

Novel Role of *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb. as a Lipogenesis Inhibitor and Lipolysis Stimulator in 3T3-L1 Adipocytes

Su Jin Lee¹, Ji Eun Kim¹, Yun Ju Choi¹, You Jeong Jin¹, Yu Jeong Roh¹, AYun Seol¹, Hee Jin Song¹ and Dae Youn Hwang^{1,2*}

¹Department of Biomaterials Science (BK21 FOUR Program)/Life and Industry Convergence Research Institute, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

²Longevity & Wellbeing Research Center/Laboratory Animal Resources Center, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Received August 4, 2022 /Revised November 15, 2022 /Accepted November 16, 2022

The pharmacological efficacy of *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb. has been verified in only several fields including photoaging, inflammation, hepatotoxicity, acute gastritis and osseointegration. To identify the novel functions of *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb. on anti-obesity, inhibitory effect on lipid accumulation and stimulatory effect on lipolysis were investigated in MDI (3-isobutyl-1-methyl-xanthine, dexamethasone, and insulin) stimulated 3T3-L1 adipocytes treated with methanol extracts of *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb. (MED). Lipogenic targets, including lipid accumulation, level of lipogenic transcription factors, and expression of lipogenic regulators, were downregulated in MDI-stimulated 3T3-L1 adipocytes treated with MED without any significant cytotoxicity. Also, MED treatment inhibited the mRNA levels of adipogenic targets including peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ and CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP) α , as well as lipogenic targets including adipocyte fatty acid binding protein 2 (aP2) and fatty acid synthetase (FAS) in MDI-stimulated 3T3-L1 adipocytes. A similar decrease patterns were detected in Oil red O stained lipid droplets of MED treated MDI-stimulated 3T3-L1 adipocytes. Furthermore, several lipolytic targets, such as cAMP concentration, concentration of free glycerol, expression level of lipases, including ATGL, perilipin and HSL, were upregulated in MDI-stimulated 3T3-L1 adipocytes treated with MED. These results show that MED has a novel role as a lipogenesis inhibitor and lipolysis stimulator in MDI-stimulated 3T3-L1 adipocytes.

Key words : *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb., lipid accumulation, lipogenesis, lipolysis, obesity

서 론

비만은 단순히 체중이 증가된 상태가 아닌, 복강과 내장에 과도하게 지방이 축적된 상태로, 많은 합병증(complications)을 동반하기 때문에 만성질환(chronic disease) 발생의 중요한 원인으로 고려된다[23]. 한국인의 비만율은 2020년 기준으로 남자는 48.0%, 여자는 27.7%이며, 2007년 평균 31.7%와 비교하여 매우 빠르게 증가하고 있다[25]. 특히, 비만은 30세 이상에서 급격하게 증가하며, 이에 따른 합병증 발병율도 크게 증가한다[25]. 비만으로 인한 대표적인 합병증에는 고혈압(hypertension), 당뇨병

(diabetes), 고지혈증(hyperlipidemia), 동맥경화(atherosclerosis) 등이 있으며 비만환자의 경우 정상인보다 2배 이상 높은 사망률을 보이기 때문에 비만치료제 개발의 필요성이 지속적으로 부각되고 있다[16]. 이러한 치료제 개발과정 동안에, 3T3-L1 지방세포(adipocytes)는 다양한 지방세포 계통의 특성을 갖고 있기 때문에 *in vitro* 효능평가를 위해 가장 일반적으로 사용되고 있다[6]. 이들 세포는 지방축적 능력을 바탕으로 Swiss 3T3 세포로부터 분리되었으며, 지방형성(adipogenesis), 지방대사, 호르몬 작용 등을 규명하는 연구에 중요하게 기여해 왔다[6, 29]. 그러나, 3T3-L1 지방전구세포가 성숙한 지방세포로의 분화는 인슐린(insulin) 합성 글루코코이드(synthetic glucocorticoids) phosphodiesterase 저해제(inhibitor)를 포함하여 일련의 전분화인자(pro-differentiation agents)의 처리를 필요기 때문에 배양과정에 어려움이 있다[26, 27]. 분화과정 초기단계에, C/EBP와 PPAR isoforms을 포함하는 지방원성 유전자들(adipogenic genes)의 발현이 증가하며, 이들은 글루코스 흡수와 중성지방(triglyceride) 합성을 증가시켜서 세포 내

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5388, Fax : +82-55-350-5389

E-mail : dyhwang@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.

지방축적을 유도한다[26].

한편, 비만을 치료하기 위한 목적으로 식욕 억제제 (appetite suppressant)와 지방흡수 억제제가 개발되어 상용화되어 있으나 호르몬 불균형(hormonal imbalance), 정신 이상(insanity), 불면(insomnia), 지방변(fatty stools), 위장관 기능장애(gastrointestinal dysfunction) 등의 다양한 부작용을 유발하는 것으로 알려져 있다[7, 25, 30-32]. 따라서, 이러한 비만치료제의 한계를 극복하고 부작용이 적은 새로운 항비만 소재를 천연물(natural product)에서 발굴하고자 하는 연구가 각광받고 있다. 현재까지 보고된 천연물 항비만 치료제로는 *Gentiana lutea* (GL), purpurin, 브로콜리 잎으로부터 추출한 sulforaphane 등이 있다[20, 21, 24]. GL 추출물은 지방세포(adipocytes)의 분화를 유도하는 C/EBP α , SLC2A4의 mRNA 발현량을 유의적으로 감소시켰으며, 3T3-L1 지방세포 내에서 지방축적 억제능을 나타내었다[20]. Purpurin은 AMP-activated kinase (AMPK)의 인산화, PPAR γ , C/EBP α 의 단백질 발현량을 감소시켜 3T3-L1 지방세포 내에 지방축적을 억제했으며, 중성지방의 축적을 감소시켰다[21]. 브로콜리 잎으로부터 추출한 sulforaphane은 AMPK와 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인산화를 증가시켜 3T3-L1 지방세포 내에 지방 축적을 억제하고 중성지방의 양을 감소시켰다[24].

Dipterocarpus tuberculatus Roxb.는 라오스(Laos), 미얀마(Myanmar), 말레이시아(Malaysia) 등 열대지방의 고원에 분포하며, 전통의학에서 이 식물의 뿌리는 골절(fracture)을 치료하는데 사용되었으며, 코코넛 오일 등과 함께 궤양(ulcer)을 치료하는데도 사용되었다[1]. 또한, *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.는 다양한 생리활성 물질을 포함하고 있다[28]. 이 식물의 줄기와 나무껍질을 이용한 메탄올 추출물에서는 gallic acid, bergenin, ellagic acid, ϵ -viniferin, asiatic acid, oleanolic acid, 2 α -hydroxyursolic acid 등의 2차 대사체가 검출되었다[14]. 이 식물의 나뭇잎과 잔가지를 이용한 에탄올 추출물에서는 7,4'-dimethylquercetin, 3'-methylquercetin, quercetin, isoquercitrin 등을 포함하는 플라보노이드(flavonoids)가 검출되었다[35]. 이러한 생리활성물질의 구성에 기반하여 *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.의 다양한 추출물에 대한 효능이 보고되었다. 이 식물의 메탄올 추출물(methanol extract)은 항산화능(antioxidant activity)이 뛰어나 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능을 증가시키고, 세포 내 활성산소(reactive oxygen species) 제거에 효과적이며, ultraviolet (UV)으로 광노화(photoaging)를 유도한 normal human dermal fibroblast (NHDF)에서 nuclear factor erythroid-2-related factor (Nrf) 2의 신호전달 경로를 활성화하여 항산화 효소의 발현과 활성을 증가시켰다[15]. 또한, UV로 인해 증가한 cyclooxygenase (COX)-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 inflammasome의 발현을 억제하는 항염증 효능을 나타

내었다[15]. 하지만, 뛰어난 항산화능과 염증억제능(anti-inflammatory effect)을 갖는 *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.의 효능에도 불구하고, 현재까지 비만에 대한 연구 결과는 보고되어있지 않다.

따라서, 본 연구에서는 *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.의 메탄올 추출물(methanol extract of *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb., MED)의 새로운 효능을 찾기위하여 MDI (3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, and insulin)배지로 분화를 유도한 3T3-L1 지방세포에서 항비만 효능과 작용기전을 연구하였다.

재료 및 방법

Dipterocarpus tuberculatus Roxb.의 추출물

메탄올을 용매로 추출된 MED (FBM 213-075) 시료는 한국생명공학연구원(대전, 대한민국)의 해외생물소재센터(International Biological Materials Research Center)에서 동결건조된 상태로 제공받았다. 동결건조된 시료는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands) 용매에 용해시켜 적절한 농도로 희석시킨 후 세포에 처리하였다. MED의 추출에 사용된 방법은 Lee et al.의 논문[15]에서 기술된 바와 동일하다.

세포배양 및 분화

3T3-L1 지방전구세포(pre-adipocytes)는 지방세포 유사 표현형으로 분화할 가능성이 있는 세포로 알려져 있으며, American Type Culture Collection (Mannassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포는 37°C의 온도와 5%의 CO₂가 공급되는 배양기에서 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Gyeongsan-si, Korea), L-glutamine, penicillin, streptomycin (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)이 첨가된 dulbecco modified eagle's medium (DMEM, Welgene)을 이용하여 배양되었다. 3T3-L1 지방전구세포의 분화(differentiation)는 선행 연구에 기술된 방법에 따라 유도되었다[22]. 세포의 밀도가 80-90% 도달했을 때(differentiation day 0), DMEM을 3-isobutyl-1-methylxanthine (0.5 mM, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, STL, USA), dexamethasone (1 μ M, Sigma-Aldrich Co.) 및 insulin (5 μ g/mL, Sigma-Aldrich Co.)을 포함하는 MDI배지로 교체하였다. 2일 경과 후(differentiation day 2), 세포는 10% FBS 및 5 μ g/ml 인슐린(insulin)이 포함된 DMEM에서 2일간 추가로 유지한 후(differentiation day 4), 10% FBS가 보충된 DMEM에서 추가로 4일 동안 배양하였다(differentiation day 8).

MED가 지방생성에 미치는 영향을 연구하기 위해, 3T3-L1 지방전구세포에 Vehicle (DMSO), orlistat (OT, 40 μ g/ml, Sigma-Aldrich Co.), 50 μ g/ml의 MED (LMED, Low concentration of MED), 100 μ g/ml의 MED (MMED, Middle

concentration of MED) 또는 200 µg/ml의 MED (HMED, High concentration of MED)를 분화 8일 동안 (differentiation day 0-8) 처리하였으며, MED가 지방분해에 미치는 영향을 연구하기 위해 분화가 완료된 후 2일 동안(differentiation day 8-10) 동일한 농도의 MED를 처리하였다.

세포생존율(Cell viability) 측정

세포생존율은 tetrazolium 화합물인 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 측정하였다. 먼저, 3T3-L1 지방전구세포는 1×10^4 세포/0.2 ml로 분주(seeding)하고, 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 세포가 70-80% 밀도에 도달했을 때, Vehicle (DMSO), orlistat (OT, 40 µg/ml), 다양한 농도의 MED (12.5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/ml)를 처리하고, 24시간 동안 배양한 후, 3T3-L1 지방전구세포의 상층액을 200 µl의 새로운 DMEM 배지와 50 µl의 MTT 용액 (PBS 중 20 mg/ml)으로 교체하였다. 3T3-L1 지방세포에 대한 세포생존율 평가는, 8일간의 분화과정 후 OT 및 MED (50, 100, 200 µg/ml)를 처리하고, 24시간 동안 배양한 후, 3T3-L1 지방세포의 상층액을 200 µl의 새로운 DMEM 배지와 50 µl의 MTT 용액 (PBS 중 20 mg/ml)으로 교체하였다. 세포는 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 formazan 침전물을 DMSO에 용해시켰고, versa max Plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하였다.

Oil red O 염색

Oil Red O 염색은 3T3-L1 지방세포에서 지질 축적을 측정할 이전의 연구방법을 이용하여 실시하였다[9]. MDI 배지로 분화된(분화 8일) 3T3-L1 지방세포는 10% 포르말린(formalin)으로 10분간 고정(fixation)하고, 증류수로 3회 세척한 후 100% isopropanol (Sigma-Aldrich Co.)에 0.5%로 녹인 Oil Red O 염료(Sigma-Aldrich Co.)로 30분 동안 실온에서 염색하였다. 염색된 세포는 증류수로 3회 세척한 후 염색된 지방방울(lipid droplets)을 400배 확대하여 현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다. 염색된 지방방울의 흡광도는 Image J 1.52a 프로그램 (NIH, Bethesda, ML, USA)을 이용하여 측정하였다.

Quantitative reverse transcription - PCR

PPAR γ , C/EBP α , aP2 및 FAS의 mRNA 수준은 Quantitative reverse transcription - PCR (RT-qPCR)을 이용하여 이전 연구에서 제시된 방법으로 실시하였다[8]. 먼저, total RNA는 배양된 세포로부터 RNAzol (Tel-Test Inc., Friendswood, TX, USA)을 이용하여 추출하였고, RNA의 농도는 nanodrop 시스템(Biospecnano, Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan)을 사용하여 정량하였다. Complement DNA (cDNA)

는 total RNA (5 µg), oligo-dT primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), dNTP 및 역전사효소(Superscript II, Invitrogen)를 혼합하여 합성하였다. qPCR은 cDNA 템플릿 및 2× power SYBR Green (Toyobo Co., Osaka, Japan)을 이용하여 95°C에서 15초, 55°C에서 30초, 70°C에서 60초의 주기(cycle)로 수행하였으며, 표적 유전자의 발현 확인을 위한 프라이머 서열은 다음과 같다: PPAR γ , sense primer: 5'-GAG TTC ATG CTT GTG AAG GAT GCA AGG-3', anti-sense primer: 5'-CAT ACT CTG TGA TCT CTT GCA CG-3'; C/EBP α , sense primer: 5'-GTG GAC AAG AAC AGC AAC GAG TAC-3', anti-sense primer: 5'-GGA ATC TCC TAG TCC TGG CTT GC-3'; FAS, sense primer: 5'-GAT CCT GGA ACG AGA ACA CGA TCT GG-3', anti-sense primer: 5'-AGA CTG TGG AAC ACG GTG GTG GAA CC-3'; aP2, sense primer: 5'-GAA CCT GGA. AGC TTG TCT CCA GTG -3', anti-sense primer: 5'-GAT GCT CTT CAC CTT CCT GTC GTC TGC-3'; β -actin, sense primer: 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3', anti-sense primer: 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'. PCR 증폭 단계 동안에 PCR 산물이 형광강도 임계값(threshold)을 초과하는 반응주기를 임계값 주기(Ct)로 간주하였다. Livak과 Schmittgen의 방법에 따라 일정한 형광 강도에서 Ct 값의 비교를 기반으로 β -actin의 발현에 대한 표적 유전자의 발현을 정량화하였다[17].

Enzyme-linked immunosorbent assay

cAMP의 농도는 cAMP Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Cell Biolabs INC., San Diego, CA, USA)를 사용하여 제조사의 권장법에 따라 측정하였다. 먼저, MDI로 분화가 유도된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 Vehicle, OT, MED를 처리하고 배양액을 채취하였다. 각 배양액은 표지된 AP-conjugate 및 cAMP complete antibody와 혼합하여 각 well에 첨가하고, pNPP substrate를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 마지막으로 혼합액의 반응은 stop solution을 첨가하여 정지시킨 후 versa max plate reader (Molecular Devices)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Free glycerol 분석

3T3-L1 지방세포로부터의 free glycerol 방출은 cell-based glycerol assay kit (Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 회사의 권장법에 따라 측정하였다. 먼저, MDI로 분화가 유도된 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 Vehicle, OT, MED를 처리하고, 배양액을 채취하였다. 각 배양액(25 µl)은 free glycerol reagent (100 µl)와 혼합한 후 실온에서 15분 동안 반응하였다. 각 well의 흡광도는 versa max plate reader (Molecular Devices)를 사용하여 540 nm에서 측정하

였으며, free glycerol 농도는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Free glycerol } (\mu\text{g/mL}) = A_{540} - (\text{y-intercept}) / \text{Slope} \quad (1)$$

Western blot 분석

전체 단백질 균질액은 Pro-Prep Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)을 이용하여 3T3-L1 지방세포로부터 추출하고, SMART™ BCA protein assay kit (Thermo Scientific)를 이용하여 정량하였다. 단백질 균질액(30 μg)은 8-10% SDS-PAGE gel에 전기영동하여 분리하고, 이들 단백질은 enhanced chemiluminescence (ECL) 막(Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하였다. 단백질이 전이된 ECL막은 3% skim milk에서 1시간 동안 블로킹한 후 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)로부터 구매한 anti-β-actin antibody, anti-perilipin antibody, anti-p-perilipin antibody, anti-HSL antibody, anti-p-HSL antibody, anti-ATGL antibody 1차 항체로 4℃에서 밤새 배양하였다. 미결합된 1차 항체는 세척한 후 HRP-conjugated된 secondary anti-rabbit antibody를 12시간동안 반응하였다. 최종적으로 단백질 막은 ECL select western blotting detection reagent (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 사용하여 발광하고, 특이밴드로부터 유래된 형광 신호(chemiluminescence signals)는 fluorchemi®FC2 (Alpha Innotech Co., San Leandro, CA, USA)를 이용하여 검출하였다.

통계분석

그룹 간의 실험 결과에 대한 유의성은 one way ANOVA (SPSS for windows, Release 10.10, Standard Version, Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석된 결과는 모든 값을 평균±SD (Standard deviation)로 표기하였고, p-value< 0.05를 유의성 있는 값으로 표시하였다.

결 과

MED가 3T3-L1 지방전구세포의 세포생존율에 미치는 영향

MED의 최적농도(optimal concentration)를 설정하기 위하여, 다양한 농도(12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μg/ml)의 MED를 3T3-L1 지방전구세포에 24시간 동안 처리한 이후 세포생존율을 MTT assay로 측정하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 세포생존율은 400 μg/ml로 MED를 처리한 세포에서만 유의적으로 감소하였고, 400 μg/ml 미만의 모든 다른 농도에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 1A). 이러한 결과를 바탕으로, MED의 최적 처리농도는 50, 100, 200 μg/ml로 설정하였다.

또한, 최적의 농도로 설정된 MED 농도로 3T3-L1 지방세포의 독성을 평가하기 위하여, MDI+Vehicle, MDI+OT, MDI+MED 처리그룹에서 세포생존율을 평가하였다. 그

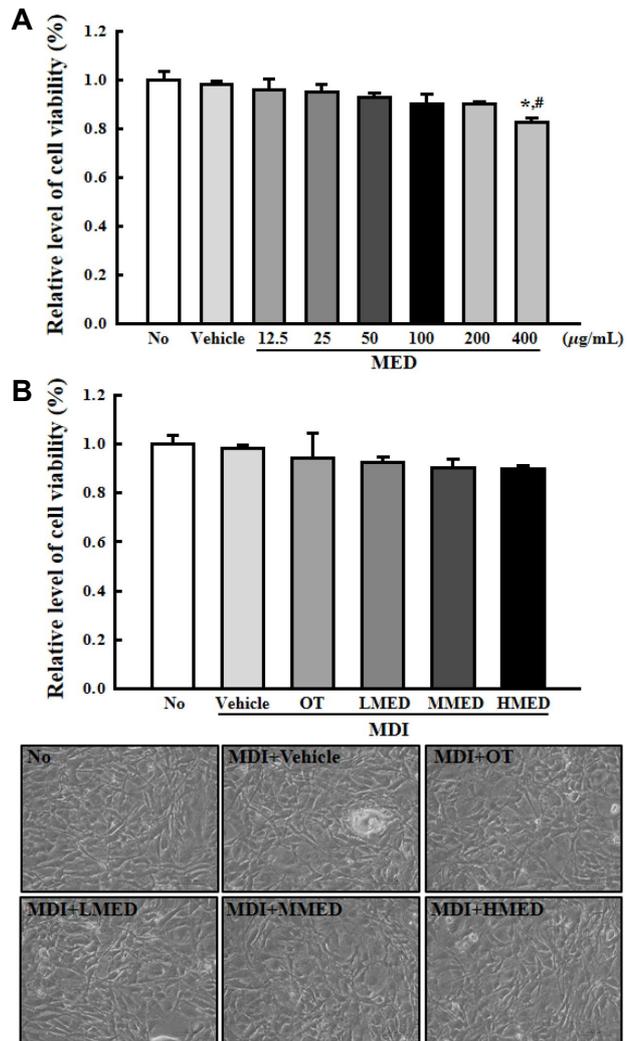


Fig. 1. Cytotoxicity of MED. (A) Determination of MED optimal concentration in 3T3-L1 pre-adipocytes. After the treatment of MED for 24 hr, the cell viability was determined using the MTT assay. (B) Cell viability of MED in MDI stimulated 3T3-L1 adipocytes. After the treatment of MED for 24 hr, cell morphological changes were observed under a microscope at 200× magnification, and the cell viability was determined using the MTT assay. Optical density was measured in triplicates and the assay was repeated for three times. The data represents the means ± SD of triplicates. Abbreviation: OT, orlistat; MDI, adipogenic cocktail consisting of 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, and insulin; MED, methanol extracts of *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.; LMED, low concentration (50 μg/ml) of MED; MMED, middle concentration (100 μg/ml) of MED; HMED, high concentration (200 μg/ml) of MED.

결과, 세포생존율은 모든 그룹에서 일정하게 유지되었으며, 세포형태도 유사하게 관찰되었다(Fig. 1B). 이러한 결과는 설정된 3가지 MED 농도(50, 100, 200 μg/ml)는 3T3-

L1 지방세포에 유의적인 독성을 유발하지 않음을 제시한다.

MED가 3T3-L1 지방전구세포의 분화에서 지방 축적에 미치는 영향

MED가 3T3-L1 지방전구세포의 분화과정에서 지방축적을 억제하는 효능이 있는지 평가하기 위하여, Oil Red O로 염색된 지방방울의 수준의 변화를 MDI+MED 처리된 3T3-L1 지방세포에서 측정하였다. Oil Red O로 염색된 물질(Oil Red O-stained materials, ORO-SM)은 No그룹에 비하여 MDI+Vehicle 처리그룹에서 축적량이 유의적으로 증가하였다. 그러나, 이러한 축적량은 MED로 처리 후 농도의존적으로 감소하였으며, 최대 감소량은 MDI+HMED 처리그룹에서 관찰되었다(Fig. 2A, Fig. 2B). 이러한 결과는 MED가 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 과정에서 지방의 축적을 저해함을 제시한다.

MED가 3T3-L1 지방전구세포의 지방축적 유도 유전자의 발현에 미치는 영향

지방축적에 대한 MED의 저해효과가 adipogenesis와 lipogenesis의 저해를 동반하는지 확인하기 위하여, 2개의 adipogenic ranscription factors (PPAR γ , C/EBP α)와 2개의 lipogenic proteins (aP2, FAS)의 전사량을 MDI+MED로 처리된 3T3-L1세포에서 측정하였다. Adipogenic transcription factors (PPAR γ , C/EBP α)와 lipogenic proteins (aP2, FAS)의 전사는 No그룹에 비하여 MDI+Vehicle 처리그룹에서 유의적으로 높았다. 하지만 이들의 전사량은 MDI+Vehicle 처리그룹에 비하여 MDI+MED 처리그룹에서 유의적으로 감소하였으며, 농도의존적으로 감소 경향을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 MED의 지방축적 억제효과는 adipogenic ranscription factors (PPAR γ , C/EBP α)와 lipogenic proteins (aP2, FAS)의 조절과 연관되어 있음을 제시하고 있다.

MED가 분화된 3T3-L1 지방세포에서 지방분해에 미치는 영향

마지막으로, 지방분해의 조절에 대한 MED의 효능과 작용기전을 확인하기 위해, MDI+MED 처리한 3T3-L1세포와 그 배양액에서 free glycerol 농도, cAMP 농도 그리고 cAMP signal transduction pathway 조절을 분석하였다. 먼저, free glycerol 농도는 No그룹에 비하여 MDI+Vehicle 처리그룹에서 유의적으로 증가하였으며, MED 처리그룹에서 농도의존적으로 더욱 증가하였다(Fig. 4A). 또한, 유사한 경향이 cAMP 농도에서도 관찰되었다. cAMP 농도는 MDI+Vehicle 처리그룹에 비하여 MED처리 후 유의적으로 증가하였다(Fig. 4B). 더불어, cAMP 농도변화가 cAMP signal transduction pathway에 반영되는지 확인하기 위하여, 3종류의 lipogenic proteins (ATGL, perilipin, HSL) 발현

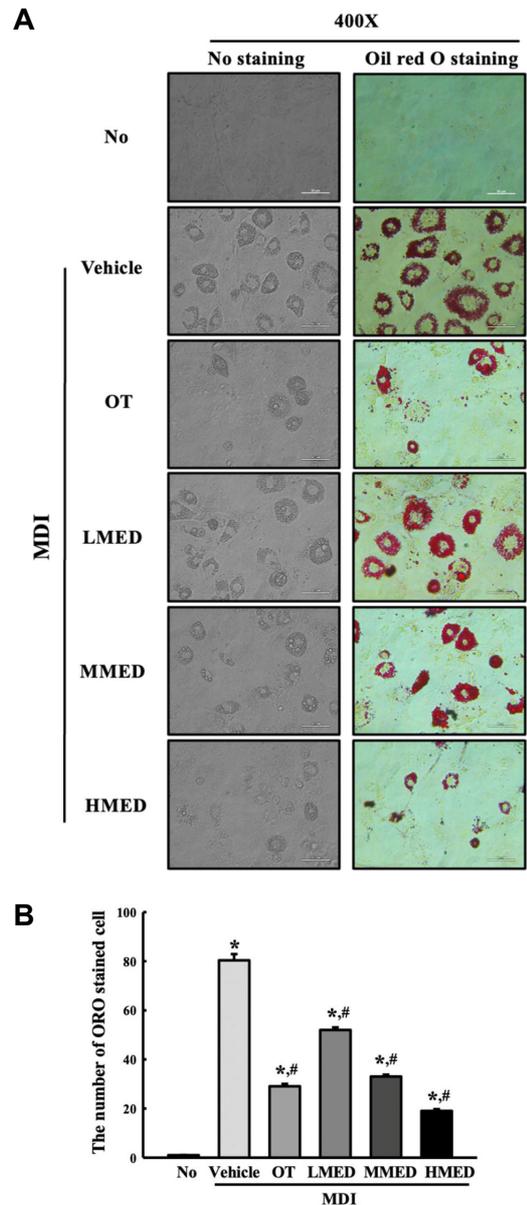


Fig. 2. ORO staining analysis. (A) After inducing the differentiation with MDI media and treatment of MED for eight days, 3T3-L1 adipocytes were stained with ORO dye solution. The images of the ORO-stained cells were observed under a microscope at 400 \times magnification. (B) The optical density of red color was measured in the ORO-stained cells. Three wells per group were used for staining, and optical density was measured in duplicates. The data represent the means \pm SD of duplicates. * indicates $p < 0.05$ compared to the No treated group. # indicates $p < 0.05$ compared to the MDI + Vehicle treated group. Abbreviation: ORO, Oil Red O; OT, orlistat; MDI, adipogenic cocktail consisting of 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, and insulin; LMED, low concentration (50 $\mu\text{g/ml}$) of MED; MMED, middle concentration (100 $\mu\text{g/ml}$) of MED; HMED, high concentration (200 $\mu\text{g/ml}$) of MED.

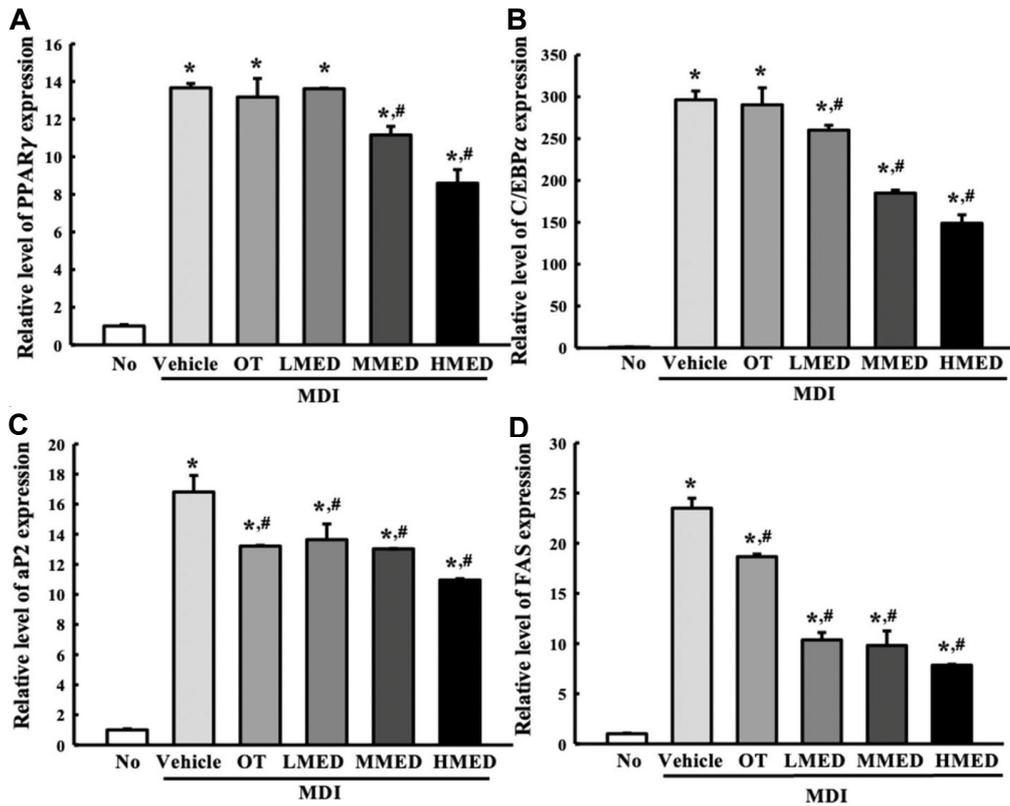


Fig. 3. mRNA levels of lipogenic factors. Two adipogenic transcription factors (PPAR γ (A) and C/EBP α (B) and two lipogenic regulators (aP2 (C) and FAS (D)) were quantified by RT-qPCR, as described in materials and methods. Three dishes per group were used to prepare the total RNAs, and qRT-PCR was assayed in triplicate for each sample. The data represent the means \pm SD of triplicates. * indicates $p < 0.05$ compared to the No treated group. # indicates $p < 0.05$ compared to the MDI + Vehicle treated group. Abbreviation: OT, orlistat; MDI, adipogenic cocktail consisting of 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, and insulin; LMED, low concentration (50 $\mu\text{g/ml}$) of MED; MMED, middle concentration (100 $\mu\text{g/ml}$) of MED; HMED, high concentration (200 $\mu\text{g/ml}$) of MED.

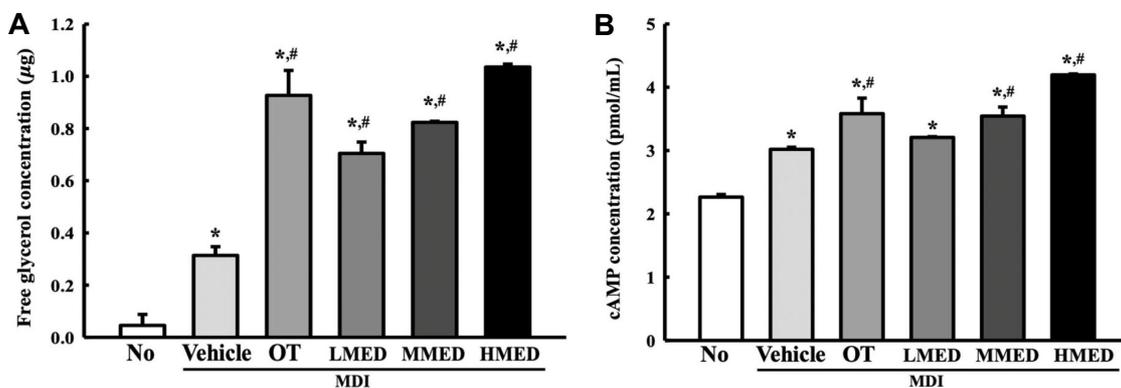


Fig. 4. Determination of lipolytic activity. (A) Free glycerol concentration. The level of released free glycerol was measured in the supernatant of the MDI-stimulated 3T3-L1 adipocytes treated with MED. Three wells per group were used for the assay, and the optical density was measured in triplicate. (B) cAMP concentration. After collecting the cell lysates from MDI-stimulated 3T3-L1 adipocytes treated with MED, the cAMP concentration was measured using an ELISA assay. Two to three wells per group were used to collect the cell lysates, and the assay was measured in triplicate. The data represent the means \pm SD of three replicates. * indicates $p < 0.05$ compared to the No treated group. # indicates $p < 0.05$ compared to the MDI + Vehicle treated group. Abbreviation: OT, orlistat; MDI, adipogenic cocktail consisting of 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, and insulin; LMED, low concentration (50 $\mu\text{g/ml}$) of MED; MMED, middle concentration (100 $\mu\text{g/ml}$) of MED; HMED, high concentration (200 $\mu\text{g/ml}$) of MED.

을 MDI+MED 처리그룹에서 측정하였다. ATGL의 발현, perilipin의 인산화, HSL의 인산화는 No그룹에 비하여 MDI+Vehicle 처리그룹에서 유의적으로 증가하였으며, MDI+MED 처리그룹에서는 보다 증가하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 MED가 MDI로 분화된 3T3-L1 지방세포에서 cAMP signal transduction pathway 조절을 통하여 지방분해를 촉진함을 제시하고 있다.

고 찰

비만은 칼로리 섭취와 에너지 소비의 불균형(imbalance)으로 인해 체내에 과도하게 지방이 축적된 상태를 말한다 [10, 31]. 이러한 불균형으로 인해 비만은 여러가지 대사질환(metabolic disease), 만성염증(chronic inflammation) 및 산화스트레스(oxidative stress), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 당뇨병(diabetes), 암(cancer)과 같은 다양한 합병증을 동반한다[2, 18, 34]. 본 연구는 현재 상용화된 비만치료제의 한계를 극복하고, 부작용(side effects)이 적은 새로운 항비만 소재를 발굴하고자 하는 연구의 일환으로, 3T3-L1 지방전구세포의 분화과정에서 MED의 항비만 효능을 분석하였다. 본 연구의 결과는 MED가 비만 치료제 후보로서의 우수한 가능성이 있음을 확인하였지만, 추가적으로 동물 모델에서의 연구가 필요하다.

지방은 Acetyl-CoA의 탄소 전구체(carbon precursor)가 지방산(fatty acid)과 TG로 전환되는 대사과정(metabolic process)을 통해 생성되며, 지방 생성 및 축적이 PPAR γ , C/EBP, aP2 및 FAS의 4가지 주요 regulator들에 의해 조절된다[19]. PPAR α 와 C/EBP는 aP2와 leptin을 포함한 여러 유전자의 전사를 조절하는 전사인자이며, aP2와 FAS는 지방산의 이동과 지방세포의 성숙을 조절하는 주요한 단백질이다[19]. 이러한 지방생성에 주요한 역할을 하는 4가지 요소는 많은 연구에서 항비만 효능을 평가하기 위한 지표(indicator)로 활용된다. 지금까지, α -cubebenol, 6,6-Bieckol, diallyl sulfide 및 Platycodin D과 같은 천연물 유래 화합물은 이들 지표를 이용하여 항비만 효능을 평가하였다[3, 11, 13, 14]. *Schisandra chinensis*로부터 추출한 α -cubebenol은 MDI로 분화를 유도한 3T3-L1 지방세포에서 PPAR γ , C/EBP α , aP2, Fas의 mRNA 발현수준을 억제시켰으며, Oil red O로 염색된 지방방울의 수가 60% 감소하였다[14]. 또한, *Eisenia bicyclis*에서 추출한 6,6-Bieckol은 MDI로 자극된 3T3-L1 지방세포에서 PPAR γ , C/EBP α , aP2, Fas의 mRNA와 단백질 발현을 억제하였으며, 50 μ g/ml의 농도에서 최대 60% 지방축적을 억제하였다[11]. MDI로 분화시킨 3T3-L1 지방세포에서 마늘(garlic)에서 추출한 diallyl sulfide는 5-50 mM 농도로 1-3시간 동안 처리했을 때, PPAR γ , C/EBP α , aP2, Fas의 mRNA 발현을 억제하여 지방축적을 억제하였다[3]. 또한, *Platycodon grandiflorum*에서 추출한

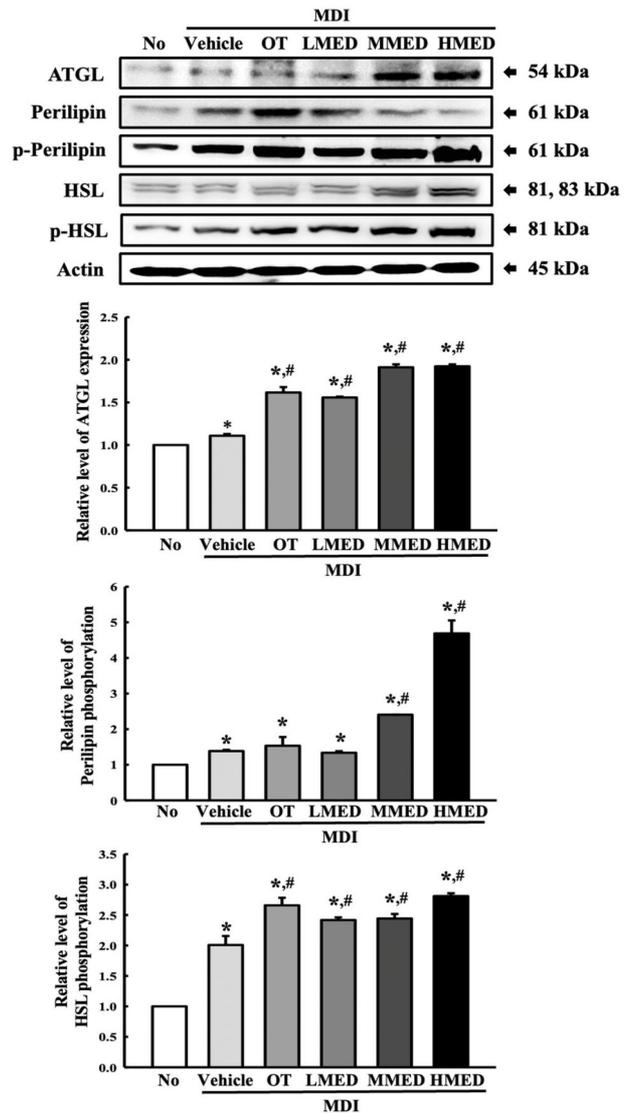


Fig. 5. Expression level of the lipolytic proteins. After collecting the total proteins from the MDI-stimulated 3T3-L1 adipocytes treated with MED, the expression level of ATGL, HSL, p-HSL, perilipin, p-perilipin, and β -actin were detected using the specific primary antibodies, followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG. The intensity of each band was measured by an imaging densitometer, and the relative levels of each protein were calculated relative to the intensity of the actin bands. Three dishes per group were used to prepare the cell homogenates, and Western blot analysis was assayed in triplicate for each sample. The data represent the means \pm SD of three replicates. * indicates $p < 0.05$ compared to the No treated group. # indicates $p < 0.05$ compared to the MDI + Vehicle treated group. Abbreviation: OT, orlistat; MDI, adipogenic cocktail consisting of 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, and insulin; LMED, low concentration (50 μ g/ml) of MED; MMED, middle concentration (100 μ g/mL) of MED; HMED, high concentration (200 μ g/ml) of MED.

platicodin D는 MDI로 분화를 유도한 3T3-L1 지방세포에서 PPAR γ , C/EBP α , aP2, Fas의 mRNA와 단백질 발현을 감소시켰으며, 5 μ M에서 최대 62.4% 지방축적을 억제하였다[13]. 본 연구에서는 MED의 지방생성 억제능을 분석하기 위하여, MDI로 분화를 유도한 3T3-L1 지방세포에서 PPAR γ , C/EBPs, aP2 및 FAS mRNA 발현량을 측정하였다. 그 결과, 200 μ g/mL의 MED는 MDI로 자극된 3T3-L1 지방세포에서 지방축적을 최대 60%까지 효과적으로 억제하고 PPAR γ , C/EBP α , aP2 및 Fas의 mRNA 발현을 억제하였다. 이러한 결과는 항비만 소재를 발굴하기 위한 선행연구와 유사한 결과로, MED가 지방생성 억제능을 갖는 새로운 추출물로서 잠재력을 가지고 있음을 시사하고 있다.

지방생성 억제능과 더불어, 축적된 지방을 분해하는 지방분해능도 항비만 소재의 중요한 지표로 사용된다[12]. 본 연구에서는 MED의 지방분해능을 확인하기 위하여, 최종 지방분해 산물인 glycerol의 농도와 cAMP dependent signal transduction pathway를 분석하였다. 이러한 지방분해의 지표는 지방분해능을 가지는 천연물 소재(a-cubebenol, aculeatin, biflavone)의 효능평가를 위해 선행연구에서 주로 사용되었다[5, 14, 33]. *Schisandra chinensis*로부터 추출한 α -cubebenol은 MDI로 분화를 유도한 3T3-L1 지방세포에서 cAMP 농도와 cAMP signal pathway의 주요 단백질인 ATGL, p-perilipin, p-HSL의 발현을 증가시켰으며, 최종적으로 free glycerol의 방출을 자극하여 지방분해를 촉진하였다[14]. *T. asiatica*에서 추출한 aculeatin은 MDI로 분화시킨 3T3-L1 지방세포에서 2-deoxyglucose 흡수와 glycerol 방출을 증가시켰고[33], biflavones는 MDI로 자극된 3T3-L1 지방세포에서 glycerol 방출을 증가시켰다[5]. 본 연구에서는 MDI로 자극된 3T3-L1 지방세포에서 MED의 지방분해 촉진 효능을 평가하기 위해 선행 연구에서 평가된 요인들을 분석하였다. MED의 처리는 cAMP 농도를 상향조절하여 lipase의 발현을 증가시켰으며, free glycerol 방출 증가를 유도했다. 특히, MED는 선행된 연구의 aculeatin 및 biflavone 보다 free glycerol 방출을 더욱 증가시켰다. MED의 지방분해 촉진 효능은 선행연구에서 사용된 추출물과 매우 유사한 효능을 나타내었다.

한편, 본 연구에서 사용된 MED는 gallic acid, bergenin, ellagic acid, ϵ -viniferin, asiatic acid, oleanolic acid, 2 α -hydroxyursolic acid의 7가지 생리활성물질을 포함하는 것으로 보고되었다[14]. 이러한 성분들은 *Dipterocarpus* genus의 줄기와 나무껍질에 분포하는 것으로 알려져 있다[1]. *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.의 줄기와 나무껍질에서 발견된 Bergenin은 활성산소를 소거시켜 항산화 활성을 나타내었으며, 이 중 methoxyl group(O-6-CH₃)이 라디칼 공격에 가장 유리한 부위로 알려져 있다[1, 4]. ϵ -Viniferin은 five-membered oxygen heterocyclic ring을 가진 dehydromer resveratrol이며 stilbenoids family에 속하는 자연

발생 페놀이다. ϵ -viniferin은 resveratrol보다 항산화 및 항염 작용에 더 효과적인 것으로 보고되었다[37]. Oleanolic acid와 2 α -hydroxyursolic acid는 다양한 식물에 존재하는 triterpenes이다. 이 중 oleanolic acid는 superoxide anion scavenging 활성, chelating 효과 및 xanthine oxidase 억제 활성에서 용량 의존적 효과를 나타내는 것으로 보고되었다[36]. 2 α -Hydroxyursolic acid는 DPPH free radical 소거와 superoxide anion 소거에 강력한 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[36]. 따라서, 비록 추가적인 연구가 필요하지만 선행연구에서 확인된 7가지 성분의 높은 항산화능이 MED 항비만 효과와 연관성이 높을 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 살펴본 바와 같이, 본 연구에서는 MED가 지방생성을 억제하고, 지방분해를 촉진하는 효능을 가졌기 때문에, 새로운 항비만 소재로의 개발 가능성을 제시하고 있다. 이를 뒷받침하는 연구결과로서 MED는 PPAR γ , C/EBP α , aP2, Fas의 유전자 발현을 억제시켰고, cAMP 농도를 조절하여 lipase의 발현을 증가시킴으로써 free glycerol의 방출을 증가시켰다. 하지만, 비만을 유도한 동물모델에서 본 연구결과가 재현되는지와 명확한 기전을 규명하기 위한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2021-2022학년도 부산대학교 BK21 FOUR 대학원혁신지원사업의 지원을 받아 수행된 연구임.

The Conflict of Interest Statement

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

References

1. Aslam, M., Ahmad, M. S. and Mamat, A. 2015. A phytochemical, ethnomedicinal and pharmacological review of genus *Dipterocarpus*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **7**, 27-38.
2. Bendor, C. D., Bardugo, A., Pinhas-Hamiel, O., Afek, A. and Twig, G. 2020. Cardiovascular morbidity, diabetes and cancer risk among children and adolescents with severe obesity. *Cardiovasc. Diabetol.* **19**, 1-14.
3. Chang, W. T., Wu, C. H. and Hsu, C. L. 2015. Diallyl trisulphide inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through lipogenesis, fatty acid transport, and fatty acid oxidation pathways. *J. Funct. Foods* **16**, 414-422.
4. De Abreu, H. A., Lago, I. A. S., Souza, G. P., Piló-Veloso, D., Duarte, H. A. and Alcântara, A. F. C. 2008. Antioxidant activity of (+)-bergenin a phytoconstituent isolated from the bark of *Sacoglottis uchi* Huber (Humiraceae). *Org. Biomol. Chem.* **6**, 2713-2718.

5. Dell'Agli, M. and Bosisio, E. 2002. Biflavones of *Ginkgo biloba* stimulate lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Planta Med.* **68**, 76-79.
6. Green, H. and Meuth, M. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-33.
7. Hennessy, S. and Perry, C. M. 2006. Orlistat. *Drugs* **66**, 1625-1656.
8. Jeong, Y. S., Jung, H. K., Cho, K. H. Youn, K. S. and Hong, J. H. 2011. Anti-obesity effect of grape skin extract in 3T3-L1 adipocytes. *Food Sci. Biotechnol.* **20**, 635-642.
9. Kim, C., Kim, J. H., Oh, E. Y., Nam, D., Lee, S. G., Lee, J., Kim, S. H., Shim, B. S. and Ahn, K. S. 2016. Blockage of STAT3 signaling pathway by morusin induces apoptosis and inhibits invasion in human pancreatic tumor cells. *Pancreas* **45**, 409-419.
10. Kojta, I., Chacińska, M. and Błachnio-Zabielska, A. 2020. Obesity, bioactive lipids, and adipose tissue inflammation in insulin resistance. *Nutrients* **12**, 1305.
11. Kwon, T. H., Wu, Y. X., Kim, J. S., Woo, J. H., Park, K. T., Kwon, O. J., Seo, H. J., Kim, T. and Park, N. H. 2015. 6,6'-Bieckol inhibits adipocyte differentiation through downregulation of adipogenesis and lipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 1830-1837.
12. Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M. and Zechner, R. 2011. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog. Lipid Res.* **50**, 14-27.
13. Lee, E. J., Kang, M. and Kim, Y. S. 2012. Platycodin D inhibits lipogenesis through AMPK α -PPAR γ 2 in 3T3-L1 cells and modulates fat accumulation in obese mice. *Planta Med.* **78**, 1536-1542.
14. Lee, S. J., Kim, J. E., Choi, Y. J., Gong, J. E., Jin, Y. J., Lee, D. W., Choi, Y. W. and Hwang, D. Y. 2021. Anti-Obesity effect of α -Cubebenol isolated from *schisandra chinensis* in 3T3-L1 adipocytes. *Biomolecules* **11**, 1650.
15. Lee, S. J., Kim, J. E., Choi, Y. J., Gong, J. E., Park, S. H., Douangdeuane, B., Souliya, O., Park, J. M., Lee, H. S., Kim, B. H. and Hwang, D. Y. 2021. Therapeutic effects of *Dipterocarpus tuberculatus* with high antioxidative activity against UV-induced photoaging of NHDF cells and nude mice. *Antioxidants* **10**, 791.
16. Lim, S. A., Yoon, Y. S., Cha, Y. J. and Park, H. S. 2000. Study on metabolic complications in obese patients. *Kor. J. Fam. Med.* **21**, 1269-1276.
17. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- $\Delta\Delta C(T)$) method. *Methods* **25**, 402-408.
18. Manrique-Acevedo, C., Chinnakotla, B., Padilla, J., Martinez-Lemus, L. A. and Gozal, D. 2020. Obesity and cardiovascular disease in women. *Int. J. Obes.* **44**, 1210-1226.
19. McArdle, M. A., Finucane, O. M., Connaughton, R. M., McMorrow, A. M. and Roche, H. M. 2013. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front. Endocrinol.* **4**, 52.
20. Nam, W., Nam, S. H., Kim, S. P., Carol, L. and Mendel, F. 2019. Anti-adipogenic and anti-obesity activities of purpurin in 3T3-L1 preadipocyte cells and in mice fed a high-fat diet. *BMC Complement. Altern. Med.* **19**, 364.
21. Park, E., Lee, C. G., Kim, J., Yeo, S., Kim, J. A., Choi, C. W. and Jeong, S. Y. 2020. Antiobesity effects of gentiana lutea extract on 3T3-L1 preadipocytes and a high-fat diet-induced mouse model. *Molecules* **25**, 2453.
22. Park, H. J., Cho, J. Y., Kim, M. K., Koh, P. O., Cho, K. W., Kim, C. H., Lee, K. S., Chung, B. Y., Kim, G. S. and Cho, J. H. 2012. Anti-obesity effect of *Schisandra chinensis* in 3T3-L1 cells and high fat diet-induced obese rats. *Food Chem.* **134**, 227-234.
23. Pi-Sunyer, X. 2009. The medical risks of obesity. *Postgrad. Med.* **121**, 21-33.
24. Ranaweera, S. Natraj, P., Rajan, P., Dayarathne, A., Mihindukulasooriya, S., Dinh, D. T. T., Jee, Y. and Han, C. H. 2021. Anti-obesity effect of sulforaphane in broccoli leaf extract on 3T3-L1 adipocytes and ob/ob mice. *J. Nutr. Biochem.* **100**, 108885.
25. Rhee, E. 2022. A report of journal of obesity and metabolic syndrome in the last 3 years of upheaval. *JOMES.* **31**, 4-8.
26. Rubin, C. S., Hirsch, A., Fung, C. and Rosen, O. M. 1978. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness *in vitro*. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* **253**, 7570-7578.
27. Russell, T. R. and Ho, R. 1976. Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells: triggering of differentiation by prostaglandin F 2α and 1-methyl-3-isobutyl xanthine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**, 4516-4520.
28. Seo, E. K. and Kinghorn, A. D. 2000. Bioactive constituents of the family *Differocarpaceae*. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **23**, 531-561.
29. Shona, M. and McGee, S. L. 2015. 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. *Adipocyte* **4**, 295-302.
30. Silverstone, T. 1992. Appetite suppressants. *Drugs* **43**, 820-836.
31. Sivaprakasam, S., Sikder, M. O. F., Ramalingam, L., Kaur, G., Dufour, J. M., Moustaid-Moussa, N., Wachtel, M. S. and Ganapathy, V. 2021. SLC6A14 deficiency is linked to obesity, fatty liver, and metabolic syndrome but only under conditions of a high-fat diet. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1867**, 166087.
32. Thomson, A. B., De Pover, A., Keelan, M., Jarocka-Cyrta, E. and Clandinin, M. T. 1997. Inhibition of lipid absorption as an approach to the treatment of obesity. *Methods Enzymol.* **286**, 3-44.
33. Watanabe, A., Kato, T., Ito, Y., Yoshida, I., Harada, T., Mishima, T., Fujita, K., Watai, M., Nakagawa, K. and Miyazawa, T. 2014. Aculeatin, a coumarin derived from *Toddalia asiatica* (L.) Lam., enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 787-792.
34. Włodarczyk, M. and Nowicka, G. 2019. Obesity, DNA

- damage, and development of obesity-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1146.
35. Yang, W. S., Lee, B. H., Kim, S. H., Kim, H. G., Yi, Y. S., Htwe, K. M., Kim, Y. D., Yoon, K. D., Hong, S., Lee, W. S. and Cho, J. Y. 2014. *Dipterocarpus tuberculatus* ethanol extract strongly suppresses in vitro macrophage-mediated inflammatory responses and in vivo acute gastritis. *J. Ethnopharmacol.* **19**, 873-80.
36. Yin, M. C. and Chan, K. C. 2007. Nonenzymatic anti-oxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 7177-7181.
37. Zghonda, N., Yoshida, S., Ezaki, S., Otake, Y., Murakami, C., Mliki, A., Ghorbel, A. and Miyazaki, H. 2012. ϵ -Viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 954-960.

초록 : 3T3-L1 지방세포에서 lipogenesis 저해제와 lipolysis 촉진제로서 *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.의 새로운 역할

이수진¹ · 김지은¹ · 최윤주¹ · 진유정¹ · 노유정¹ · 설아윤¹ · 송희진¹ · 황대연^{1,2*}
 (¹부산대학교 바이오소재과학과, ²부산대학교 웰빙제품연구센터/청정실험동물센터)

Dipterocarpus tuberculatus Roxb.의 약리학적 효능은 광노화(photoaging), 염증(inflammation), 간독성 (hepatotoxicity), 급성 위염(acute gastritis) 및 골유착(osseointegration)을 포함한 일부 분야에서만 연구되었다. 비만에 대한 *D. tuberculatus*의 새로운 효능을 규명하기 위해, *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.의 메탄올 추출물(MED)을 처리한 3T3-L1 지방세포에서 지방축적에 대한 억제효과와 지방분해에 대한 촉진효과를 연구하였다. MDI로 분화를 유도한 3T3-L1 지방세포에 분화 기간동안 MED를 처리했을 때, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 와 CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP) α 의 mRNA 수준 뿐만 아니라 adipocyte fatty acid binding protein 2 (aP2)과 fatty acid synthase (FAS)의 발현을 억제하였다. MDI로 분화를 유도한 3T3-L1 지방세포에 분화 기간 동안 MED를 처리했을 때, Oil red O로 염색된 지방방울(lipid droplets)에서 유사한 감소가 관찰되었다. 더불어, 3T3-L1 지방세포에 MDI로 분화를 유도한 후 MED를 처리했을 때, cAMP농도, free glycerol 농도, lipases의 발현을 포함한 lipolytic target의 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 MED가 MDI로 분화를 유도한 3T3-L1 지방세포에서 lipogenesis 저해제와 lipolysis 촉진제로서 새로운 역할을 갖음을 제시하고 있다.