

금화규(*Abelmoschus manihot*) 뿌리 추출물의 면역증진 및 항비만효과

유주형¹, 금나경¹, 여주호¹, 정진부^{2*}

¹국립안동대학교 생약자원학과, 대학원생, ²교수

Immuno-enhancing and Anti-obesity Effect of *Abelmoschus manihot* Root Extracts

Ju Hyeong Yu¹, Na Gyeong Geum¹, Joo Ho Ye¹ and Jin Boo Jeong^{2*}

¹Graduate Student and ²Professor, Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Andong 36729, Korea

Abstract - In this study, we investigated *in vitro* immune-enhancing and anti-obesity activity of *Abelmoschus manihot* roots (AMR) in mouse macrophage RAW264.7 cells and mouse adipocytes 3T3-L1 cells. AMR increased the production of immunostimulatory factors such as nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in RAW264.7 cells. The inhibition of toll like receptor (TLR) 2 and 4 blocked AMR-mediated production of immunostimulatory factors in RAW264.7 cells. In addition, the inhibition of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) signaling pathway reduced AMR-mediated production of immunostimulatory factors. From these results, AMR is considered to have immune-enhancing activity through TLR2/4-mediated activation of MAPKs signaling pathway. In addition, AMR inhibited lipid accumulation and reduced the protein level such as CCAAT enhancer-binding protein alpha (CEBP α), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), perilipin-1, adiponectin and fatty acid binding protein 4 (FABP4) associated with lipid accumulation in 3T3-L1 cells, indicating that AMR may have anti-obesity activity. Based on these results, AMR is expected to be used as a potential functional agent for immune enhancement and anti-obesity.

Key words – Adipocytes, *Abelmoschus manihot*, Anti-obesity activity, Immune-enhancement, Macrophage

서 언

면역이란 인체를 위협하는 유기물이나 독소와 같은 외부요소에서부터 몸을 보호하려는 능력을 일컫는다. 최근 COVID-19와 관련하여 바이러스와 같은 외부요인으로서의 위협에 있어 면역체계의 기능성과 효율성을 높이려는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Alagawany *et al.*, 2021). 선천면역 일부분을 담당하는 대식세포는 신체로 침입하는 외부물질을 잡아먹는 탐식 작용을 통해 면역과 조직의 항상성에 기여 하는 것으로 알려져 있다(Duque and Descoteaux, 2014). 대식세포는 염증반응 유도를

통해 nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 면역자극인자를 분비하여 면역에 관여하지만, 해당 사이토카인의 과도한 생성은 패혈성 쇼크와 같은 반응을 유발할 수 있으므로, 대식세포를 통한 면역자극인자의 조절은 면역반응에 있어서 중요한 의미를 갖는다(Duque and Descoteaux, 2014). 또한, 면역은 비만과도 연관성이 있다. 비만은 세계보건기구(WHO)에 의해 체내지방조직이 비정상적으로 과다한 상태로 질환으로 정의된다(Cuthbertson *et al.*, 2020). 비만의 경우 신체의 면역체계를 약화시키는 주요 원인으로 알려져 있으며(Bandaru *et al.*, 2013) 비만은 전 세계적으로 주요한 건강문제로 주목받고 있다(Kopelman, 2000). 또한, 비만과 면역 사이의 연관성에 관한 연구에서 비만은 Bcell의 활동

*교신저자: E-mail jjb0403@anu.ac.kr

Tel. +82-54-820-7757

을 저해하는 것으로 보고되었으며(Kosaraju *et al.*, 2017), 최근 비만은 COVID-19와 같은 감염성 바이러스 질환에 취약한 체내 환경을 만들어 사망위험을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Hussain *et al.*, 2020).

금화규(*Abelmoschus manihot*)는 아욱과(Malvaceae)에 속하며, 닥풀과 같은 계열로 황촉규로 불리며 과거 민간요법으로 위염 또는 위궤양 치료를 위해 사용되어왔으며, 뿌리 부분에 glucose, xylose, D-galactose, L-arabinose 등 풍부한 점액질을 함유한 것으로 알려져 있다(Jeon and Kang, 2020). 금화규는 선행연구에서 면역 활성화에도 약리효과를 보인다는 연구보고가 있지만, 자세한 연구된 바가 없어 RAW264.7 세포와 3T3-L1 세포를 이용하여 면역과 항비만 활성을 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

마우스 대식세포인 RAW264.7세포 배양을 위한 배지인 DMEM/F-12는 Lonza (Morristown, NJ, USA)에서 구매하였다. Dexamethasone, 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), insulin, Oil Red O staining solution, C29 (TLR2 inhibitor), TAK-242 (TLR4 inhibitor), PD98059 (ERK1/2 inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor) 및 SP600125 (JNK inhibitor)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. 그리고 Western blot 분석을 위한 일차 항체와 이차 항체들은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

추출물 제조

본 연구의 시료인 금화규(*Abelmoschus manihot*) 뿌리는 국립산림과학원 산림약용자원연구소에서 식물학적 식별 후 농업법인 E-Farm (Andong, Korea)에서 제공받았다. 동결건조 후 분쇄된 금화규 뿌리 20 g을 400 mL 증류수에 침지한 후 15°C에서 150 rpm으로 교반하면서 3일 동안 추출하였다. 3일 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 금화규 뿌리 추출물을 회수한 후 동결건조하여 최종 금화규 뿌리 추출물(AMR, 회수율 17.4%)을 얻었다. 동결건조된 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 -80°C의 냉동고에 보관하면서 연구를 위한 시료로 사용되었다.

세포 배양

본 연구에서 사용된 마우스 대식세포 RAW264.7 및 마우스 지방전구세포 3T3-L1은 American Type Culture Collection

(Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. RAW264.7 세포는 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin이 포함된 DMEM/F-12 배지로 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양되었다. 3T3-L1 세포는 10% bovine calf serum, 100 U/mL penicillin 과 100 µg/mL streptomycin이 포함된 DMEM/F-12 배지로 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양되었다.

Griess assay

금화규 뿌리 추출물(AMR)이 RAW264.7세포에서 nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향은 Griess assay로 측정하였다(Seo and Jeong, 2020). RAW264.7세포를 96-well plate에 well 당 2×10^5 cells로 배양하여 세포가 well에 90% 이상 찼을 때 금화규 뿌리 추출물(AMR)을 처리하고 24시간 동안 배양시켰다. 24시간 후, 세포배양액과 Griess 시약 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 1:1 비율로 희석하여 상온에서 15분간 반응시킨 후, UV/Visible spectrophotometer (Xma-3000PC, Human Corporation Co., Seoul, Korea)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Oil red O staining

금화규 뿌리 추출물(AMR)이 3T3-L1세포에서 지질 방출 형성에 미치는 영향을 육안으로 확인하기 위해 Oil Red O staining을 하였다. 3T3-L1세포가 well에 100%차고 2일 후(D0로 지정), 3T3-L1세포를 DMI 배지 (10% FBS, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine과 10 µg/mL insulin)에 48시간 동안 배양하였다. D2에는 3T3-L1세포를 10% FBS와 10 µg/mL insulin을 포함하는 DMEM/F-12 배지에 48시간 동안 배양하였다. 그 후, D4와 D6에는 10% FBS가 포함된 DMEM/F-12 배지로 교체하여 배양하였다. 처리된 3T3-L1 세포를 D8에 회수하여 1 × phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척 후 실온에서 1시간 동안 10% formalin으로 고정시켰다. 고정된 3T3-L1 세포를 DH₂O로 2회 세척 후 60% isopropanol을 처리하여 5분 동안 실온에 방치하였다. 5분 후 3T3-L1세포를 완전히 건조시키고 실온에서 20분 동안 Oil Red O 용액(60% isopropanol과 40% water)으로 염색하였다. DH₂O로 5회 세척 후 염색된 3T3-L1세포의 지질 방출을 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 촬영하였다. 촬영 후 100% isopropanol에 녹여 UV/Visible spectrophotometer (Xma-3000PC, Human Corporation Co., Seoul, Korea)를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

SDS-PAGE and Western blot analysis

세포로부터 단백질을 추출하기 위해 처리 후 세포를 4°C에서 유지된 1 × phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척 후 protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co.)과 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co.)이 포함된 radioimmunoprecipitation buffer (Boston Bio Products, Ashland, MA, USA)를 4°C에서 30분간 처리하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bicinchoninic acid protein assay (Pierce Biotechnology Inc., Waltham, MA, USA)로 정량분석 후 동일량의 단백질을 10% SDS-acrylamide gel로 전기영동하고, PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 이동시킨 후 5% non-fat dry milk로 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 1시간 후 1차 항체를 5% non-fat dry milk에 용해시켜 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 membrane을 0.05% tween-20이 포함된 tris-buffered saline (TBS-T)로 5분간 3회 세척하였다. 그 후 2차 항체는 5% non-fat dry milk에 용해시켜 membrane에 상온에서 1시간 처리하였고, TBS-T로 5분간 3회 세척 후 membrane은 ECL western blotting substrate (Amersham Biosciences Co., Little Chalfont, England)를 이용하여 단백질을 확인하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

세포에서 RNA를 추출하기 위해서 세포를 4°C에서 유지된 1 × PBS로 2회 세척 후 RNeasy Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 1 µg의 total RNA를 Verso cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성

하였다. PCR은 PCR Master Mix Kit (Promega Co., Madison, WI, USA)를 이용하여 수행되었고, 사용된 primer는 Table 1과 같다.

통계분석

모든 결과는 3 회 반복 측정 후 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 처리간 유의성은 Student's *t*-test로 검증하여 p-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다(Micro-soft Exel 2010, Microsoft, Redmond, WA, USA).

결과 및 고찰

금화규 뿌리 추출물의 대식세포 활성화 유도

최근 COVID-19와 같은 감염성 질환으로 인해 면역에 대한 관심이 높아짐에 따라, 면역증진 소재 발굴에 대한 관심 또한 증가하고 있다. 이에 금화규를 활용하여 면역증진 및 항비만 활성 소재 가능성을 분석하였다. 대식세포 활성화를 통해 분비되는 NO는 면역계 독성분자로 림프구를 통한 사이토카인 조절에 관여하는 것으로 알려져 있으며(Bogdan *et al.*, 2000), TNF- α 와 IL-6는 대식세포의 활성화와 항원제시를 강화하여 면역을 조절하는 것으로 보고되고 있다(Wang and He, 2020). 그리고 IL-1 β 는 선천 및 적응형 면역계 세포 활성화를 통해 면역계를 조절하는 것으로 알려져 있다(Weber *et al.*, 2010). 이처럼 대식세포를 통한 NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS와 같은 면역증진 인자의 발현을 조절할 수 있는 천연물은 면역증진 활성에 도움이 될 수 있다고 판단된다. 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포에 금화규 뿌리 추출물(AMR)을 24시간 처리한 후, 대식세포의 활성화 또는 탐식능이 향상되면 발현되는 면역증진 인자를 분석한 결과, 금화규 뿌리 추출물(AMR)이 NO, iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 금화규 뿌리 추출물(AMR)이 RAW264.7 세포의 NO생성능에 미치는 영향은 Griess assay에 의해서 결정되었다(Fig. 1A). RAW 264.7 세포에 금화규 뿌리 추출물(AMR)을 다양한 농도 (0, 10, 30, 50, 100 µg/mL)로 처리하였을 때, 생성된 NO의 농도는 큰 차이를 보이지 않았지만 RT-PCR을 이용한 mRNA 발현에서는 농도 50 µg/mL으로 처리한 그룹에서 iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 본 결과를 미루어 볼 때, 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 대식세포의 면역증진 인자 발현을 유도하는 것으로 파악되며, 체내 면역시스템을 강화시킬 수 있는 소재가 될 수 있다

Table 1. Sequence of oligonucleotide primers used for RT-PCR

Gene Name	Sequence
iNOS	• Forward 5'-ttgtgcatcgacctaggctggaa-3'
	• Reverse 5'-gaccttccgattagcatggaagc-3'
IL-1 β	• Forward 5'-ggcaggcagtcactcatt-3'
	• Reverse 5'-ccaaggccacaggtattt-3'
IL-6	• Forward 5'-gaggataccactccaacagacc-3'
	• Reverse 5'-aagtgcacatcgtgttcataca-3'
TNF- α	• Forward 5'-tggaactggcagaagaggca-3'
	• Reverse 5'-tgctcctccacttggtggtt-3'
GAPDH	• Forward 5'-ggactgtggtcatgagccctcca-3'
	• Reverse 5'-actcacggcaaattcaaggcac-3'

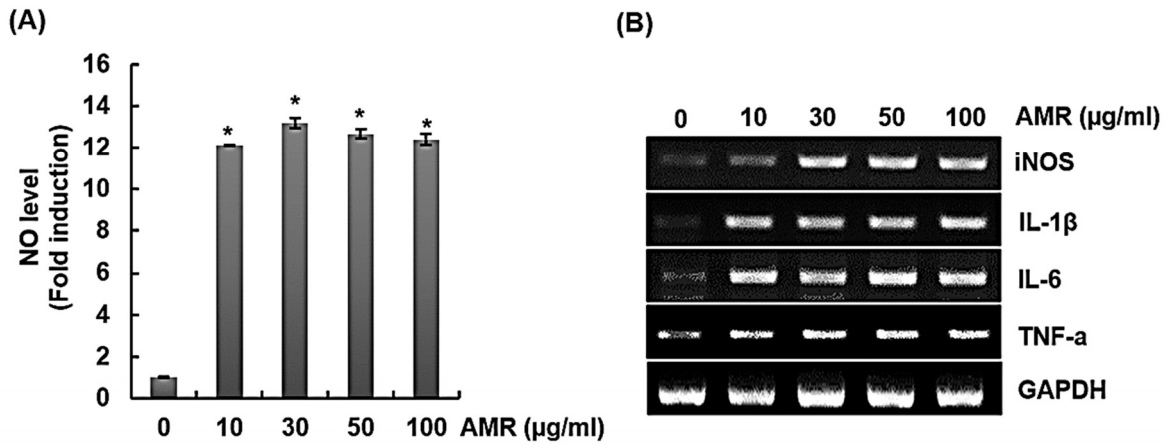


Fig. 1. Effect of AMR on macrophage activation in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with AMR for 24 h. NO level (A), mRNA level (B). GAPDH was used as internal control for RT-PCR.

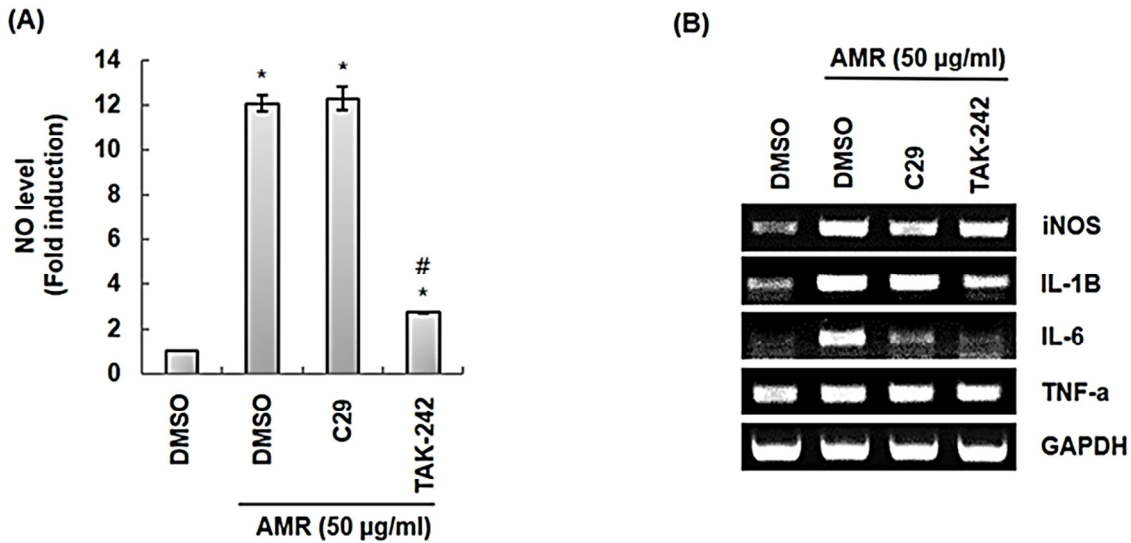


Fig. 2. Effect of TLR2 and TLR4 on the production of immune enhancing factors in AMR-treated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pretreated with C29 (TLR2 inhibitor, 100 µM) or TAK-242 (TLR4 inhibitor, 5 µM) for 2 h and co-treated with AMR (50 µg/mL) for 24 h. NO level (A) and mRNA level (B) were measured by Griess assay and RT-PCR, respectively. *P < 0.05 compared to the cells without the treatment. #P < 0.05 compared to the cells treated with AMR alone. GAPDH was used as internal control for RT-PCR.

고 판단하여 추가실험을 진행하였다.

TLR2와 TLR4가 금화규 뿌리 추출물이 처리된 대식세포에서 면역증진 인자 생성에 미치는 영향

TLRs (Toll-like receptors)는 미생물의 특정한 패턴을 인식하는 역할 수행을 통해 병원체의 침입을 탐지하는 것으로 알려져 있으며(Takeda and Akira, 2004), 선천적인 면역반응의 가장 근본이 되는 기능을 수행하는 것으로 보고되고 있다(Kawai

and Akira, 2007). 그리고 숙주유도분자가 TLR2와 TLR4를 통해 의존적 신호전달 및 자극이 이뤄진다는 선행연구를 토대로 (Erridge, 2010) 금화규 뿌리 추출물(AMR)의 대식세포를 통한 면역증진 인자 발현과정에 TLR2, TLR4가 관련되어 있는지 알아보기 위해 사전에 RAW264.7 세포에 C29 (TLR2 inhibitor), TAK-242 (TLR4 inhibitor)를 2시간 전에 처리하고, 금화규 뿌리 추출물(AMR)을 24시간 병용 처리한 후에 면역증진 인자의 생성을 측정하였다. 결과 TAK-242를 처리한 군에서 NO의 생

성량이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 추가적으로 RT-PCR을 이용한 mRNA 발현에서는 TAK-242를 처리한 구에서 IL-1 β 와 IL-6의 생성이 다소 억제되는 것을 볼 수 있었으나 C29를 처리한 구에서 또한 IL-6의 생성이 줄어드는 것으로 보아 관련 인자 생성은 TLR2와 TLR4가 아닌 다른 경로를 통해 이뤄지는 것으로 보이며, 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다(Fig. 2B)

MAPKs 신호전달이 금화규 뿌리 추출물이 처리된 대식세포에서 면역증진인자생성과 인산화에 미치는 영향

MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) 신호전달체계는 세포의 분화, 증식, 사멸, 염증 등 세포의 과정 및 반응을 조절 시스템으로 MAPKs 통한 전사인자 활성화로는 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinases (JNK), p38 등이 있으며, MAPKs의 신호전달경로는 암

을 비롯한 질병의 병리학적 치료에 있어 중요성이 점차 커지고 있다(Zhang and Liu, 2002). p38 MAPKs의 신호전달경로는 다른 경로와의 신호를 해석하여 적절한 반응을 조절하는 것으로 알려져 있으며(Cuadrado and Nebreda, 2010), ERK1/2 MAPKs는 세포의 이동, 분화, 증식과 같은 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다(Roskoski Jr, 2012). 그리고 JNK MAPKs는 외부자극에 의해 활성화되며, 세포의 사멸, 생존, 분화를 조절한다(Seki et al., 2012). 최근 10년 동안 MAPKs 경로를 구성하고 있는 kinases 구조의 해석은 약물개발에 있어 중요한 표적으로 여겨지고 있다(Kyriakis and Avruch, 2012). 금화규 뿌리 추출물(AMR)이 MAPKs 신호전달 체계를 통해 면역증진 인자 생성에 어떠한 영향을 미치는지 파악하기 위해 RAW264.7 세포에 사전에 2시간 동안 PD98059 (ERK1/2 inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor), 그리고 SP600125 (JNK inhibitor) 처리 후 금화규 뿌리 추출물(AMR)을 24시간 병용처리 한 후에 NO 및 면역증진

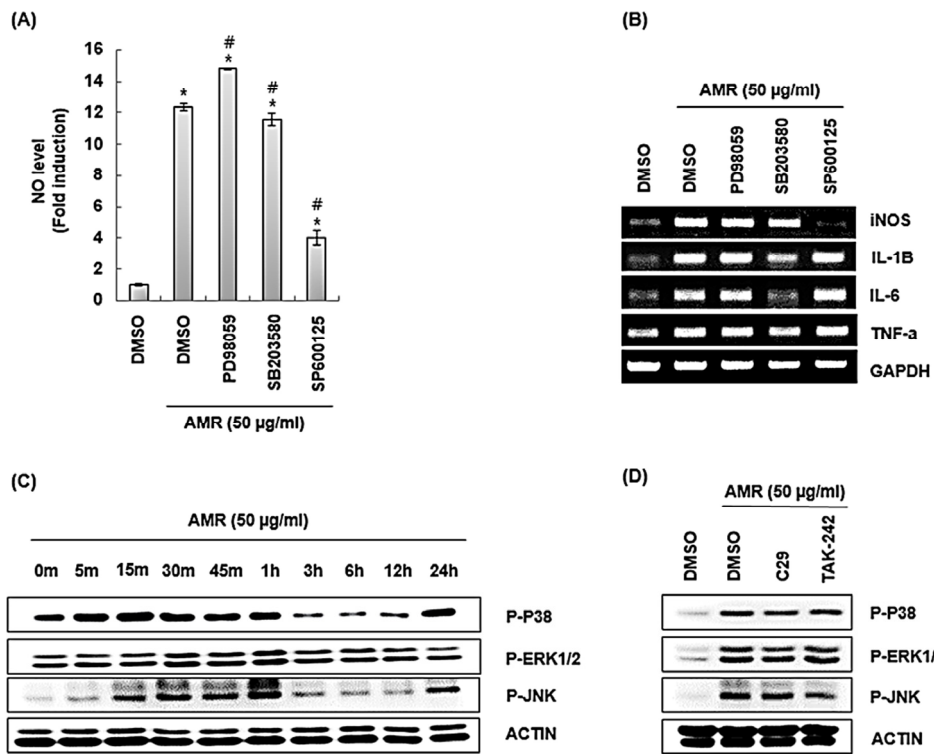


Fig 3. Effect of MAPK signaling pathway on the production of immune enhancing factors in AMR-treated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pretreated with PD98059 (ERK1/2 inhibitor, 40 μ M), SB203580 (p38 inhibitor, 40 μ M), SP600125 (JNK inhibitor, 40 μ M) for 2 h and then co-treated with AMR for 24 h. NO level (A) and mRNA level (B) were measured by Griess assay and RT-PCR. (C) RAW264.7 cells were treated with AMR for the indicated times. (D) RAW264.7 cells were pretreated with C29 (TLR2 inhibitor, 100 μ M) or TAK-242 (TLR4 inhibitor, 5 μ M) for 2 h and treated with AMR for 1 h. *P < 0.05 compared to the cells without the treatment. #P < 0.05 compared to the cells with AMR alone. GAPDH and Actin were used as internal control for RT-PCR and Western blot.

인자 생성의 변화량을 측정하였다. SB203580에 의한 p38의 억제와 SP600125에 의한 JNK의 억제는 금화규 뿌리 추출물(AMR)에 의한 NO와 iNOS의 생성을 감소시키는 것으로 나타났다. 반면, 금화규 뿌리 추출물(AMR)에 의한 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α 의 발현은 SB203580에 의한 p38 억제 시 감소되었다(Fig. 3A and 3B). 이러한 결과는 금화규 뿌리 추출물(AMR)에 의한 대식세포 면역자극인자의 생성은 MAPKs 신호전달 중 p38과 JNK의 활성화에 기인된 것으로 판단된다. 그리하여 금화규 뿌리 추출물(AMR)이 p38과 JNK의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 금화규 뿌리 추출물(AMR)을 시간별로 처리 후 Western blot으로 p38과 JNK의 인산화를 분석하였다. 그 결과 p38과 JNK의 인산화는 각각 금화규 뿌리 추출물(AMR) 처리 5분과 15분 후부터 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3C). 이러한 결과는 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 p38과 JNK의 활성화를 유도한다는 것을 의미한다. TLR2/4는 MAPKs 신호전달의 활성화와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있기 때문에 금화규 뿌리 추출물(AMR)에 의한 p38과 JNK의 활성화에 TLR2/4가 미치는 영향

을 조사하였다. 그 결과 C29에 의한 TLR2 억제와 TAK-242에 의한 TLR4 억제는 금화규 뿌리 추출물(AMR)에 의해 유도되는 p38과 JNK의 인산화를 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 3D). Fig. 3의 결과를 미루어 볼 때, 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 대식세포에서 TLR2/4의 자극을 통해 p38과 JNK의 활성화를 유도하여 면역자극인자의 생성을 증가시키는 것으로 판단된다.

금화규 뿌리 추출물의 처리농도가 3T3-L1 세포의 지질 형성에 미치는 영향

금화규 뿌리 추출물(AMR)이 지방전구세포인 3T3-L1 세포 내 지질형성 억제 활성을 평가하기 위해 DMI 처리를 통해 3T3-L1를 분화시키고, 연속적으로 insulin을 처리하여 분화된 3T3-L1세포 내 지질 형성을 유도하면서 금화규 뿌리 추출물(AMR)을 처리하였다. Oil red O staining을 통해 3T3-L1세포 내 지질 축적 정도를 확인한 결과, 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 DMI/insulin에 의한 3T3-L1 세포 내 지질축적을 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 4A and 4B). 금화규 뿌리 추출물(AMR)

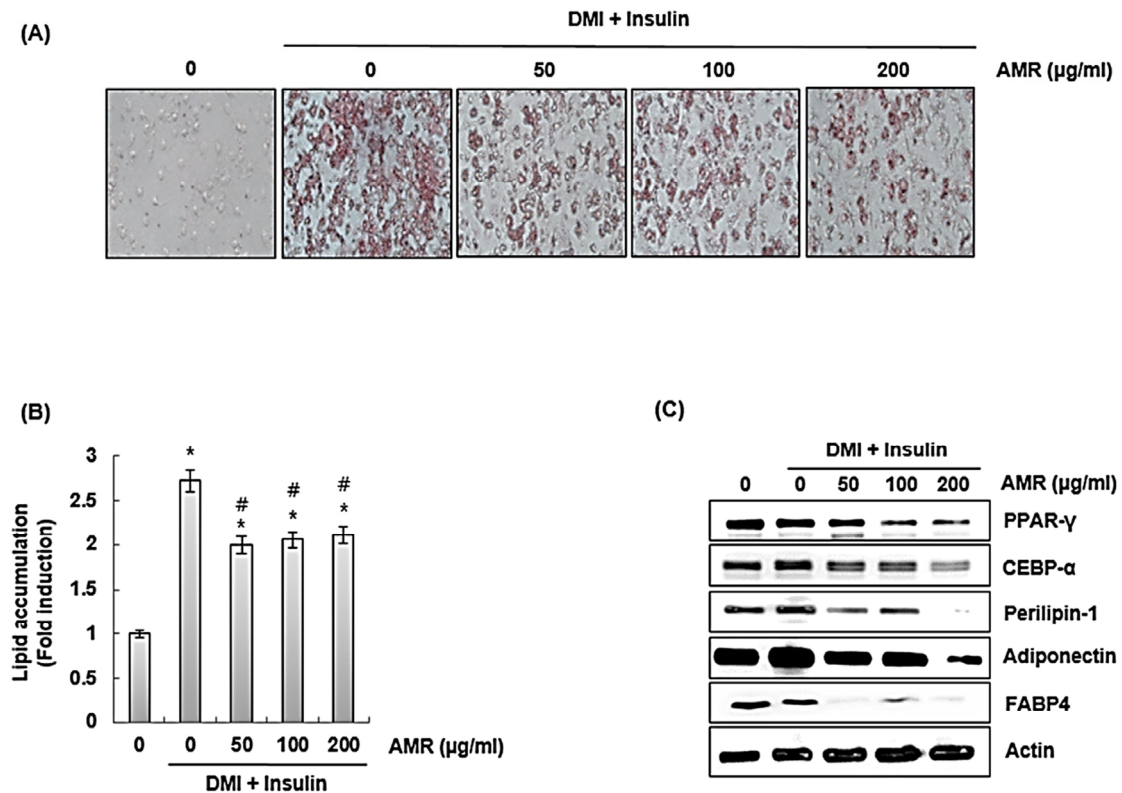


Fig. 4. The effect of AMR on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were co-treated with DMI/insulin and AMR. *P < 0.05 compared to the cells without the treatment. #P < 0.05 compared to the cells treated with DMI/insulin alone. Actin was used as internal control for Western blot.

에 의한 3T3-L1 세포 내 지질축적 억제가 지방세포에서 지질형성 및 축적에 관여하는 인자인 CCAAT/enhancer binding protein- α (CEBP α), peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), perilipin-1, fatty acid binding protein 4 (FABP4), adiponectin의 발현조절에 기인한 것인지 평가하였다. CEBP α 는 지방 또는 간, 장 조직에서 발현되며, PPAR γ 는 지방세포조직에서 발현되어 분화 초기에서 중기 사이의 지방생성을 조절하는 인자로 알려져 있다(Simu *et al.*, 2017). FABP4는 대식세포와 지방세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다. FABP4의 과대발현은 비만, 고혈압과 같은 질환과 관련이 있다고 보고되고 있다(Furuhashi *et al.*, 2014). 그리고 perilipin-1은 지질세포를 구성하는 코팅 단백질로 지질대사를 조절하는 역할을 수행하며(Hansen *et al.*, 2017), adiponectin은 인슐린에 대한 저항성 발달과 민감도 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Kadowaki and Yamauchi, 2005). 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 지방세포에서 DMI/insulin에 의한 CEBP α , PPAR γ , perilipin-1, FABP4, adiponectin의 과대발

현을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4C). 이러한 결과를 미루어 볼 때, 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 지방세포에서 지질형성 및 축적과 관련 인자의 발현을 억제하여 과도한 지질축적으로 억제하는 것으로 판단된다.

금화규 뿌리 추출물 처리시간에 따른 3T3-L1 세포의 지질형성에 미치는 영향

금화규 뿌리 추출물(AMR)이 3T3-L1의 지방분화 시기 중 어느 시기에 영향을 미치는지 확인하기 위해 3T3-L1 세포에 DMI/insulin으로 3T3-L1 세포내 지질 형성 및 축적으로 유도하면서 금화규 뿌리 추출물(AMR)을 시간별로 처리하였다. 그 결과 금화규 뿌리 추출물(AMR)의 처리시간이 길어질수록 3T3-L1세포 내 지질형성 및 축적이 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5A and 5B). 이 결과를 미루어 볼 때 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 3T3-L1세포의 지질형성과정 중 초기-중기-후기 단계 모두 지질축적을 억제하는 것으로 판단된다. 또한 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 지질축적 억제와 유사한 경향으로 지질형성

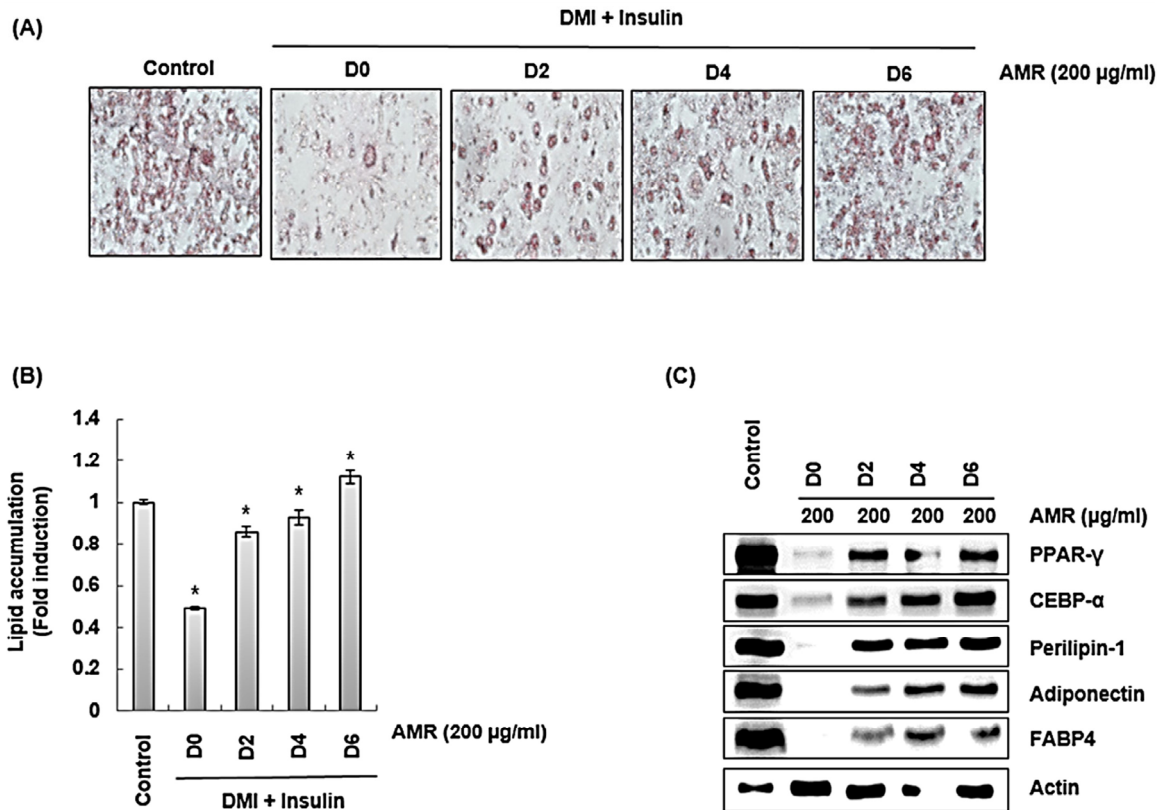


Fig. 5. The effect of AMR on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were co-treated with DMI/insulin and AMR for indicated times. *P < 0.05 compared to the cells without the treatment. Actin was used as internal control for Western blot.

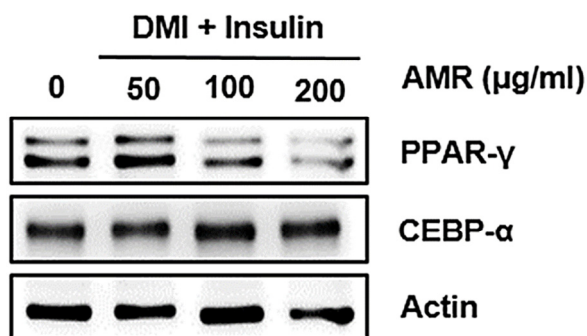


Fig. 6. The effect of AMR on Inhibition of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were co-treated with DMI and AMR for 48 h. Actin was used as internal control for Western blot.

및 축적에 관여하는 CEBP α , PPAR γ , perilipin-1, FABP4, adiponectin의 발현을 억제시켰다(Fig. 5C).

금화규 뿌리 추출물이 3T3-L1 세포 지방세포분화에 미치는 영향

지방세포 내 지질축적은 지방전구세포의 성숙한 지방세포로의 분화가 필수적이기 때문에, 금화규 뿌리 추출물(AMR)이 지방전구세포의 성숙한 지방세포로의 분화에 미치는 영향을 평가하였다. PPAR γ 와 CEBP α 는 성숙한 지방세포 내 지질형성 및 축적에 관여하지만 지방전구세포의 성숙한 지방세포로의 분화에도 관여한다고 알려져 있다. 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 DMI에 의해 유도되는 PPAR γ 의 과대발현을 억제하였으나 CEBP α 의 발현에는 영향이 없는 것으로 나타났다(Fig. 6). 이러한 결과를 미루어 볼 때, 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 PPAR γ 의 과대발현을 감소시켜 지방전구세포에서 성숙한 지방세포로의 분화를 억제하는 것으로 판단된다.

적 요

본 연구에서 금화규 뿌리 추출물(AMR)이 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포의 활성화 유도를 통한 면역증진 활성화와 마우스 지방전구세포인 3T3-L1 세포의 지질축적억제를 통한 항비만 활성을 평가하였다. 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 전반적으로 RAW264.7 세포에서 TLR2/TLR4의 자극을 통해 p38과 JNK를 활성화시켜 NO, iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 같은 면역증진 인자의 발현을 증가시키는 것으로 판단된다. 그러나 IL-6의 경우, p38과 JNK 활성화에 의존하지 않는 것으로 확인되어

TLR2/4에 의한 다른 신호전달이 관여하는 것으로 사료되어 추가적인 연구가 필요하다. 또한, 금화규 뿌리 추출물(AMR)은 PPAR γ 의 과대발현을 억제하여 지방전구세포의 성숙한 지방세포로의 분화를 억제하고, 성숙한 지방세포에서 CEBP α , PPAR γ , perilipin-1, FABP4, adiponectin의 발현을 억제하여 지방세포 내 지질 형성 및 축적을 억제하는 것으로 판단된다. 본 연구를 통해 구명된 결과들은 금화규 뿌리 추출물(AMR)이 향후 면역증진 및 항비만을 위한 보조제 또는 건강 기능성 식품과의약품으로의 개발 및 활용이 가능할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 이공분야 기초연구사업 지역대학우수과학자 후속지원사업(NRF-2019R1D1A3A03103685)과 중점연구소지원사업(NRF-2018R1A6A1A03024862)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Alagawany, M., Y.A. Attia, M.R. Farag, S.S. Elnesr, S.A. Nagadi, M.E. Shafi, A.F. Khafaga, H. Ohran, A.A. Alaql and M.E. Abd El-Hack. 2021. The strategy of boosting the immune system under the COVID-19 pandemic. *Front. Vet. Sci.* 7: 570748.

Bandaru, P., H. Rajkumar and G. Nappanveetil. 2013. The impact of obesity on immune response to infection and vaccine: an insight into plausible mechanisms. *Endocrinol. Metab. Synd.* 2:2.

Bogdan, C., M. Röllinghoff and A. Diefenbach. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12(1):64-76.

Cuadrado, A. and A.R. Nebreda. 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* 429(3):403-417.

Cuthbertson, D.J., U. Alam and A. Tahrani. 2020. COVID-19 and obesity: an opportunity for change. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 11:1-4.

Duque, G.A. and A. Descoteaux. 2014. Macrophage cytokines:

- involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 5:491.
- Erridge, C. 2010. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants?. *J. Leukoc. Biol.* 87(6):989-999.
- Furuhashi, M., S. Saitoh, K. Shimamoto and T. Miura. 2014. Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. *Clin. Med. Insights Cardiol.* 8(3): 23-33.
- Hansen, J.S., S. De Maré, H.A. Jones, O. Göransson and K. Lindkvist-Petersson. 2017. Visualization of lipid directed dynamics of perilipin 1 in human primary adipocytes. *Sci. Rep.* 7(1):1-14.
- Hussain, A., K. Mahawar, Z. Xi., W. Yang and E.H. Shamsi. 2020. Obesity and mortality of COVID-19. Meta-analysis. *Obes. Res. Clin. Pract.* 14(4):295-300.
- Jeon, Y.H. and S.M. Kang. 2020. The application of *Abelmoschus manihot* jinhuakui extracts as cosmetic ingredient. *J. Converg. Inf. Technol.* 10(10):290-297.
- Kadowaki, T. and T. Yamauchi. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26(3):439-451.
- Kawai, T. and S. Akira. 2007. TLR signaling. *Semin. Immunol.* 19(1):24-32.
- Kopelman, P.G. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404:635-643.
- Kosaraju, R., W. Guesdon, M.J. Crouch, H.L. Teague, E.M. Sullivan, E.A. Karlsson, S.S. Cherry, K. Gowdy, L.C. Bridges, L.R. Reese, P.D. Neuffer, M. Armstrong, N. Reisdorph, J.J. Milner, M. Beck and S.R. Shaikh. 2017. B cell activity is impaired in human and mouse obesity and is responsive to an essential fatty acid upon murine influenza infection. *J. Immunol.* 198(12):4738-4752.
- Kyriakis, J.M. and J. Avruch. 2012. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol. Rev.* 92(2):689-737.
- Roskoski Jr, R. 2012. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* 66(2):105-143.
- Seki, E., D.A. Brenner and M. Karin. 2012. A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* 143(2): 307-320.
- Seo, H.J. and J.B. Jeong. 2020. Immune-enhancing effects of green lettuce (*Lactuca sativa* L.) extracts through the TLR4-MAPK/NF- κ B signaling pathways in RAW264.7 macrophage cells. *Korean J. Plant Res.* 33(3):183-193.
- Simu, S.Y., S. Ahn, V. Castro-Aceituno and D.C. Yang. 2017. Ginsenoside Rg5: Rk1 exerts an anti-obesity effect on 3T3-L1 cell line by the downregulation of PPAR γ and CEBP α . *Iran. J. Biotechnol.* 15(4):252.
- Takeda, K. and S. Akira. 2004. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16(1):3-9.
- Wang, T. and C. He. 2020. TNF- α and IL-6: The link between immune and bone system. *Curr. Drug Targets.* 21(3):213-227.
- Weber, A., P. Wasiliew and M. Kracht. 2010. Interleukin-1 β (IL-1 β) processing pathway. *Sci. Signal.* 3(105):2.
- Zhang, W. and H.T. Liu. 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 12(1):9-18.

(Received 9 July 2021 ; Revised 22 July 2021 ; Accepted 5 August 2021)