

## Research Article



# 고지방식이 급여 쥐에서 수용성 뽕나무 잎 추출물의 간 microRNA-221/222 발현 및 염증 조절을 통한 간 지질 축적억제 효과

이막순 <sup>1</sup>, 김채민 <sup>1</sup>, 고현미 <sup>1</sup>, 김양하 <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>이화여자대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>이화여자대학교 시스템헬스융합전공

## OPEN ACCESS

Received: Mar 2, 2022

Revised: Mar 30, 2022

Accepted: Apr 6, 2022

Published online: Apr 21, 2022

### 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

Email: yhmoon@ewha.ac.kr

© 2022 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>

Cheamin Kim 

<https://orcid.org/0000-0003-4347-5383>

Hyunmi Ko 

<https://orcid.org/0000-0001-5070-5971>

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).

## Inhibitory effect of water-soluble mulberry leaf extract on hepatic lipid accumulation in high-fat diet-fed rats via modulation of hepatic microRNA-221/222 expression and inflammation

Mak-Soon Lee <sup>1</sup>, Cheamin Kim <sup>1</sup>, Hyunmi Ko <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:** This study investigated the effects of water-soluble mulberry leaf extract (ME) on hepatic lipid accumulation in high-fat diet-fed rats via the regulation of hepatic microRNA (miR)-221/222 and inflammation.

**Methods:** Male Sprague-Dawley rats (4 weeks old) were randomly divided into 3 groups (n = 7 each) and fed with 10 kcal% low-fat diet (LF), 45 kcal% high-fat diet (HF), or HF + 0.8% ME for 14 weeks. Lipid profiles and cytokine levels of the liver and serum were measured using commercial enzymatic colorimetric and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively. The messenger RNA (mRNA) and miR levels in liver tissue were assayed by real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction.

**Results:** Supplementation of ME reduces body weight and improves the liver and serum lipid profiles as compared to the HF group. The mRNA levels of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, sterol regulatory element binding protein-1c, fatty acid synthase, and fatty acid translocase, which are genes involved in lipid metabolism, were significantly downregulated in the ME group compared to the HF group. In contrast, the mRNA level of hepatic carnitine palmitoyl transferase-1 (involved in fatty acid oxidation) was upregulated by ME supplementation. Furthermore, administration of ME significantly downregulated the mRNA levels of inflammatory mediators such as hepatic tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1, and inducible nitric oxide synthase. The serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and nitric oxide were also significantly reduced

**Conflict of Interest**

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

in ME group compared to the HF group. Expression of hepatic miR-221 and miR-222, which increase in the inflammatory state of the liver, were also significantly inhibited in the ME group compared to the HF group.

**Conclusion:** These results indicate that ME has the potential to improve hepatic lipid accumulation in high-fat diet-fed rats via modulation of inflammatory mediators and hepatic miR-221/222 expressions.

**Keywords:** Morus; non-alcoholic fatty liver disease; microRNAs; inflammation; lipid metabolism

**서론**

비알코올성 지방간 질환 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 세계적으로 가장 흔한 만성 간 질환으로 비만 및 제2형 당뇨병과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며 실제로 비만 및 제2형 당뇨병 환자의 약 2/3가 지방간을 나타낸다 [1,2]. NAFLD는 지방이 비정상적으로 축적되는 단순 지방증에서 지방간염, 간경변증에 이르기까지 질환의 범위가 광범위하다 [3]. 비만은 간 내에 지방 합성과 유리지방산 (free fatty acid, FFA) 흡수가 증가하여 과도하게 지질이 축적되는 NAFLD의 원인이 된다 [4]. 간에서 지방 생합성은 peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- $\gamma$ ), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)와 fatty acid synthase (FAS) 등이 관여하며, 간세포로의 FFA 흡수는 막수용체인 fatty acid translocase (FAT/CD36)에 의해 촉진된다 [5-7]. 간세포 내 미토콘드리아 지방산  $\beta$ -산화는 carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1)에 의해 지방대사 균형을 유지한다 [8].

NAFLD는 간 지질 독성 및 산화 스트레스로 인한 간세포 손상을 유발할 수 있으며 이는 염증 경로를 활성화할 수 있다 [9]. 염증상태에서 전염증성 사이토카인 tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )와 interleukin 6 (IL-6)는 간과 혈액에서 증가하는 반면 이들 사이토카인을 억제하면 NAFLD를 개선시키는 것으로 나타났다 [10]. 또한, 간에서 TNF- $\alpha$ , IL-6와 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)의 증가는 비알코올성 지방간염 발병에 기여한다 [11]. 유도성 산화질소 합성효소 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)는 아미노산 L-arginine로부터 산화질소 (nitric oxide, NO)를 생성하는 핵심 효소 중 하나로 염증 및 감염 상태에서 중요한 역할을 한다 [12]. 특히 iNOS에 의해 생성되는 다량의 NO는 간 섬유증을 비롯한 많은 간 질환의 발병에 관여한다 [13].

MicroRNA (miR)는 약 20-22개의 염기로 이루어진 RNA로 유전자 발현을 제어하는 전사 후 조절 인자이며 miR이 간 질환에 관여한다는 것은 이미 보고되었다 [14,15]. miR-221은 간의 종양 발생 과정에 관여하며 miR-221/222는 간 섬유화를 촉진시킨다 [14,15]. 반면 miR-221/222를 인위적으로 억제시키면 간 지방증과 간 섬유화를 감소시킨다 [16]. 따라서 miR-221/222는 NAFLD의 치료를 위한 잠재적인 바이오 마커로서 사용할 수 있다.

뽕나무 (*Morus alba* L.)는 한국을 비롯하여 일본 및 중국 등 동아시아를 중심으로 널리 분포하고 있으며 뽕나무 잎 (mulberry leaf)은 오래 전부터 전통적인 약용식물로서 기침, 발열, 인후통, 눈의 통증 및 현기증 치료제로 사용되어 왔다 [17]. 특히 뽕나무 잎은 caffeic acid, quercetin, chlorogenic acid 및 kaempferol과 같은 폴리페놀 성분을 풍부하게 함유하고

있으며 뽕나무 잎의 추출물은 항당뇨병, 항동맥경화, 항암, 항박테리아, 항산화 및 항염 작용 등 다양한 생리활성 효과들이 알려져 있다 [18,19]. 최근 우리는 고콜레스테롤을 섭취한 쥐에서 뽕나무 잎의 초고압 (high hydrostatic pressure) 추출물이 간의 miR-33 발현 및 AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성 조절을 통한 항 콜레스테롤 효과가 있음을 보고하였다 [20]. 그러나 고지방식을 섭취한 쥐에서 수용성 뽕나무 잎 추출물 (water-soluble mulberry leaf extract, ME)과 간의 miR-221/222 조절에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 고지방식을 급여한 쥐에서 ME의 간 지질 축적억제 효과를 조사하고 간과 혈청에서 지질대사와 염증조절에 관여하는 매개 인자들과 miR-221/222 발현을 분석하였다.

## 연구방법

### 뽕나무 잎 추출물 준비

ME는 5월에 수확한 뽕나무 잎 (Sangju, Korea)을 사용하여 추출하였으며 이것은 한국식품연구원 (Wanju, Korea)으로 부터 제공받았다. 뽕나무 잎은 분쇄한 다음 물과 혼합하여 50°C에서 4시간 동안 환류 추출한 후 여과하여 얻은 추출액을 동결건조하여 사용하였다. ME에 포함된 페놀성 화합물은 이전에 설명된 ultra-performance liquid chromatography (UPLC) 방법 [20]으로 분석하였으며 값들은 시료 100 g당 mg으로 나타내었다.

### 실험동물 사육 및 식이

실험동물은 생후 3주령의 수컷 Sprague-Dawley 계열 쥐 (Doo Yeol Biotech, Seoul, Korea)를 일정한 온도 (22 ± 2°C)와 습도 (55 ± 5%)가 유지되는 동물 사육실에서 1주일 동안 적응시켰다. 실험동물들은 7마리씩 3개의 군으로 나누어 10 kcal% 저지방식이 (low-fat diet, LF), 45 kcal% 고지방식이 (high-fat diet, HF), HF + 0.8% ME를 첨가한 식이를 조절하여 14주 동안 자유 급식하게 하였으며 식이조성은 Table 1과 같다. 모든 실험 절차는 이화여자대학교 동물실험윤

Table 1. Experimental diet composition (unit: g/kg diet)

Component	LF	HF	ME
Casein	189.57	233.07	233.07
Sucrose	163.79	201.38	201.38
Maltodextrin	71.09	116.54	116.54
Corn starch	428.63	84.84	76.84
Cellulose	47.39	58.27	58.27
Soybean oil	23.70	29.13	29.13
Lard	18.96	206.85	206.85
Potassium citrate	15.64	19.23	19.23
Dicalcium phosphate	12.32	15.15	15.15
Mineral mix (AIN-93G)	9.48	11.65	11.65
Vitamin mix (AIN-93G)	9.48	11.65	11.65
Calcium carbonate	5.21	6.41	6.41
L-cystine	2.84	3.50	3.50
Choline bitartrate	1.90	2.33	2.33
Mulberry leaf extract (ME)	-	-	8.0
Total	1,000	1,000	1,000
Energy density (kcal/g)	3.6	4.6	4.6
Carbohydrates % (kcal)	70	35	35
Protein % (kcal)	20	20	20
Fat % (kcal)	10	45	45

Experimental diets were formulated based on D12450H (LF) and D12451 (HF) diet composition (research diets). LF, 10 kcal% low-fat diet; HF, 45 kcal% high-fat diet; ME, HF + 0.8% water-soluble mulberry leaf extract.

리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인을 받아 수행하였다 (IACUC No. 17-057).

### 혈액과 간의 지질 지표 분석

혈청의 중성지방 (triglyceride, TG), 총 콜레스테롤 (total cholesterol, TC)과 HDL-콜레스테롤 (high-density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) 농도는 효소비색법을 이용한 상업용 분석 kit (Embiel, Gunpo, Korea)를 이용하여 분석하였다. LDL-콜레스테롤 (low-density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) 농도는 Friedewald의 공식을 이용하여 구하였다 [21]. 혈청 유리지방산 (FFA) 농도는 상업용 분석 kit (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)의 제조회사 지침에 따라 분석하였다. 간의 총 지질은 시료 0.5g을 chloroform:methanol (2:1, v/v) 혼합용매로 사용하여 Bligh와 Dyer의 방법에 따라 추출하였다 [22]. 간의 TG와 TC 함량은 추출한 간 지질에서 효소비색법을 이용한 상업용 분석 kit (Embiel)를 이용하여 분석하였다.

### 효소면역분석 및 산화질소 측정

혈청 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 농도는 효소면역분석 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BioLegend, San Diego, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다. 혈청 산화질소 (NO) 생성은 Griess reagent kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 분석하였다. 각각의 흡광도는 Varioskan plate reader (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 측정하였다.

### Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

간 조직의 총 RNA는 RiboEx 시약 (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)을 사용하여 추출하였고 분리한 RNA는 Nano drop 1000 (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 정량하였다. Messenger RNA (mRNA) 수준은 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 complementary DNA (cDNA)를 합성한 후 2X SYBR Green PCR Master Mix (Bioneer)를 이용하여 증폭시킨 다음 측정하였다. RT-qPCR 증폭은 Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilden, Germany)에서 수행하였다. 사용된 primers의 염기서열은 **Table 2**와 같다. mRNA 발현에 대한 상대적인 정량은  $\beta$ -actin으로 표준화하고 delta-delta Ct 방법을 이용하여 분석하였다 [23].

miR 수준을 분석하기 위해 miRNA cDNA는 miRNA cDNA Synthesis Kit with Poly (A) Polymerase Tailing (ABM Inc., Richmond, BC, Canada)을 사용하여 합성하였다. qRT-PCR 증폭은 EvaGreen miRNA Master Mix (ABM Inc.)를 혼합한 후 Rotor-Gene Q (QIAGEN)에서 수행하였다. miR 발현은 miR-221/222 및 RNU6의 specific primers (ABM Inc.)를 사용하여 정량 하였다. miR-221/222 발현 수준은 RNU6 snRNA로 표준화하고 delta-delta Ct 방법을 사용하여 분석하였다 [24].

### 통계 분석

본 연구의 실험결과들은 SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)을 이용하여 분석하였다. 실험군의 평균 (mean)과 표준오차 (SEM)로 나타내었고 실험군 간 (LF, HF, ME)의 유의미한 차이는 일원배치 분산분석 (1-way analysis of variance)을 한 후 Tukey's multiple range test에 의하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검증하였다. ME의 플라보놀 함량은 3회 반복 측정한 평균값과 표준편차로 나타내었다.

**Table 2.** Primers used for qRT-PCR

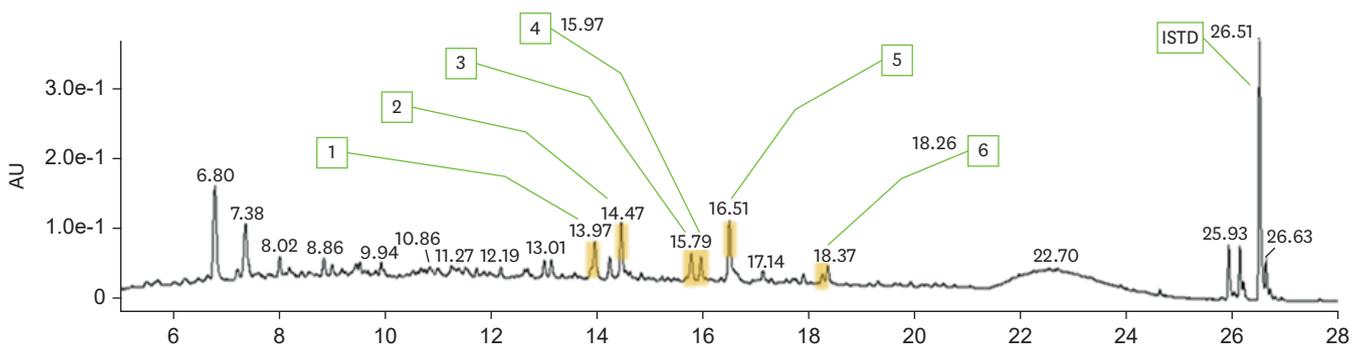
Name	GeneBank No.	Primer sequence (5'-3')
β-actin	NM_0311440	F: GGCACCACACTTTCTACAAT R: AGGTCTCAAACATGATCTGG
CPT1	NM_031559	F: TCGGCAGACCTATTTTGCAC R: ATTTGGCGTAGCTGCGATG
FAS	NM_017332	F: GCAGCAGCATGATGTAGCAC R: AGTTGCACACCACAAGGTCA
FAT/CD36	NM_031561	F: CCTGTGAGTTGGCAAGAAGC R: TCGGCAGACCTATTTTGCAC
IL-6	NM_012589	F: ATAGTCCTTCTACCCCAAC R: TGCCGAGTAGACCTCATAGT
iNOS	NM_012611	F: TCCTGCCACCTTGAGTTCA R: TGGTCACCTCCAGCACAAAGA
MCP-1	NM_031530	F: ACTCACCTGCTGCTACTCAT R: CTACAGCTCTTTGGGACAC
PPAR-γ	NM_001145366	F: TGTGGGGATAAAGCATCAGG R: CAAGGCACTTCTGAAACCGA
SREBP-1c	AF286470	F: AGGAGGCCATCTTGTGCTT R: GTTTGGACCCTAGGGCAGC
TNF-α	NM_012675	F: CCCCTTTATCGTCTACTCCT R: ACTACTCAGCGTCTCGTGT

qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; CPT1, carnitine palmitoyl transferase 1; FAS, fatty acid synthase; FAT/CD36, fatty acid translocase; IL-6, interleukin-6; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; PPAR-γ, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein-1c; TNF-α, tumor necrosis factor alpha.

## 결과

### 페놀성 화합물 함량

ME의 페놀성 화합물은 UPLC 방법으로 분석하였으며 (Fig. 1) 정량 분석 결과는 Table 3과 같다. ME로부터 발견된 플라보놀은 quercetin 3-O-rutinoside (rutin), quercetin 3-O-glucoside (isoquercitrin), quercetin 3-O-(6''-O-malonyl) glucoside, kaempferol 3-O-rutinoside (nicotiflorin), quercetin 3-O-(2''-O-malonyl) glucoside (morkotin), kaempferol 3-O-glucoside (astragalin), and kaempferol 3-O-(6''-O-malonyl) glucoside 등을 포함하고 있으며 총 플라보놀 함량은  $42.98 \pm 1.05$  mg/100 g으로 나타났다.



**Fig. 1.** UPLC chromatogram of flavonols found from ME.

Peak 1, quercetin 3-O-rutinoside (rutin); Peak 2, quercetin 3-O-glucoside (isoquercitrin); Peak 3, quercetin 3-O-(6''-O-malonyl) glucoside; Peak 4, kaempferol 3-O-rutinoside (nicotiflorin); Peak 5, quercetin 3-O-(2''-O-malonyl) glucoside (morkotin), kaempferol 3-O-glucoside (astragalin); Peak 6, kaempferol 3-O-(6''-O-malonyl) glucoside.

ISTD, internal standard; UPLC, ultra-performance liquid chromatography; ME, water-soluble mulberry leaf extract.

**Table 3.** Phenolic compounds identified in ME

Compound	mg/100 g dried sample
Quercetin 3-O-rutinoside (rutin)	9.16 ± 0.42
Quercetin 3-O-glucoside (isoquercitrin)	9.54 ± 0.62
Quercetin 3-O-(6"-O-malonyl) glucoside	5.00 ± 0.31
Kaempferol 3-O-rutinoside (nicotiflorin)	3.88 ± 0.19
Quercetin 3-O-(2"-O-malonyl) glucoside (morkotin), Kaempferol 3-O-glucoside (astragalol)	13.50 ± 0.64
Kaempferol 3-O-(6"-O-malonyl) glucoside	1.75 ± 0.07
Total flavonols	42.98 ± 1.51

Data are expressed as mean ± standard deviation of 3 replicates.  
ME, water-soluble mulberry leaf extract.

### 체중 변화, 식이 및 에너지 섭취량

LF, HF 및 ME 식이를 14주간 섭취한 실험동물의 체중 변화, 식이 및 에너지 섭취량 등은 **Table 4**와 같다. 체중 증가와 부고환 지방 무게는 LF 군에 비해 HF 군에서 각각 1.25배와 1.69배 유의적으로 증가하였으며 ME 군에서는 HF 군에 비해 각각 11.0%와 25.2% 유의적으로 줄었다. 식이 섭취량은 LF 군에 비해 HF 군과 ME 군에서 유의적으로 낮았으며, 에너지 섭취량은 LF 군에 비해 HF 군과 ME 군에서 유의적으로 높았다. 반면 에너지 효율과 간 무게는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다.

### 혈청과 간의 지질 농도

실험군간 혈청과 간의 지질 농도는 **Table 5**와 같다. HF 군은 LF 군에 비해 혈청의 TC 및 LDL-C 농도가 유의적으로 높았으며 TG 농도는 통계적 유의성이 없었으나 증가하는 경향을 나타내

**Table 4.** Effects of ME on body weight and food intake

Variable	LF	HF	ME
Initial body weight (g)	57.41 ± 14.74	57.01 ± 7.29	58.38 ± 2.76
Final body weight (g)	468.68 ± 14.74 <sup>c</sup>	573.41 ± 7.29 <sup>a</sup>	520.98 ± 11.48 <sup>b</sup>
Body weight gain (g/14 wks)	411.82 ± 15.15 <sup>c</sup>	517.41 ± 8.41 <sup>a</sup>	460.29 ± 12.11 <sup>b</sup>
Food intake (g/day)	22.32 ± 0.54 <sup>b</sup>	20.07 ± 0.34 <sup>a</sup>	19.77 ± 0.38 <sup>a</sup>
Energy intake (kcal/day)	80.34 ± 1.96 <sup>b</sup>	96.67 ± 1.63 <sup>a</sup>	90.96 ± 1.77 <sup>a</sup>
Energy efficiency (g body weight gained/kcal consumed)	0.052 ± 0.001	0.055 ± 0.001	0.052 ± 0.001
Liver weight (g/100 g of body weight)	2.65 ± 0.06	2.75 ± 0.02	2.59 ± 0.05
Epididymal adipose tissue weight (g/100 g of body weight)	2.21 ± 0.15 <sup>c</sup>	3.73 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.79 ± 0.05 <sup>b</sup>

Values are expressed as mean ± SEM (n = 7).

LF, 10 kcal% low-fat diet; HF, 45 kcal% high-fat diet; ME, HF + 0.8% water-soluble mulberry leaf extract.

Different letters indicate statistically significant differences at p < 0.05.

**Table 5.** Effects of ME on lipid profiles in the serum and liver

Metabolite	LF	HF	ME
Serum lipids			
TG (mmol/L)	0.97 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.26 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.05 <sup>b</sup>
TC (mmol/L)	3.60 ± 0.07 <sup>b</sup>	3.88 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.56 ± 0.07 <sup>b</sup>
HDL-C (mmol/L)	2.53 ± 0.07 <sup>ab</sup>	2.45 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.73 ± 0.08 <sup>a</sup>
LDL-C (mmol/L)	0.57 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.13 <sup>b</sup>
FFA (mEq/L)	0.38 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.45 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>b</sup>
Liver lipids			
Total lipid (mg/g liver)	48.95 ± 0.82 <sup>b</sup>	76.81 ± 2.80 <sup>a</sup>	55.69 ± 1.59 <sup>b</sup>
TG (μmol/g)	20.51 ± 1.89 <sup>b</sup>	36.83 ± 1.92 <sup>a</sup>	22.94 ± 1.84 <sup>b</sup>
TC (μmol/g)	4.93 ± 0.62 <sup>b</sup>	9.27 ± 0.14 <sup>a</sup>	5.44 ± 0.37 <sup>b</sup>

Values are expressed as mean ± SEM (n = 7).

FFA, free fatty acid; HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglyceride. LF, 10 kcal% low-fat diet; HF, 45 kcal% high-fat diet; ME, HF + 0.8% water-soluble mulberry leaf extract.

Different letters indicate statistically significant differences at p < 0.05.

었다. ME 군의 혈청 TG, TC 및 LDL-C 농도는 HF 군에 비해 각각 42.8%, 8.4% 및 39.3% 유의적으로 낮았으며, 이에 반해 HDL-C 농도는 1.11배 유의적으로 높았다. 혈청 유리지방산 농도는 HF 군에 비해 ME 군에서 46.5% 유의적으로 낮았다. 간의 총 지질, TG 및 TC 함량은 HF 군이 LF 군에 비해 각각 1.57배, 1.80배 및 1.88배 유의적으로 현저히 증가하는 것으로 나타났으며 ME 군은 HF 군에 비해 각각 27.5%, 37.7% 및 41.3% 유의적으로 감소하였다.

### 지질대사에 관여하는 유전자 발현

ME의 간 지질 축적 억제 효과가 간 내 지방합성, 유리지방산 흡수 및 지방산 산화에 관여하는 유전자 발현 변화에 영향을 미치는지 조사하였다. 지방합성에 관여하는 유전자인 PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c와 FAS의 mRNA 수준은 LF 군에 비해 HF 군에서 각각 1.79배, 1.73배와 2.73배 상향 조절되었으며 ME 군에서는 HF 군에 비해 각각 40.7%, 42.4% 및 42.3% 유의적으로 하향 조절되었다 (Fig. 2). 간세포로의 유리지방산 흡수에 관여하는 FAT/CD36의 mRNA 수준은 LF 군에 비해 HF 군에서 1.81배 상향 조절되었으며 ME 군에서는 HF 군에 비해 37.0% 유의적으로 하향 조절되었다 (Fig. 2). 반면에 지방산 산화에 관여하는 CPT1의 mRNA 수준은 LF 군에 비해 HF 군에서 24.5% 하향 조절되었으며 ME 군에서는 HF 군에 비해 1.39배 유의적으로 상향 조절되었다 (Fig. 2).

### 염증 조절에 관여하는 매개 인자

염증 조절에 관여하는 매개인자인 TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, iNOS 및 NO가 ME에 의해 영향을 미치는지 알아보기 위해 간의 유전자 발현 수준과 혈청 농도를 조사하였다. 간에서 TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1과 iNOS의 mRNA 수준은 HF 군에 비해 ME 군에서 각각 37.2%, 45.9%, 45.7%와 39.8% 유의적으로 하향 조절되었다 (Fig. 3A). 혈청의 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 농도는 HF 군에 비해 ME 군에서 각각 30.6%와 25.8% 유의적으로 낮았다 (Fig. 3B). 혈청 NO 농도 또한 HF 군에 비해 ME 군에서 47.3% 유의적으로 낮았다 (Fig. 3C).

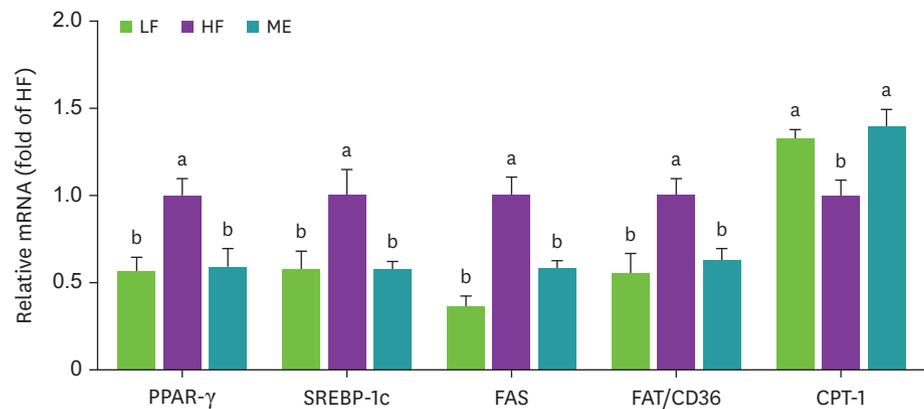
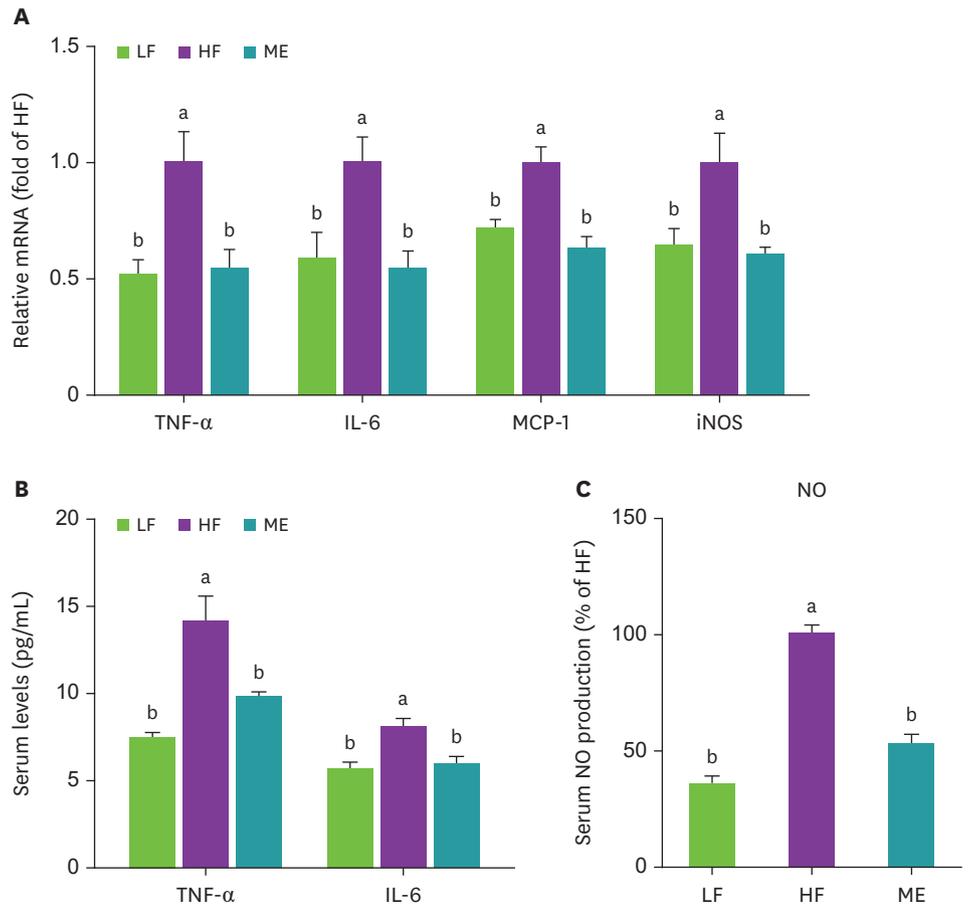


Fig. 2. Effects of ME on hepatic fatty acid metabolism-related gene expression.

The mRNA level was analyzed using RT-qPCR and normalized to  $\beta$ -actin. Data are presented as the fold change compared to the HF group. Serum FFA concentration was measured using a commercial kit. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 7).

mRNA, messenger RNA; RT-qPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; CPT-1, carnitine palmitoyl transferase-1; FAT/CD36, fatty acid translocase; FAS, fatty acid synthase; PPAR- $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor-gamma; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein-1c; LF, 10 kcal% low-fat diet; HF, 45 kcal% high-fat diet; ME, HF + 0.8% water-soluble mulberry leaf extract.

Different letters indicate statistically significant differences at  $p < 0.05$ .



**Fig. 3. Effects of ME on the regulation of inflammation mediators in serum and liver.**

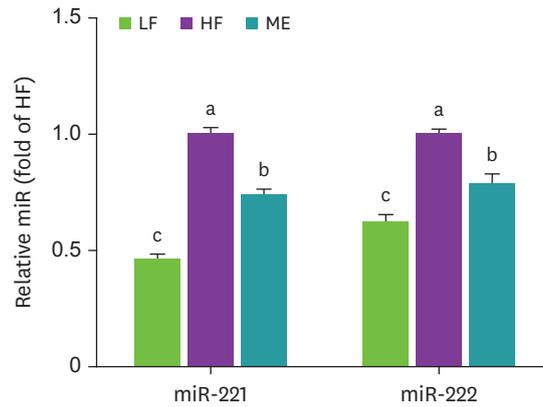
(A) The mRNA levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were measured by RT-qPCR and normalized to  $\beta$ -actin. Data are presented as the fold change compared to the HF group. (B) The serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were analyzed by ELISA kit. (C) Serum NO concentration was measured using the Greiss reaction. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 7). mRNA, messenger RNA; RT-qPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IL-6, interleukin 6; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NO, nitric oxide; iNOS, inducible nitric oxide synthase; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; LF, 10 kcal% low-fat diet; HF, 45 kcal% high-fat diet; ME, HF + 0.8% water-soluble mulberry leaf extract. Different letters indicate statistically significant differences at p < 0.05.

### miR-221/222 발현

ME에 의한 miRs 조절 기전을 확인하기 위해 간의 염증 상태에서 증가하는 miR-221과 miR-222의 발현 변화를 조사하였다. 간의 miR-221과 miR-222 발현 수준은 LF 군에 비해 HF 군에서 각각 2.17배와 1.61배 현저히 증가하였으며 ME 군에서는 HF 군에 비해 각각 26.0% 및 20.7% 유의적으로 억제되었다 (Fig. 4).

### 고찰

본 연구에서는 고지방식을 섭취한 쥐에서 ME가 간 지질 축적, 염증 매개체와 간의 miR-221/222 조절에 영향을 미치는지에 대해 조사하였다. 본 연구에서 HF 식이를 14주간 섭취한 쥐의 몸무게는 LF 식이를 섭취한 쥐에 비해 현저히 증가하였으며 ME 식이를 섭취한 쥐에서



**Fig. 4. Effects of ME on hepatic miR-221/222 expression.**

The miR level was analyzed using RT-qPCR and normalized to RNU6 snRNA. Values are expressed as the fold change compared to the HF group (mean ± SEM, n = 7).

miR, microRNA; RT-qPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; LF, 10 kcal% low-fat diet; HF, 45 kcal% high-fat diet; ME, HF + 0.8% water-soluble mulberry leaf extract.

Different letters indicate statistically significant differences at p < 0.05.

유의적으로 줄었다. ME는 혈청 TG, TC 및 LDL-C 농도를 유의적으로 감소시킨 반면 HDL-C 농도는 유의적으로 증가시켰다. 간의 총 지질, TG와 TC 함량 또한 ME에 의해 유의적으로 감소되었다. Oh 등 [25]은 뽕나무 잎의 에탄올 추출물이 비만 쥐의 체중증가억제와 간 지질 축적억제 효과를 나타낸다고 보고하였다. 뽕나무의 잎과 열매의 복합물은 고지방식이 섭취한 쥐의 몸무게와 혈장 TG 농도를 감소시켰으며 최근에는 뽕나무 잎의 다당류가 비만 예방 효과가 있다고 보고하였다 [26,27]. 이와 비슷하게 본 연구 결과들은 ME가 혈청 지질지표들을 개선하고 간 지질 축적억제를 통한 항비만 효과를 나타내고 있다.

PPAR-γ와 SREBP-1c는 간 내 지방 생합성 조절에서 중추적인 역할을 하는 전사인자이다 [5,6]. SREBP-1c는 FAS 유전자 발현을 자극하여 간의 지방생합성을 유도한다 [6]. 체내 과도한 FFA는 간 내 지방축적의 원인이 되며 FAT/CD36은 순환하는 FFA를 간세포로 이동시키는 역할을 한다 [7]. 간 내 FFA 유입이 증가하게 되면 CPT1에 의해 지방산 β-산화를 촉진시킨다 [8]. 이전 연구에서, 뽕나무 잎의 에탄올 추출물은 3T3-L1 지방세포의 지방 축적을 낮추고 PPAR-γ와 FAS의 단백질 수준을 억제한다고 보고하였다 [28]. 최근에는 뽕나무 잎 열수 추출물이 3T3-L1 지방세포에서 PPAR-γ, SREBP-1c와 FAS 유전자 발현을 감소시키고 지질축적을 억제한다고 보고하였다 [29]. 수용성 뽕나무 잎 추출물은 에탄올 식이 유발 알코올성 지방간 쥐의 간에서 SREBP-1/2 유전자 발현 억제와 함께 간 지질 축적을 개선하였다 [30]. 뽕나무 잎으로부터 분리된 화합물은 HepG2 간세포에서 TG 축적을 억제하고 AMPK 인산화 활성화와 CPT1을 상향 조절하였다 [31]. 뽕나무 잎의 다당류는 고당/고지방 식이를 섭취한 제2형 당뇨병 쥐의 혈액에서 FFA, TG 및 LDL-C 수준이 감소하는 것으로 나타났다 [32]. 본 연구결과는 ME가 고지방 식이를 섭취한 쥐의 혈청 FFA 농도를 낮추고 간에서 PPAR-γ, SREBP-1c, FAS 및 FAT/CD36 유전자 발현을 하향 조절하고 CPT1은 상향 조절하는 것으로 나타났다. 이 결과들은 ME가 간의 지방 합성과 지방산 유입을 저해하고 지방산 β-산화를 촉진한다는 것을 시사한다.

간 내 과도한 지질 축적은 지질독성과 산화 스트레스에 의해 간세포 손상이 발생하고 간세포 사멸과 이에 따른 일련의 염증 반응으로 인한 간 섬유화가 진행된다 [9-13]. 다양한 병인으로 인한 간 손상은 iNOS의 유도를 통해 다량의 NO를 생성하고 전염증성 사이토카인 TNF-α, IL-6

와 MCP-1는 염증 유발 경로를 통해 NAFLD의 진행과정에 관여한다 [10-13]. 실제 iNOS 유전자를 결실한 쥐에서 6주간 고콜레스테롤 식이를 공급한 결과 간 섬유화가 개선되고 간의 TNF- $\alpha$  유전자 발현이 현저히 감소되었다 [33]. 뽕나무 잎의 열수 추출물은 에탄올을 먹인 쥐의 간 염증 반응에서 백혈구 침윤을 저해하고 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 iNOS의 단백질 발현 증가를 억제하였다 [30,34]. 뽕나무 잎의 다당류는 고당/고지방 식이를 섭취한 당뇨 유발 쥐의 혈액에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 농도를 낮추었다 [32]. 고지방식이 유도 지방간 쥐 모델에서 뽕나무 발효 잎은 간의 염증성 매개체 TNF- $\alpha$ , IL-6, 및 iNOS의 유전자 발현을 억제하였다 [35]. 뽕나무 잎은 db/db 당뇨 쥐의 지방조직에서 TNF- $\alpha$ 와 MCP-1 발현을 억제하였다 [36]. 본 연구에서 ME는 고지방식이로 증가된 간의 TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 및 iNOS 유전자 발현을 억제시켰으며 혈청의 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 NO 농도 또한 낮추었다. 따라서 ME는 간과 혈청의 염증 매개체 조절을 통해 염증반응 개선에 유익한 효과를 보여주고 있다.

miR는 세포의 분화, 발달 그리고 항상성을 조절하는 짧은 non-coding RNA로써 특정 유전자의 발현을 조절하며 암을 비롯한 여러 질병에 관여하는 중요한 생체 내 조절인자이다 [14]. 특히, miR-221/222는 간 지방증과 간 섬유화의 진행과정에서 간질환 발병에 영향을 미치는 것으로 보고되었다 [15,16]. miR-221/222가 제거된 비알콜성 지방간염 쥐의 간에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 유전자 발현은 현저히 낮아지는 것으로 나타났다 [16]. TNF- $\alpha$ 는 대식세포의 miR-221/222의 발현을 촉진시키고 간 정상세포에서 nuclear factor- $\kappa$ B 억제는 TNF- $\alpha$ 에 의해 자극된 miR-222 유도를 억제하였다 [15,37]. 간암세포에서 종양억제 유전자인 phosphatase and tensin homolog와 tissue inhibitor of metalloproteinases 3는 miR-221/222에 의해 억제되었다 [38]. 그러나, 아직까지 식물 유래 추출물에 의한 간의 miR-221/222 조절 기전에 대한 연구는 보고되지 않았다. 본 연구는 간 질환에 밀접한 연관이 있는 miR-221/222가 ME에 의해 조절되는지 확인하기 위해 수행되었다. 본 연구결과에서 간의 miR-221/222의 발현은 LF 섭취 군보다 HF 섭취군에서 현저히 증가하였고 반면 ME 섭취군에서 유의하게 감소하였다. 이 결과는 ME의 간 지질 축적억제 효과가 miR-221/222 발현 억제와 관련 있음을 시사하며 본 연구에서 처음으로 보고한다.

결론적으로 본 연구 결과를 종합하면 ME는 고지방식이를 섭취한 쥐의 간 지질 축적을 억제하고 간과 혈청의 지질대사와 염증 반응에 관여하는 조절인자들을 개선하고 간의 miR-221/222 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 이 결과들은 ME가 NAFLD를 개선하는데 유익한 효과가 있음을 시사하고 있다.

## 요약

본 연구에서는 ME가 고지방식이를 섭취한 쥐에서 간의 miRs와 염증 조절을 통해 간 지질 축적 억제에 영향을 미치는지 조사하였다. 4주령 수컷 Sprague-Dawley 쥐는 3 그룹 (n = 7)으로 나누어 14주 동안 10 kcal% 저지방 식이 (LF), 45 kcal% 고지방 식이 (HF) 또는 HF + 0.8% ME를 공급하였다. ME의 공급은 체중 증가를 줄이고 혈청 지질 수준을 개선하였으며 간 지질 축적을 억제하였다. 간의 지방 대사에 관여하는 유전자인 PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c, FAS 및 FAT/CD36의 mRNA 수준은 HF 군에 비해 ME 군에서 유의하게 하향 조절되었다. 반면, 지방산 산화에 관여하는 CPT-1의 mRNA 수준은 HF 군에 비해 ME 군에서 유의하게 상향 조절되었다. ME는 간의

염증 매개에 관여하는 TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 및 iNOS의 mRNA 수준을 하향 조절하였으며 혈청의 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 NO 농도 또한 유의하게 낮추었다. 비알콜성 지방간의 염증상태에서 증가하는 miR-221과 miR-222의 발현은 HF 군에 비해 ME 군에서 유의하게 억제되었다. 본 연구의 결과들은 ME의 간 지질 축적 억제 효과가 지질대사와 염증 조절에 관여하는 조절 인자의 개선 및 간의 miR-221/222 발현 억제와 관련 있음을 시사한다. 따라서, ME는 NAFLD를 개선하는 천연물 소재로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

1. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30(5): 1212-1218.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
2. Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int* 2009; 29(1): 113-119.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
3. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeri G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2017; 23(47): 8263-8276.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
4. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol* 2014; 20(28): 9330-9337.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
5. Wang Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, Tanaka N. PPARs as metabolic regulators in the liver: lessons from liver-specific PPAR-null mice. *Int J Mol Sci* 2020; 21(6): 2061.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
6. Ruiz R, Jideonwo V, Ahn M, Surendran S, Tagliabracci VS, Hou Y, et al. Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) is required to regulate glycogen synthesis and gluconeogenic gene expression in mouse liver. *J Biol Chem* 2014; 289(9): 5510-5517.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
7. Noshmeh H, D'Amico E, Farilla L, Hui H, Wawrowsky KA, Mlynarski W, et al. Fatty acid translocase (FAT/CD36) is localized on insulin-containing granules in human pancreatic  $\beta$ -cells and mediates fatty acid effects on insulin secretion. *Diabetes* 2005; 54(2): 472-481.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
8. Schreurs M, Kuipers F, van der Leij FR. Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes Rev* 2010; 11(5): 380-388.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
9. Luo Y, Lin H. Inflammation initiates a vicious cycle between obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Immun Inflamm Dis* 2021; 9(1): 59-73.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
10. Tilg H. The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010; 28(1): 179-185.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
11. Akbari R, Behdarvand T, Afarin R, Yaghooti H, Jalali MT, Mohammadtaghvaei N. Saroglitazar improved hepatic steatosis and fibrosis by modulating inflammatory cytokines and adiponectin in an animal model of non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Pharmacol Toxicol* 2021; 22(1): 53.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
12. Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol* 2005; 15(4): 277-289.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
13. Iwakiri Y. Nitric oxide in liver fibrosis: the role of inducible nitric oxide synthase. *Clin Mol Hepatol* 2015; 21(4): 319-325.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
14. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(1): 264-269.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

15. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, et al. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut* 2012; 61(11): 1600-1609.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
16. Jiang X, Jiang L, Shan A, Su Y, Cheng Y, Song D, et al. Targeting hepatic miR-221/222 for therapeutic intervention of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *EBioMedicine* 2018; 37: 307-321.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
17. Singh R, Bagachi A, Semwal A, Kakar S, Bharadwaj A. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Morus alba* linn.: a review. *J Med Plants Res* 2013; 7(9): 461-469.
18. Sánchez-Salcedo EM, Mena P, García-Viguera C, Hernández F, Martínez JJ. (Poly) phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: their potential for new products rich in phytochemicals. *J Funct Foods* 2015; 18: 1039-1046.  
[CROSSREF](#)
19. Gryn-Rynko A, Bazylak G, Olszewska-Slonina D. New potential phytotherapeutics obtained from white mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Biomed Pharmacother* 2016; 84: 628-636.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
20. Lee E, Lee MS, Chang E, Kim CT, Choi AJ, Kim IH, et al. High hydrostatic pressure extract of mulberry leaves ameliorates hypercholesterolemia via modulating hepatic microRNA-33 expression and AMPK activity in high cholesterol diet fed rats. *Food Nutr Res* 2021; 65.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
21. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18(6): 499-502.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
22. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37(8): 911-917.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
24. 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](#)
25. Oh KS, Ryu SY, Lee S, Seo HW, Oh BK, Kim YS, et al. Melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonism and anti-obesity effects of ethanolic extract from *Morus alba* leaves in diet-induced obese mice. *J Ethnopharmacol* 2009; 122(2): 216-220.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
26. Li R, Xue Z, Jia Y, Wang Y, Li S, Zhou J, et al. Polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaf prevents obesity by inhibiting pancreatic lipase in high-fat diet induced mice. *Int J Biol Macromol* 2021; 192: 452-460.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
27. 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](#)
28. 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](#)
29. Du Y, Li DX, Lu DY, Zhang R, Zhong QQ, Zhao YL, et al. Amelioration of lipid accumulations and metabolism disorders in differentiation and development of 3T3-L1 adipocytes through mulberry leaf water extract. *Phytomedicine* 2022; 98: 153959.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
30. Lee YJ, Tsai MC, Lin HT, Wang CJ, Kao SH. Aqueous mulberry leaf extract ameliorates alcoholic liver injury associating with upregulation of ethanol metabolism and suppression of hepatic lipogenesis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021; 2021: 6658422.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
31. Huang P, Hao M, Gao Q, Ruan J, Yang S, Liu M, et al. Constituents of *Morus alba* var. multicaulis leaf improve lipid metabolism by activating the AMPK signaling pathway in HepG2 cells. *J Nat Med* 2022; 76(1): 200-209.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
32. Liu CG, Ma YP, Zhang XJ. Effects of mulberry leaf polysaccharide on oxidative stress in pancreatic β-cells of type 2 diabetic rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(10): 2482-2488.  
[PUBMED](#)

33. Anavi S, Eisenberg-Bord M, Hahn-Obercyger M, Genin O, Pines M, Tirosh O. The role of iNOS in cholesterol-induced liver fibrosis. *Lab Invest* 2015; 95(8): 914-924.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
34. Liang HW, Yang TY, Teng CS, Lee YJ, Yu MH, Lee HJ, et al. Mulberry leaves extract ameliorates alcohol-induced liver damages through reduction of acetaldehyde toxicity and inhibition of apoptosis caused by oxidative stress signals. *Int J Med Sci* 2021; 18(1): 53-64.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
35. Lee MR, Kim JE, Park JW, Kang MJ, Choi HJ, Bae SJ, et al. Fermented mulberry (*Morus alba*) leaves suppress high fat diet-induced hepatic steatosis through amelioration of the inflammatory response and autophagy pathway. *BMC Complement Med Ther* 2020; 20(1): 283.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
36. Sugimoto M, Arai H, Tamura Y, Murayama T, Khaengkhan P, Nishio T, et al. Mulberry leaf ameliorates the expression profile of adipocytokines by inhibiting oxidative stress in white adipose tissue in db/db mice. *Atherosclerosis* 2009; 204(2): 388-394.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
37. Lodge R, Ferreira Barbosa JA, Lombard-Vadnais F, Gilmore JC, Deshiere A, Gosselin A, et al. Host microRNAs-221 and -222 inhibit HIV-1 entry in macrophages by targeting the CD4 viral receptor. *Cell Rep* 2017; 21(1): 141-153.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
38. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankeu A, et al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell* 2009; 16(6): 498-509.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)