin/PBS (pH 7.4)에서 세포를 고정한 후, 0.6% oil red O dye를 이용하여 축적된 지방을 염색하였다 [13]. 염색된 지방 함량을 측정하기 위해서 4% Nonidet P-4가 포함된 용액으로 용해한 후 분광광도계를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지방 함량은 대조군의 평균 흡광도 값을 구하여 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

### Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

qRT-PCR을 수행하기 위해 지방세포의 총 RNA는 TRIzol 시약 (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)을 사용하여 추출하고, complementary DNA (cDNA)는 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 추출한 RNA로부터 합성하였다 [9]. 각각의 cDNA는 2X SYBR Green PCR Master Mix (Bioneer)와 혼합한 후, Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research, Sydney, Australia)에서 qRT-PCR을 수행하였다. 사용된 primers의 염기서열은 Table 1과 같다.

**Table 1.** Primers used for qRT-PCR

| Name    | GeneBank No. | Primer sequence (5'-3')                            |
|---------|--------------|--|
| aP2     | NM_024406    | F: CGACAGGAAGGTGAAGAGCA<br>R: ATTCCACCACCAGCTTGTC  |
| β-actin | NM_007393    | F: GGACCTGACAGACTACCTCA<br>R: GTTGCCAATAGTGATGACCT |
| CEBP-α  | NM_007678    | F: ATAGACATCAGCGCTACAT<br>R: TCCCGGGTAGTCAAAGTCAC  |
| IL-6    | NM_031168    | F: CCTTCTACCCCAATTTCCA<br>R: TAACGCACTAGTTTGCCGA   |
| iNOS    | BC062378.1   | F: GCTACTGGGTCAAAGACAAG<br>R: GCTGAACCTCCAGTCATTGT |
| MCP-1   | NM_019812    | F: TGCTGACCCCAAGAAGGAAT<br>R: TGAGGTGGTTGTGGAAAAGG |
| PPAR-γ  | NM_011146    | F: TTGATTTCTCCAGCATTCT<br>R: TGTGTAGAGCTGGGTCTTT   |
| TNF-α   | NM_013693    | F: AGCACAGAAAGCATGATCCG<br>R: CCACAAGCAGGAATGAGAA  |

qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; aP2, adipocyte protein 2; CEBP-α, CCAAT/enhancer binding protein-α; IL-6, interleukin-6; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; PPAR-γ, proliferator-activated receptor-γ; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

유전자 발현에 대한 상대적인 정량은 β-actin으로 표준화하고 delta-delta Ct 방법을 이용하여 측정하였다 [14].

miR 발현 분석을 위해 miRNA cDNA Synthesis Kit with Poly (A) Polymerase Tailing (ABM Inc., Richmond, BC, Canada)을 사용하여 cDNA를 합성하였다 [9]. 합성된 cDNA는 EvaGreen miRNA Master Mix (ABM Inc.)를 사용하여 증폭한 후, miR-21, miR-132 및 U6 특이적 프라이머 (ABM Inc.)를 반응시켜 miR을 정량 하였다. qRT-PCR은 Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia)을 사용하여 수행하였다. miR-132 및 miR-143의 수준은 U6 snRNA로 표준화하고 delta-delta Ct 방법을 사용하여 정량하였다 [14].

### 통계 분석

모든 실험결과는 평균 (Mean)과 표준오차 (SEM)로 나타내고 SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계 분석하였다. 다양한 농도의 시료를 처리한 그룹 간의 유의미한 차이는 일원배치 분산분석 (1-way analysis of variance, ANOVA)을 한 후 Tukey's multiple range test에 의하여 p < 0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결과

### 총 페놀성 화합물, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량

MJ의 총 페놀성 화합물, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량은 **Table 2**에 나타내었다. MJ의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 4.29 ± 0.03 mg/100 g 및 7.37 ± 0.17 mg/100 g이었다. MJ의 총 안토시아닌 함량은 444.41 ± 10.57 mg/100 g으로 나타났다. Cyanidin 3-O-glucoside와 cyanidin 3-O-rutinoside는 각각 301.11 ± 7.92 mg/100 g 및 143.30 ± 2.65 mg/100 g으로 나타났다.

**Table 2.** Bioactive compounds found from MJ

| Bioactive compounds     | Contents (mg/100 g) |
|-------------------------|---------------------|
| Total phenolics         | 4.29 ± 0.03         |
| Total flavonoids        | 7.37 ± 0.17         |
| Cyanidin 3-O-glucoside  | 301.11 ± 7.92       |
| Cyanidin 3-O-rutinoside | 143.30 ± 2.65       |

Data are expressed as mean ± SEM. The contents of total phenolics and flavonoid were expressed as mg of gallic acid and quercetin equivalents per 100 g of dry powder. The contents of anthocyanin were expressed as mg of cyanidin 3-O-glucoside and cyanidin 3-O-rutinoside equivalents per 100 g of dry powder. MJ, mulberry fruit juice powder.

### 세포독성 평가

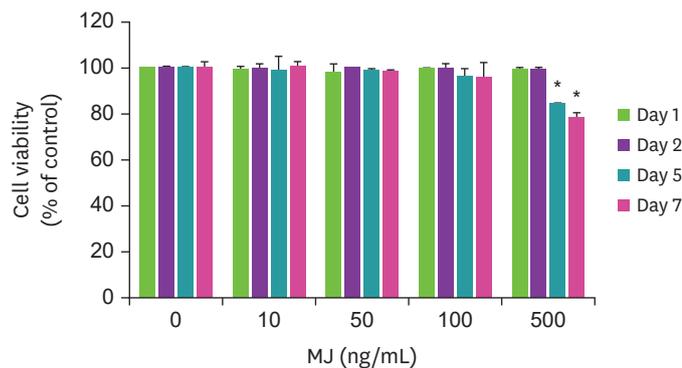
3T3-L1 세포가 분화하는 동안 MJ의 다양한 농도와 시간 별로 처리하여 세포 생존율 측정하여 세포독성을 평가하였다. MJ은 0, 10, 50, 100 및 500 ng/mL 농도를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 1, 2, 5 및 7일 동안 배양하였다. MJ의 세포 생존율은 100 ng/mL 이하 농도에서 7일 동안 유의적인 변화가 없었으나, 고농도인 500 ng/mL 농도에서는 처리 5일째부터 대조군에 비해 세포 생존율이 유의적으로 감소하여 세포독성을 나타낼 수 있었다 (Fig. 1).

### 지질축적 억제 효과

지방세포 분화 동안 지질 축적 억제 효과를 조사하기 위해 3T3-L1 지방세포에 0, 10, 50, 및 100 ng/mL 농도의 MJ를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 7일 동안 배양하였다. 지방세포 내 지질 함량 측정은 oil-red O 염색에 의해 세포 내 지방입자를 염색한 후 흡광도를 측정하여 정량하였다. 지방세포 내 지질 함량은 10, 50, 및 100 ng/mL MJ의 농도에서 대조군에 비해 각각 3.4%, 9.7% 및 18.0% 감소하였다 (Fig. 2).

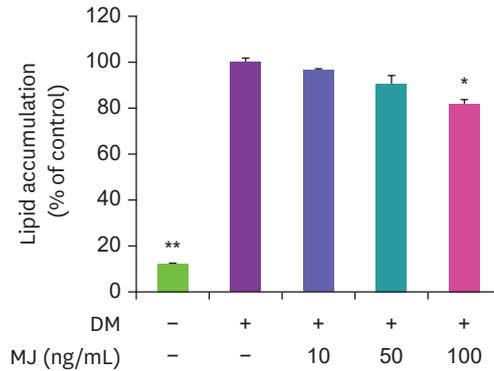
### 지방분화에 관련된 유전자 발현

전구지방세포에서 지방세포로 분화하는 동안 3T3-L1 세포에서 지방 분화 촉진에 관여하는 유전자인 PPAR-γ, C/EBPα 및 aP2의 mRNA 수준을 조사하였다. 세포는 0 (대조군), 50 및 100 ng/mL의 MJ 농도를 첨가하여 7일 동안 배양하였다. PPAR-γ, C/EBPα 및 aP2의 mRNA 수준은 100 ng/mL의 MJ 농도에서 대조군에 비해 각각 50.7%, 36.8% 및 49.7% 유의적으로 감소하였다 (Fig. 3).



**Fig. 1.** Effects of cell viability on MJ in 3T3-L1 cells. Cells were treated with 0 (control), 10, 50, 100, or 500 ng/mL of MJ, and incubated for 1, 2, 5, or 7 days. Cell viability was determined using water-soluble tetrazolium-8 assay. Values expressed are averages ± SEM.

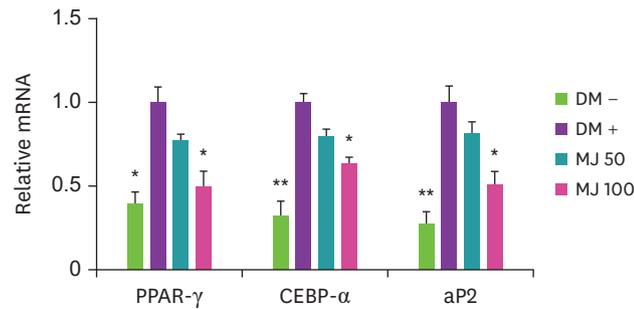
MJ, mulberry fruit juice powder.  
\*p < 0.05 versus untreated control.



**Fig. 2.** Effects of MJ on intracellular lipid accumulation during adipocyte differentiation. 3T3-L1 cells were treated with 0 (DM-treated control), 10, 50 and 100 ng/mL of MJ, and incubated for 7 days. Intracellular lipid content was stained with oil-red O dye, and the stained oil droplets were dissolved with isopropanol and quantified by spectrophotometric analysis. Values expressed are averages  $\pm$  SEM.

DM, differentiation medium containing 3-isobutyl-1-methylanthine, dexamethasone, and insulin; MJ, mulberry fruit juice powder.

\*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 versus DM-treated control.



**Fig. 3.** Effects of MJ on the expression of genes involved in adipogenesis in adipocytes. Cells were treated with 0 (DM-treated control), 50 and 100 ng/mL of MJ, and incubated for 7 days. The mRNA levels were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction. Values expressed are averages  $\pm$  SEM.

MJ, mulberry fruit juice powder; DM, differentiation medium containing 3-isobutyl-1-methylanthine, dexamethasone, and insulin; aP2, adipocyte protein 2; CEBP- $\alpha$ , CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$ ; PPAR- $\gamma$ , proliferator-activated receptor- $\gamma$ ; mRNA, messenger RNA.

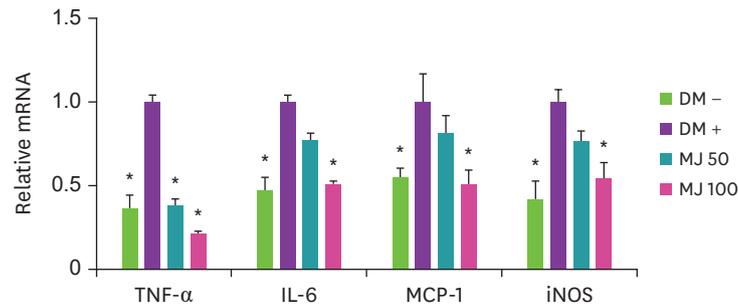
\*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 versus DM-treated control.

### 염증 반응에 관여하는 유전자 발현

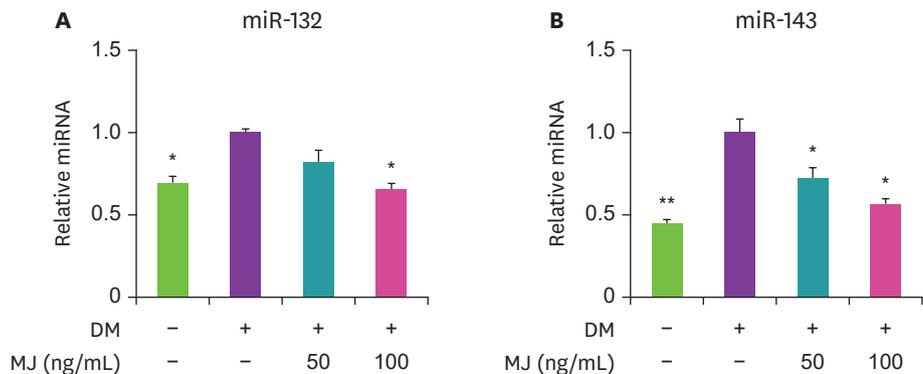
MJ가 지방세포에서 염증 매개물질인 TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 및 iNOS의 mRNA 수준에 영향을 미치는지 평가 위해 3T3-L1 세포에 0 (대조군), 50 및 100 ng/mL의 MJ 농도를 첨가하여 7일 동안 배양하였다. TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 및 iNOS의 mRNA 수준은 100 ng/mL의 MJ 농도에서 대조군에 비해 각각 79.0%, 49.0%, 49.0% 및 45.7% 유의적으로 감소하였으며 TNF- $\alpha$ 는 50 ng/mL의 MJ 농도에서도 61.7% 유의하게 감소하였다 (Fig. 4).

### miR-132 및 miR-143 조절 기전

본 연구에서는 3T3-L1 지방세포에서 염증반응 조절에 관여하는 miR-132와 miR-143에 대해 조사하기 위해 세포에 0 (대조군), 50 및 100 ng/mL의 MJ 농도를 첨가하여 7일 동안 배양하였다. miR-132와 miR-143 발현 수준은 50 및 100 ng/mL의 MJ 농도에서 대조군에 비해 각각 35.0% 및 43.5% 유의적으로 감소하였으며 (Fig. 5) miR-143에서는 50 ng/mL의 MJ 농도에서도 27.4% 유의하게 감소하였다 (Fig. 5B).



**Fig. 4.** Effects of MJ on the expression of genes involved in inflammation in adipocytes. Cells were treated with 0 (DM-treated control), 50 and 100 ng/mL of MJ, and incubated for 7 days. The mRNA levels were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction. Values expressed are averages ± SEM. MJ, mulberry fruit juice powder; DM, differentiation medium containing 3-isobutyl-1-methylzanthine, dexamethasone, and insulin; IL-6, interleukin-6; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; TNF-α, tumor necrosis factor-α. \*p < 0.05 versus DM-treated control.



**Fig. 5.** Effects of MJ on miR-132 (A) and miR-143 (B) in adipocytes. 3T3-L1 cells were treated with 0 (DM-treated control), 50 and 100 ng/mL of MJ, and incubated for 7 days. The miRNA levels were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction. Values expressed are averages ± SEM. MJ, mulberry fruit juice powder; miR, microRNA; DM, differentiation medium containing 3-isobutyl-1-methylzanthine, dexamethasone, and insulin. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 versus DM-treated control.

### 고찰

본 연구는 3T3-L1 지방세포에서 MJ의 염증 및 miRs 조절기전에 대해 조사하였다. 먼저, 3T3-L1 지방세포에서 MJ의 잠재적인 세포독성은 10-100 ng/mL 농도 범위에서 영향을 받지 않았으나 500 ng/mL의 농도에서는 세포독성을 나타냈다. 따라서 본 연구에서 사용될 농도 범위는 세포 독성에 영향을 미치지 않는 ~100 ng/mL 농도 내의 MJ를 사용하였다. 이전 연구에서 우리는 뽕나무 열매의 초고압 추출물이 3T3-L1 지방세포 분화동안 세포내 지질 및 중성지방 축적 억제를 통한 항 지방형성 효과가 있음을 보고하였다 [9]. Park 등 [15]은 뽕나무 열매로부터 추출한 ethyl acetate 분획물이 3T3-L1 지방세포의 분화 억제 효과를 보고하였으며, Choi 등 [16]은 한국산 뽕나무 열매에서 추출한 다당류가 3T3-L1 전구지방세포의 세포증식 억제 효과를 보고하였다. 또한, 뽕나무 열매의 물 추출물은 고지방식을 급여한 햄스터의 체중과 혈청 지질 수준을 감소시켰다 [17]. 본 연구의 결과에서 3T3-L1 지방세포 분화 동안 MJ의 처리 농도 의존적으로 세포내 지질 축적이 감소되었고 이 결과는 MJ가 지질 축적을 억제하는 데 도움이 될 수 있음을 나타내고 있다.

지방세포의 분화 단계에서 PPAR- $\gamma$ 와 CEBP- $\alpha$ 는 지방세포 분화에 중요한 역할을 하는 전사 조절 인자이며, 특히 지방 특이적 단백질인 aP2는 PPAR- $\gamma$ 와 CEBP- $\alpha$ 에 의해 발현이 유도된다 [18,19]. 이전 연구에서, 뽕나무 열매의 ethyl acetate 분획물은 3T3-L1 지방세포의 PPAR- $\gamma$ 와 CEBP- $\alpha$  유전자 발현을 억제하고, 뽕나무 열매의 초고압 추출물은 3T3-L1 지방세포 분화 동안 PPAR- $\gamma$ , CEBP- $\alpha$  및 aP2 발현을 억제하였다 [9,15]. 또한 뽕나무 잎의 에탄올 추출물은 3T3-L1 지방세포에서 지질 축적 억제와 PPAR- $\gamma$  및 CEBP- $\alpha$ 의 단백질 수준을 감소시켰다 [20]. 이 결과들과 비슷하게, 본 연구에서 MJ는 지방 세포에서 지방생성에 관여하는 PPAR- $\gamma$ , CEBP- $\alpha$  및 aP2 유전자 발현을 감소시켰음을 확인하였다.

지방 전구세포는 특정한 상태에서 대식세포로 전환될 수 있으며, TNF- $\alpha$ , IL-6 및 MCP-1과 같은 전염증성 사이토카인이 대식세포 활성화를 자극한다 [3,21]. 염증반응에서 전염증성 사이토카인에 의해 대식세포가 활성화되면 염증 매개물질인 iNOS를 합성하여 nitric oxide (NO)를 생성한다 [22,23]. 대식세포에서 뽕나무 열매의 초고압 추출물이 lipopolysaccharide에 의해 유발된 염증 상태에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 생성 증가를 감소시키고 iNOS 유전자 및 단백질 발현 억제를 통해 NO 생성을 감소시켰다 [12]. 최근 연구에서 우리는 고지방식이와 뽕나무 열매의 초고압 추출물을 섭취한 쥐의 지방조직에서 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 MCP-1의 유전자 발현 억제와 동시에 이들의 단백질 함량이 감소하는 것을 보여주었다 [24]. 다수의 선행연구에서 안토시아닌이 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CRP 및 iNOS와 같은 염증 매개물질의 증가를 억제한다고 보고하였다 [25-27]. Lim 등 [28]은 고지방으로 유도한 비만 모델에서 뽕나무 잎을 단독으로 투여했을 때 보다 뽕나무 잎과 열매를 혼합하여 투여했을 때 몸무게 증가가 감소하고 간과 지방에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1, iNOS, CRP와 같은 염증성 마커들이 감소했다고 보고하였다. 본 연구에서는 MJ 처리에 의한 TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 및 iNOS의 유전자 발현이 억제되는 것으로 나타났으며, 이는 MJ가 지방 염증성 매개물질들의 생성 억제에 유익한 효과가 있을 것으로 사료된다.

miR는 약 22개의 뉴클레오타이드로 구성된 작은 비발현 RNA 분자로, 세포의 발생, 분화, 사멸 등 세포 내에서 생물학적 조절기전에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 염증 반응에서 miR는 염증을 조절하는 세포 및 분자 네트워크를 통해 염증성 질환의 발병에 영향을 미친다 [29]. 특히 miR-132는 인간 지방세포에서 NF $\kappa$ B의 활성화와 염증유발 매개체인 IL-8 및 MCP-1의 생성을 유도하여 지방 세포의 만성 염증 상태에 기여하는 것으로 나타났다 [30]. MiR-143은 지방세포 분화동안 상향 조절되고 고지방식이 섭취한 마우스에서 체중과 장간막 지방조직 무게가 증가하였는데 이 조직에서 miR-143 발현이 증가하는 것을 보였다 [31,32]. 또한 miR-143 수준은 PPAR- $\gamma$ 와 aP2 발현 수준과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 나타났다 [32]. 이전 연구에서 뽕나무 열매의 초고압 추출물이 3T3-L1 지방세포 분화동안 miR-21과 miR-143 발현 억제를 보고하였으며 최근에는 이 추출물이 고지방식을 섭취한 비만 쥐의 지방조직에서 miR-21/132/143 조절을 통해 항염증 효과가 나타난다고 보고하였다 [9,24] 본 연구에서는 MJ가 3T3-L1 지방세포 분화동안 miR-132과 miR-143 발현을 억제한다는 것을 확인하였으며 이는 염증과 지방분화에 관여하는 miR-132/143의 조절에 MJ가 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

결론적으로 MJ는 3T3-L1 지방세포 분화동안 지질 축적을 억제하고, 지방형성 및 염증 조절에 관여하는 유전자 발현 억제와 관련이 있음을 나타내고 있다. 또한 MJ의 지질 축적 억제 효과에 miR-132/143의 조절이 부분적으로 관여한다는 것을 시사하고 있다.

## 요약

본 연구는 뽕나무 열매 착즙 분말 (MJ)이 지방세포 분화과정에서 염증에 관여하는 유전자 발현 및 miR-132/143 조절에 미치는 효과에 중점을 두고 조사하였다. MJ는 3T3-L1 지방세포 분화 동안 지질축적이 억제되었고 PPAR- $\gamma$ , CEBP- $\alpha$  및 aP2와 같은 지방형성 유전자 발현을 억제하였다. 또한 염증 조절 매개체인 TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 및 iNOS 유전자 발현이 MJ 처리에 의해 감소되었다. MJ의 지질 축적 억제 효과는 염증과 지방분화에 관여하는 miR-132/143의 발현 감소와 관련이 있음을 확인하였다. 따라서 MJ는 염증을 동반하는 비만 예방 및 치료에 도움이 될 수 있는 식품 소재로서 가능성이 있음을 시사하고 있다. 그러나 MJ의 주요 성분인 안토시아닌의 생체이용율은 1-2% 미만으로 추정되며 예상되는 표적 조직이나 혈류에서 미량 검출되는 것으로 알려져 있다 [33]. 이를 해결하기 위해서는 생체 내 동물실험을 통한 다각적인 분석이 향후 진행되어야 할 것으로 판단된다.

## REFERENCES

1. Alessi MC, Lijnen HR, Bastelica D, Juhan-Vague I. Adipose tissue and atherothrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33(5-6): 290-297.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
2. Cook DG, Mendall MA, Whincup PH, Carey IM, Ballam L, Morris JE, et al. C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 2000; 149(1): 139-150.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
3. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007; 132(6): 2169-2180.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
4. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336(15): 1066-1071.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
5. Kim HB, Park KJ, Seuk YS, Kim SL, Sung GB, Nam HW, et al. Morphological characteristics and physiological effects of mulberry leaves and fruits with wild varieties. *Korean J Sericult Sci* 2002; 44(1): 4-8.
6. Yuan Q, Zhao L. The mulberry (*Morus alba* L.) fruit-a review of characteristic components and health benefits. *J Agric Food Chem* 2017; 65(48): 10383-10394.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
7. Wang Y, Xiang L, Wang C, Tang C, He X. Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. *PLoS One* 2013; 8(7): e71144.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
8. Lee S, Lee MS, Chang E, Lee Y, Lee J, Kim J, et al. Mulberry fruit extract promotes serum HDL-cholesterol levels and suppresses hepatic microRNA-33 expression in rats fed high cholesterol/cholic acid diet. *Nutrients* 2020; 12(5): 1499.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
9. Lee MS, Kim Y. Mulberry fruit extract ameliorates adipogenesis via increasing AMPK activity and downregulating microRNA-21/143 in 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 2020; 23(3): 266-272.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
10. Folin O, Denis W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J Biol Chem* 1915; 22(2): 305-308.  
[CROSSREF](#)
11. Zdravković JM, Aćamović-Djoković GS, Mladenović JD, Pavlović RM, Zdravković MS. Antioxidant capacity and contents of phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in lettuce. *Hem Ind* 2014; 68(2): 193-198.  
[CROSSREF](#)
12. Jung S, Lee MS, Choi AJ, Kim CT, Kim Y. Anti-Inflammatory effects of high hydrostatic pressure extract of mulberry (*Morus alba*) fruit on LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Molecules* 2019; 24(7): E1425.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

13. Lee MS, Kim Y. *Chrysanthemum morifolium* flower extract inhibits adipogenesis of 3T3-L1 cells via AMPK/SIRT1 pathway activation. *Nutrients* 2020; 12(9): 2726.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
15. Park HS, Shim SM, Kim GH. Inhibitory effects of ethyl acetate-soluble fraction from *Morus alba* on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Nat Prod Commun* 2013; 8(11): 1579-1582.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
16. Choi JW, Synytsya A, Capek P, Bleha R, Pohl R, Park YI. Structural analysis and anti-obesity effect of a pectic polysaccharide isolated from Korean mulberry fruit Oddi (*Morus alba* L.). *Carbohydr Polym* 2016; 146: 187-196.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
17. Peng CH, Liu LK, Chuang CM, Chyau CC, Huang CN, Wang CJ. Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *J Agric Food Chem* 2011; 59(6): 2663-2671.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
18. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBPα induces adipogenesis through PPARγ: a unified pathway. *Genes Dev* 2002; 16(1): 22-26.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
19. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1302(2): 93-109.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
20. Yang SJ, Park NY, Lim Y. Anti-adipogenic effect of mulberry leaf ethanol extract in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Res Pract* 2014; 8(6): 613-617.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
21. Charrière G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, Penicaud L, et al. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* 2003; 278(11): 9850-9855.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
22. Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. *Transpl Int* 1994; 7 Suppl 1: S647-S649.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
23. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(4-5): 434-456.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
24. Jung S, Lee MS, Chang E, Kim CT, Kim Y. Mulberry (*Morus alba* L.) fruit extract ameliorates inflammation via regulating microRNA-21/132/143 expression and increases the skeletal muscle mitochondrial content and AMPK/SIRT activities. *Antioxidants* 2021; 10(9): 1453.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
25. Herath HM, Takano-Ishikawa Y, Yamaki K. Inhibitory effect of some flavonoids on tumor necrosis factor-α production in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage cell line J774.1. *J Med Food* 2003; 6(4): 365-370.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
26. Kelley DS, Rasooly R, Jacob RA, Kader AA, Mackey BE. Consumption of Bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women. *J Nutr* 2006; 136(4): 981-986.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
27. Tsuda T, Horio F, Osawa T. Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2002; 48(4): 305-310.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
28. Lim HH, Lee SO, Kim SY, Yang SJ, Lim Y. Anti-inflammatory and antiobesity effects of mulberry leaf and fruit extract on high fat diet-induced obesity. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013; 238(10): 1160-1169.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
29. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2012; 30(1): 295-312.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
30. Strum JC, Johnson JH, Ward J, Xie H, Feild J, Hester A, et al. MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. *Mol Endocrinol* 2009; 23(11): 1876-1884.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

31. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279(50): 52361-52365.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
32. Takanabe R, Ono K, Abe Y, Takaya T, Horie T, Wada H, et al. Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376(4): 728-732.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
33. Kay CD, Pereira-Caro G, Ludwig IA, Clifford MN, Crozier A. Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: a review of recent evidence. *Annu Rev Food Sci Technol* 2017; 8: 155-180.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)