

솔잎(*Pinus densiflora* leaf) 추출물의 항비만효과

최민영¹, 신 별², 유주형¹, 여주호¹, 이재원³, 금나경¹, 안미연⁴, 정진부^{5*}

¹국립안동대학교 생약자원학과, 대학원생, ³박사후연구원, ⁵교수, ²농업회사법인 (주)피노젠, 대표이사,
⁴국립산림품종관리센터, 연구원

Anti-Obesity Effect of *Pinus densiflora* Leaf Extracts

Min Yeong Choi¹, Byel Shin², Ju Hyeong Yu¹, Joo Ho Yeo¹, Jae Won Lee³, Na Gyeong Geum¹,
Mi-Yun An⁴ and Jin Boo Jeong^{5*}

¹Graduate Student, ³Post-doc and ⁵Professor, Department of Medicinal Plant Resources,
Andong National University, Andong 36729, Korea

²Representative, PINOGEN Co., Ltd, Andong 36746, Korea

⁴Researcher, National Forest Seed and Variety Center, Chungju 27495, Korea

Abstract - In this study, we measured the inhibitory activity of *Pinus densiflora* leaf (PDL) against excessive lipid accumulation in mouse preadipocyte, 3T3-L1 cells to investigate whether PDL exerts anti-obesity activity. Lipid accumulation and the protein level were measured using Oil red O staining assay and Western blot analysis, respectively. We observed that PDL inhibited excessive lipid accumulation and decreased the expression of CEBP α , PPAR γ and perilipin-1 related to lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Therefore, considering these results, PDL can be used as a potential agent for anti-obesity.

Key words – Anti-obesity activity, Adipocytes, *Pinus densiflora*, 3T3-L1 cells

서 언

지방조직은 전신 에너지 항상성을 유지하는 데 필수적이며 중성지방을 저장하고 있는 지방세포로 구성되어 있지만, 에너지 섭취와 방출의 불균형에 의해 지방조직 내 지방이 과도하게 축적될 경우 비만을 유발하게 된다(Chang *et al.*, 2017). 비만은 관절질환, 당뇨, 고혈압 등 각종 성인병을 유발하는 위험인자로 잘 알려져 있으며(Park and Kim, 2006; Yu *et al.*, 2021), 비만이 있는 환자들은 비만이 없는 환자들보다 당뇨병 합병증을 가질 가능성이 더 높다(Yu *et al.*, 2021). 현재 다양한 비만치료제들이 시판되고 있으나 이러한 약물들은 여러 부작용을 동반하고 있어 천연물로부터 비만에 효과적인 기능성 소재들을 찾아내는 연구들이 활발하게 진행되고 있다(Ji *et al.*, 2012). 소나무는 전국 산지에 자생하는 소나무과(*Pinaceae*)에 속하는 상록 목으로 예로부터 잎, 솔방울, 꽃가루, 송진, 껍질 등 모든 부위가

구항식물로 사용되었다. 이 중 솔잎은 방부, 살균 및 향기를 주는 효과로 잘 알려져 있지만(Lee and Oh, 2008), 이외에 동맥 경화증, 고혈압, 당뇨병, 신경통과 같은 노인성 및 성인병과 같은 질환의 예방과 치료 목적으로 다양한 형태의 제재로 활용되고 있다(Choi, 2009). 솔잎 추출물의 성분 중 폴리페놀계 항산화제는 당뇨병 및 지방간 질환과 같은 질병에 효과적인 것으로 알려져 있다. 솔잎의 다른 성분인 테르페노이드는 혈중 콜레스테롤과 포도당 수치를 하향 조절한다(Kim *et al.*, 2021). 이러한 기존 연구를 미루어 볼 때, 솔잎은 항비만 효능이 있을 것으로 사료 되어 지방전구세포를 이용하여 솔잎의 항비만 활성을 검증하였다.

재료 및 방법

실험재료

마우스 지방전구세포인 3T3-L1 세포의 배양을 위한 배지 DMEM/F-12는 Lonza (Morristown, NJ, USA)에서 구매하였

*교신저자: E-mail jjb0403@anu.ac.kr

Tel. +82-54-820-7757

다. Dexamethasone, 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Insulin, Oil Red O staining solution은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그리고 Western blot 분석을 위한 antibody인 anti-CEBP α (#2295), anti-PPAR γ (#2435), 그리고 anti-perilipin-1 (#9349), β -actin (#5125) 그리고 anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (#7074)들은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

추출물 제조

본 연구의 시료인 소나무잎(*Pinus densiflora* leaf)은 농업회사법인 PINOGEN (Andong, Korea)에서 제공 받았다. 문경시 회룡길의 적송 15년생 내외의 소나무 가지에서 솔잎만을 분리한 후 열풍건조 하여 분쇄한 솔잎 40 g을 2 L의 증류수에 넣고 100°C에서 5시간 동안 약탕기(DW-890, Daewoongbio, Korea)로 추출하였다. 추출 후 ADVANTEC filter paper (185 mm)로 2회 여과한 후 동결건조하여 보관하였고, 50 mg/mL로 녹여 실험에 사용하였다. 동결건조 된 솔잎 추출물(PDL)은 -80°C의 냉동고에 보관하면서 연구를 위한 시료로 사용되었다.

세포 배양

본 연구에서 사용된 마우스 지방전구세포인 3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 3T3-L1 세포는 10% bovine calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin이 포함된 DMEM/F-12 배지로 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 배양되었다. 3T3-L1 세포의 분화 및 지질축적 유도를 위해, 3T3-L1 세포가 well에 가득 차고 2일 후(D0), 3T3-L1 세포를 DMI 배지 (10% FBS, 1 μ M Dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-Methylxanthine, 10 μ g/mL Insulin)에 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후(D2)에는 3T3-L1세포를 10% FBS와 10 μ g/mL insulin을 포함하는 DMEM/F-12 배지에 48시간 동안 배양하였다. 그 후, D4와 D6에는 10% FBS가 포함된 DMEM/F-12 배지로 배양하였다.

Oil red O staining

솔잎 추출물이 3T3-L1 세포에서 지질 형성에 미치는 영향을 육안으로 확인하기 위해 Oil Red O staining을 수행하였다. 시료를 처리한 3T3-L1 세포를 D8에 회수하여 1XPhosphate-Buffered Saline (PBS)로 2회 세척 한 후, 실온에서 1시간 동안 10% formalin으로 고정시켰다. 고정된 3T3-L1 세포를 증류수로 2회 세척 한 후, 60% isopropanol을 처리하여 5분 동안 방치

하였다. 5분 후, 3T3-L1 세포를 완전히 건조 시키고 실온에서 20분 동안 Oil Red O 용액(60% isopropanol과 40% 증류수)으로 염색하였다. 증류수로 5회 세척 한 후, 염색된 3T3-L1 세포의 지질 방울을 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰, 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

3T3-L1 세포를 6-well plate에 well 당 4X10⁵ cells로 배양하였다. 3T3-L1 세포가 well에 100%가 되고 2일 후, PDL과 DMI가 포함된 배지로 3T3-L1 세포를 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후, PDL과 insulin (10 μ g/mL)이 포함된 배지로 3T3-L1세포를 48시간 배양하였다. 그 후 2일마다 PDL이 포함된 배지로 교체하면서 3T3-L1세포를 배양하였다. 8일째 세포로부터 단백질을 추출하기 위해, 시료를 처리한 세포를 4°C의 1X phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척하였다. 그 후 protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co.)과 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co.)이 포함된 radio-immunoprecipitation buffer (Boston Bio Products, Ashland, MA, USA)를 4°C에서 30분간 방치하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bicinchoninic acid protein assay (Pierce Biotechnology Inc., Waltham, MA, USA)로 정량분석을 진행 후, 동일한 양의 단백질을 10% SDS-acrylamide gel로 전기영동하고 PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 이동시켰다. 이동시킨 membrane을 5% non-fat dry milk로 상온에서 1시간 동안 blocking 한 후, 1차 항체를 5% non-fat dry milk에 용해 시켜 4°C에서 16시간 동안 반응시킨다. 반응시킨 membrane을 0.05% tween-20 이 포함된 tris-buffered saline (TBS-T)로 5분간 3회 세척 한 후 2차 항체는 5% non-fat dry milk에 용해 시켜 membrane에 상온에서 1시간 동안 방치하였고, TBS-T로 10분간 3회 세척 후 ECL western blotting substrate (Amersham Biosciences Co., Little Chalfont, England)를 이용하여 단백질을 확인하였다.

통계분석

모든 결과는 3회 반복 측정한 후 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 처리한 유의성은 Student's *t*-test로 검증하여 *p*-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다(Microsoft Excel 2010, Microsoft, Redmond, WA, USA).

결과 및 고찰

솔잎 추출물이 3T3-L1 세포의 지질 형성 억제

솔잎 추출물(PDL)이 3T3-L1 세포의 지질 형성을 억제하는 효과가 있는지 확인하기 위해 지방분화를 유도하고자 DMI/insulin을 처리한 3T3-L1 세포에 PDL을 농도별로 처리하였다. 처리 후 Oil red O staining을 통해 지질 형성 정도를 확인한 결과, PDL은 농도의존적으로 DMI/insulin에 의해 유도되는 과도한 지질 형성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1). PDL의 지질 형성 억제가 세포독성에 의한 것인지 확인하기 위해 PDL의 3T3-L1세포에 대한 세포독성을 평가한 결과, 세포독성은 없는 것으로 나타났다(Data not shown). 본 결과를 미루어 볼 때, PDL은 항비만 활성이 있는 것으로 판단된다.

솔잎 추출물이 3T3-L1 세포의 지질 형성 관련 단백질 억제

지방세포 유전자의 프로모터에 결합하는 전사인자로 알려진 CEBP α (CCAAT/enhancer binding protein- α)의 과발현은 지방세포에서 지질 형성을 유도할 수 있다고 보고되고

있으며(Tontonoz *et al.*, 1994) 지방세포 말단 분화 유도에 중요한 역할을 한다(Brun *et al.*, 1996). PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ)는 지방세포 분화 과정의 중추 조절자로서 세포 주기의 출구를 유도하고 지방세포 특이적 유전자의 발현을 촉발하여 세포로의 에너지 전달을 증가시키며 주로 지방생성의 말단 분화에 필요하다(Fajas *et al.*, 1998). Perilipin-1은 지질대사를 조절하는 역할을 수행하며, 지질저장에 주요한 역할을 한다(Kim *et al.*, 2014). 따라서, PPAR γ , CEBP α 그리고 perilipin-1의 발현억제는 지방세포 내 지질 형성을 억제하는 주요한 타겟으로 여겨지고 있다. 그리하여, 솔잎 추출물(PDL)의 지방세포 내 지질 형성 억제 활성이 PPAR γ , CEBP α 그리고 perilipin-1의 발현억제와 관련이 있는지 확인하기 위해 Western blot을 통해 확인하였다. 그 결과, 솔잎 추출물은 DMI/insulin에 의한 PPAR γ , CEBP α 그리고 perilipin-1의 과대발현을 억제하였다(Fig. 2). 본 결과를 미루어 볼 때, 솔잎추출물은 PPAR γ , CEBP α 그리고 perilipin-1의 발현억제를 통해 지질 형성을 완화하는 것으로 판단된다.

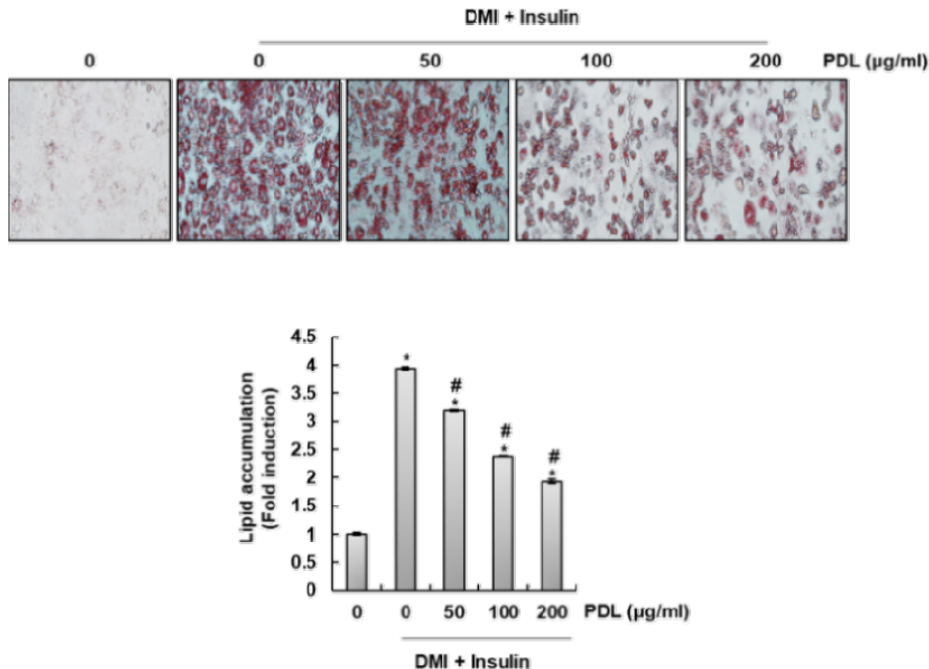


Fig. 1. Inhibitory effect of PDL against DMI/insulin-mediated excessive lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Differentiation of confluent 3T3-L1 mouse preadipocytes was initiated with MDI (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μ M dexamethasone, and 10 μ g/mL insulin) and maintained DMEM/F12-10% FBS medium (maintenance differentiation medium) in the absence or presence of PDL for 8 days. For Oil red O staining, Cells were fixed and stained with Oil Red O to visualize lipid accumulations by light microscopy. Magnification, $\times 200$. *P < 0.05 compared to the cells without the treatment. #P < 0.05 compared to the cells treated with DMI/insulin.

솔잎 추출물(PDL)은 초기 및 후기 지방생성 억제

지방이 축적되면서 지방전구세포가 성숙한 지방세포로 분화 되는 과정인 지방형성은 비만의 발달과 밀접한 관련이 있다 (Ando *et al.*, 2019). 지방 생성 과정은 0일부터 2일까지의 초기 단계와 3일부터 8일까지의 후기 단계로 구분되는 것으로 알려져 있다(Geum *et al.*, 2021). 3T3-L1 세포의 지방 형성 초기 및 후기

단계에 대한 PDL의 영향을 평가하기 위해, 3T3-L1 세포에 PDL 을 처리한 후 Oil Red O 염색에 의한 지질 축적과 Western blot 분석에 의한 단백질 발현을 시간에 따라 조사하였다. Fig. 3. 에서 볼 수 있듯이 D0 (초기 단계)에서의 PDL 처리는 3T3-L1 세포에서 지질축적을 완전히 감소시켰다. 또한 D2, D4, D6 (후기)에 PDL을 처리한 3T3-L1 세포에서 지질축적이 현저히 감소하였다. 또한 PDL은 3T3-L1 세포에서 지방 생성의 초기 및 후기 단계에서 CEBP α , PPAR γ 및 Perilipin-1과 같은 단백질 발현을 억제하였다(Fig. 3B). 이러한 결과를 고려할 때 PDL은 지방형성의 초기 단계뿐만 아니라 후기 단계까지 억제하는 것으로 생각된다.

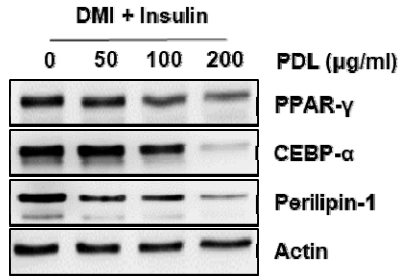


Fig. 2. The Effect of PDL on the the protein expression such as PPAR γ , CEBP α and perilipin-1 associated with adipocyte adipogenesis in 3T3-L1 cells. Cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

적 요

본 연구에서는 솔잎 추출물(PDL)의 항비만활성을 검증하기 위해, PDL이 3T3-L1에서 DMI/insulin에 의해 유도되는 과도한 지질 형성을 억제하는지 평가하였다. 본 결과를 미루어 볼 때, PDL은 지방세포의 adipogenesis과 관련된 PPAR γ , CEBP α 그리고 perilipin-1의 발현을 억제하여 과도한 지질형성을 억제하는 것으로 판단되며, PDL은 향후 비만 예방 및 치료를 위한 잠재적 소재로 활용이 가능할 것으로 판단된다. 그러나 본 연구는 PDL이 항비만 활성이 있는지 검증한 초기 단계 연구로 추가

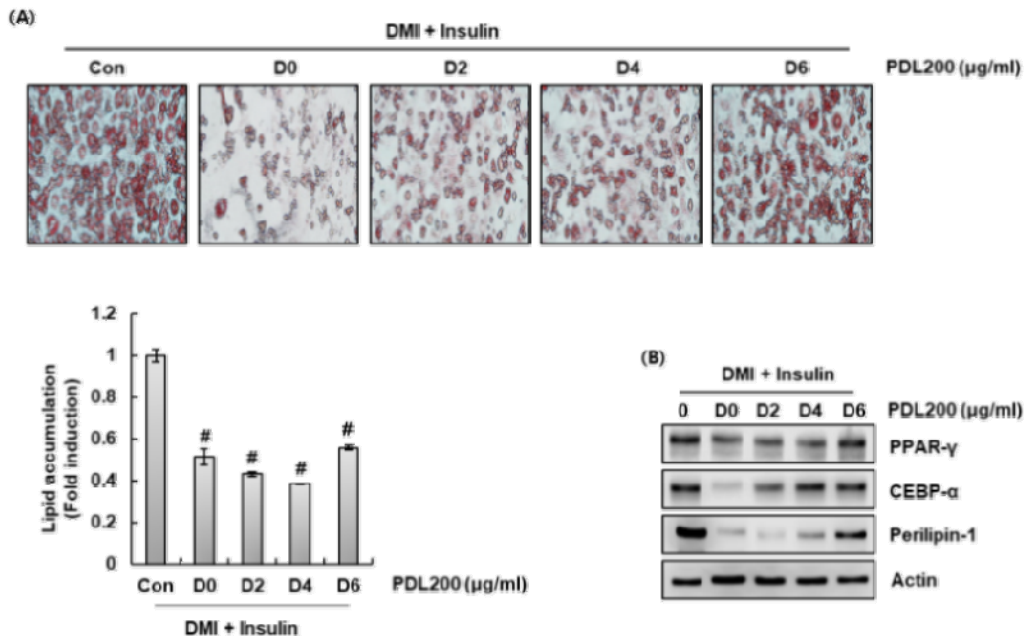


Fig. 3. Effect of PDL on the early and late adipogenesis in 3T3-L1 cells. The treated cells were recovered on D8. (A) Lipid accumulation was determined by measuring Oil Red O staining. (B) The protein levels were determined by Western blot analysis. [#]P < 0.05 compared to the cells treated with DMI/insulin. Actin was used as internal control for Western blot.

적인 기전연구와 동물기반 전임상 항비만활성 검증이 필요하다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 이공분야 중점연구소지원사업(NRF-2018R1A6A1A03024862)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ando, Y., F. Sato, H. Fukunaga, Y. Iwasaki, Y. Chiba, M. Tebakari, Y. Daigo, J. Kawashima and J. Kamei. 2019. Placental extract suppresses differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to mature adipocytes via accelerated activation of p38 MAPK during the early phase of adipogenesis. *Nutr. Metab.* 16(1): 1-13.
- Brun, R.P., J.B. Kim, E. Hu, S. Altiok and B.M. Spiegelman. 1996. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8(6):826-832.
- Chang, H.C., H.C. Yang, H.Y. Chang, C.J. Yeh, H.H. Chen, K.C. Huang and W.H. Pan. 2017. Morbid obesity in Taiwan: Prevalence, trends, associated social demographics, and life style factors. *PLoS One* 12: e0169577.
- Choi, H.Y. 2009. Antioxidant activity and quality characteristics of pine needle cookies. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 1414-1421.
- Fajas, L., J.C. Fruchart and J. Auwerx. 1998. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10(2):165-173.
- Ferris, C.D., S.R. Jaffrey, A. Sawa, M. Takahashi, S.D. Brady, R.K. Barrow, A.T. Steven, W. Herman, D.E. Barañano, S. Doré, K.D. Poss and S.H. Snyder. 1999. Heme oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat. Cell Biol.* 1(3):152-157.
- Geum, N.G., H.J. Son, J.H. Yeo, J.H. Yu, M.Y. Choi, J.W. Lee, J.K. Baek and J.B. Jeong. 2021. Anti-obesity activity of *Heracleum moellendorffii* root extracts in 3T3-L1 adipocytes. *Food Sci. Nutr.* 9(11):5939-5945.
- Gopalakrishnan, N., M. Saravanakumar, P. Madankumar, M. Thiyagu and H. Devaraj. 2014. Colocalization of β -catenin with Notch intracellular domain in colon cancer: a possible role of Notch1 signaling in activation of Cyclin D1-mediated cell proliferation. *Mol. Cell. Biochem.* 396(1):281-293.
- Inokawa, A., T. Inuzuka, T. Takahara, H. Shibata and M. Maki. 2016. Tubby-like protein superfamily member PLSCR3 functions as a negative regulator of adipogenesis in mouse 3T3-L1 preadipocytes by suppressing induction of late differentiation stage transcription factors. *Biosci. Rep.* 36(1):e00287.
- Ji, H.H., H.Y. Jeong, S. Jin, H.J. Kwon and B.W. Kim. 2012. Inhibition of adipocyte differentiation by methanol extracts of *Oenanthe javanica* seed in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Life Sci.* 22(12):1688-1696.
- Kim, D.H., S.J. Kim, S.I. Jeong, C.J. Cheon and S.Y. Kim. 2014. Antiadipogenic effects of red radish (*Raphanus sativus* L.) sprout extract in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Life Sci.* 24(11):1224-1230.
- Kim, E.A., J.H. Yang, E.H. Byeon, W. Kim, D. Kang, J. Han, S.G. Hong, D.R. Kim, S.J. Park, J.W. Huh, H. Cheong, S.P. Yun and D.K. Lee. 2021. Anti-Obesity effect of pine needle extract on high-fat diet-induced obese mice. *Plants* 10(5):837.
- Lee, J.E. and M.S. Oh. 2008. Quality characteristics of seasoned sauce and seasoned pork rib with added pine needle powder during storage. *Korean. J. Food. Cook Sci.* 23(5):629-638.
- Lee, M. and S.H. Sung. 2016. Platyphylloside isolated from *Betula platyphylla* inhibit adipocyte differentiation and induce lipolysis via regulating adipokines including PPAR γ in 3T3-L1 cells. *Pharmacogn. Mag.* 12(48):276.
- Li, M., D.H. Kim, P.L. Tsenovoy, S.J. Peterson, R. Rezzani, L.F. Rodella, W.S. Aronow, S. Ikehara and N.G. Abraham. 2008. Treatment of obese diabetic mice with a heme oxygenase inducer reduces visceral and subcutaneous adiposity, increases adiponectin levels, and improves insulin sensitivity and glucose tolerance. *Diabetes* 57(6):1526-1535.
- Park, J.H. and D.W. Kim. 2006. A study on the short term effect of *Rossa rugosae* Radix on proliferation, differentiation & maturation of 3T3-L1 preadipocyte. *Herb. Formula Sci.* 14(2):86-96.
- Tontonoz, P., E. Hu and B.M. Spiegelman. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79(7):1147-1156.
- Yu, J.H., N.G. Geum, J.H. Yeo and J.B. Jeong. 2021. Immunoenhancing and anti-obesity effect of *Abelmoschus manihot* root extracts. *Korean J. Plant Res.* 34(5):411-419.
- Yu, W., K.E. Rohli, S. Yang and P. Jia. 2021. Impact of obesity on COVID-19 patients. *J. Diabetes Complicat.* 35(3):107817.

(Received 11 February 2022 ; Revised 8 March 2022 ; Accepted 8 March 2022)