

Inhibition of Adipocyte Differentiation by Methanol Extract of *Zanthoxylum schinifolium* Leaves Through Inhibition of Reactive Oxygen Species Generation and Inactivation of Phosphatidylinositide 3-kinase Signaling Pathway

Eun Ok Choi¹, Hye-Jin Hwang^{1,2} and Yung Hyun Choi^{2,3*}

¹Department of Food and Nutrition, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

²Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

³Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

Received September 19, 2024 / Revised October 8, 2024 / Accepted October 13, 2024

Zanthoxylum schinifolium Siebold et Zuccarini, which belongs to the Rutaceae family, has been widely used as a spice and medicinal herb in East Asian countries, such as Korea, China, and Japan. In this study, we investigated the anti-obesity mechanism of the methanol extract from the leaves of *Z. schinifolium* (MEZS). Using the 3T3-L1 pre-adipocyte model, our findings showed that MEZS significantly inhibited adipocyte differentiation and fat formation induced by adipocyte differentiation inducer in a dose-dependent manner. MEZS' anti-obesity effects could be attributed to their ability to block the expression of adipogenic transcription factors, including peroxisome proliferator-activated receptor γ , CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), and C/EBP β , and adipocyte-specific genes, such as adipocyte-specific lipid binding protein, leptin, and fatty acid synthase. MEZS also attenuated the activation of the phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway, and when the PI3K/Akt pathway was artificially blocked, the inhibitory effect of MEZS on adipocyte differentiation and fat formation was further enhanced. Furthermore, MEZS blocked the generation of reactive oxygen species in differentiated adipocytes, which was associated with the activation of the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) and induction of Nrf2 downstream proteins, such as heme oxygenase 1 and NAD(P)H quinone oxidoreductase 1. Although analysis of the physiologically active substances contained in MEZS and validation in animal models are required, the results of this study suggest that the extract of *Z. schinifolium* leaves has excellent potential as a food or pharmaceutical material with anti-obesity effects.

Key words : Adipogenesis, Nrf2, PI3K/Akt, ROS, *Zanthoxylum schinifolium*

서 론

비만은 최근 당뇨병, 고지혈증, 심혈관 질환 등 다양한 대사질환의 결정적인 위험인자로 작용하기 때문에 현대 사회의 가장 시급한 의료 이슈 중 하나로 인식되고 있다 [6, 35]. 비만을 극복하기 위해 에너지 소모 증가, 전구지방 세포(pre-adipocytes)의 분화(adipogenesis) 및 지방 생성의 억제, 그리고 지방 분해 및 지방 산화 자극을 포함한 다양한 전략이 제안되고 있다. 이러한 전략 중 지방세포 분화를 억제하여 지방세포 생성을 제어하는 것은 비만 치료에

가장 유효한 접근 방식이다[7, 47]. 지방세포의 형성은 미분화된 전구지방세포에서 성숙한 지방세포(mature adipocyte)로 증식 및 분화하는 과정으로, 분화 초기에는 CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)와 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)를 포함한 지방세포 생성 전사 인자(adipogenic transcription factor)에 의해 엄격하게 조절되며 이 유전자들의 활성화는 지방 조직에서 지방세포의 수와 지질 저장 용량을 결정하는 데 핵심적으로 관여한다[9, 24]. 또한, 지방세포가 형성되면 백색 지방세포(white adipocyte)에서 보이는 triglyceride 축적이 증가하며, 지방세포로의 성숙에는 adipocyte-specific lipid binding protein (aP2), leptin, fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase 및 hormone sensitive lipase와 같은 지방세포 특이적 유전자(adipocyte-specific gene)의 발현 증가가 요구된다 [16, 17, 37]. 아울러 phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K)/Akt와 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)를 포함한 세포 내 주요 신호계 또한 지방세포 생성 전사 인자의 활

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-890-3333

E-mail : choiyh@deu.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.

성 조절에 관여하는데, PI3K/Akt 신호계와 MAPKs 구성 인자 중에서 extracellular signal regulated kinase (ERK) 경로의 불활성화는 지방 생성의 억제와 관련이 있다[2, 5]. 반면, 비만 환자의 지방 축적은 산화 스트레스로 유래된 reactive oxygen species (ROS)의 증가를 동반하며, ROS의 축적은 지방세포의 생성 초기 단계에서 지방세포 분화를 자극하고 후기 단계에서 성숙을 촉진한다[14, 31]. 또한 ROS의 축적은 근육과 지방에서 포도당 흡수를 차단하고 췌장 세포에서 인슐린의 방출을 억제하여 당뇨병 환자에게 심각한 위험 요소로 작용할 수 있다[11, 19]. 따라서 PI3K/Akt 또는 MAPKs 신호계의 조절과 ROS 생성의 차단은 지방세포 생성을 억제하는 치료적 접근법이 될 수 있다. 전구지방세포에서 산화 스트레스 유발 기전은 다양하지만, 최근 산화 스트레스 차단을 위한 표적으로 항산화 전사 인자인 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)의 역할에 관한 연구가 증가하고 있다[4, 44]. 예를 들어 오미자(*Schisandra chinensis* Baill.) 열매의 한 생리활성 성분(gomisin C)은 전구지방세포에서 Nrf2 신호 전달 경로를 활성화함으로써 초기 지방 생성과 ROS 생성을 감소시켰다[48]. 그리고, 망고(*Mangifera indica* L.)의 껍질과 씨앗 추출물은 Nrf2와 그 표적인 heme oxygenase 1 (HO-1)과 manganese superoxide dismutase의 발현 증가를 통한 ROS 생성 억제하고 지방세포의 분화를 차단하였다[41, 42]. 현재 임상적 치료에 널리 사용되고 있는 항비만 약물인 orlistat는 lipase의 작용을 억제하여 섭취된 음식의 지방 흡수를 방지하지만, 위장관 장애를 유발할 수 있고[1, 46], phentermine-topiramate, liraglutide 및 semaglutide와 같은 약물들도 선천적 장애, 췌장염, 복통 유발 등과 같은 부작용을 가지고 있다[15, 33]. 따라서 최근 이러한 부작용을 극복하면서 비만 치료에 우수한 잠재력을 가지는 다양한 천연물의 효능에 관한 관심이 증대되고 있다[13, 21]. 그러나 비만의 예방 및 치료 효능에 관한 병인학적 기전의 확립이 여전히 부족하여 임상적 적용 가능성이 낮은 실정이므로 이는 시급히 해결되어야 할 문제이다.

운향과(Rutaceae family)에 속하는 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium* Siebold et Zuccarini)는 한국을 포함한 동아시아 국가에서 향신료 및 약재로 널리 사용되는 방향성 식물(aromatic plant)의 일종이다[26, 43]. 전통적으로 이 식물의 다양한 부위는 감기, 설사, 치통, 복통, 황달, 소화불량 등과 같은 병리적 증상을 치료하기 위하여 처방되어 왔다[43]. 그동안의 연구 결과에 의하면, 산초나무의 추출물 또는 생리활성 성분들은 항균[28], 항산화[22, 29], 항염증[8, 28, 38], 미백[28], 면역 증강[27], 신경세포 손상 차단[45], 항혈소판 응집[10] 및 항종양[23, 30, 39, 40] 등을 포함한 다양한 약리학적 활성이 있음을 알 수 있다. 산초나무 추출물의 비만 억제 효과에 관한 선행 연구 중, Kim 등[25]은 산초나무 종자에서 추출한 오일(seed oil)이 혈액

내 지질 수치를 개선하고, 심혈관 질환과 죽상경화를 낮추고, hormone-sensitive lipase (HSL)을 활성화하여 세포 지질을 분해한다는 것을 보여주었다. 그리고 본 연구실의 선행 결과에 의하면, 산초나무 잎의 에탄올 추출물(ethanol extract from the leaves of *Z. schinifolium*, EEZS)은 지방세포 분화에 핵심적으로 관여하는 전사 인자들의 발현 억제를 통하여 지방세포의 분화와 세포 내 지질 축적을 억제하였으며 이는 ERK 및 PI3K/Akt 신호계의 활성 억제와 연관성이 있었다[12]. 또 다른 선행 연구에 의하면, 인간 방광암 세포에서 EEZS의 항암 활성은 ROS 생성 의존적 PI3K/Akt 신호 전달 경로의 비활성화가 관여하였다[12]. 이는 정상 세포에서 산초나무 추출물이 ROS의 생성을 차단하여 항산화 활성을 감소시키는 것[8, 29]과는 달리, 암세포에서는 산화 스트레스를 유도하여 세포사멸을 유도하였음을 보여주는 결과이다. 그러나 산초나무 추출물에 의한 비만 억제 효능에 산화 스트레스 억제 효능과 PI3K/Akt와 같은 세포 내 신호계가 어떤 역할을 하는지에 관한 자세히 연구는 현재까지 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 산초나무 추출물의 항비만 활성에 대한 추가적인 작용 기전 연구를 위하여 산초나무 잎의 메탄올 추출물(methanol extract from the leaves of *Z. schinifolium*, MEZS)에 의한 비만 세포 분화 억제 과정을 PI3K/Akt 신호계와 ROS의 역할을 중심으로 조사하였다. 이를 위하여 지방세포 분화 모델로 가장 널리 사용되는 3T3-L1 지방전구세포(pre-adipocytes)를 사용하였으며, 지방세포로의 분화를 유도하기 위하여 insulin, dexamethasone 및 isobutylmethylxanthine (IMBX) 등이 함유된 분화 유도제(MDI)를 사용하였다.

재료 및 방법

MEZS의 제조 및 처리

본 연구에 사용된 산초나무 잎은 (주)대한생약(Imsil, Korea)에서 구입하였으며, MEZS를 제조하기 위하여 건조된 잎을 잘게 잘라 분쇄 후 80 g을 1,500 mL 100% 메탄올에 48시간 동안 침지시켰다. 이어서, 추출물을 여과지(Whatman No. 4, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)를 이용하여 이물질을 제거한 후, 회전 증발기(N-1000S-W, EYELA, Bohemia, NY, USA)로 농축하고, 동결 건조하여 분말(MEZS)을 얻었으며, 실험에 사용하기 전까지 -80°C 에서 보관하였다. 세포에 처리하기 위하여 MEZS를 dimethyl sulfoxide (DMSO; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에 용해하여 stock 용액(200 mg/mL)을 제조하였고, 배양 배지로 적절한 농도로 희석한 후 세포에 처리하였다.

세포 배양 및 지방세포 분화 유도

3T3-L1 지방전구세포는 American Type Culture Collec-

tion (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS; WelGENE, Gyeongsan, Korea)과 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; WelGENE)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 분화시키기 위해서는 선행 방법에 준하여[12], 배지를 adipogenic hormonal cocktail (MDI, Sigma-Aldrich)이 포함된 DMEM을 이틀간 교체하면서 8일간 배양하였다.

세포 생존율 분석

MEZS가 3T3-L1 지방전구세포에 미치는 세포독성 여부를 조사하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석을 실시하였다. 이를 위하여 MEZS가 있거나 없는 배지에서 72시간 배양된 세포를 모아 0.5 mg/ml의 MTT 용액 (Sigma-Aldrich)에 상온에서 30분간 반응시켰다. 이어서 형성된 formazan을 DMSO에 녹인 후, microplate reader (Dynatech Laboratories, Chantilly VA, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 대조군 대비 상대 비율로 세포 생존율을 평가하였다.

Oil red-O 염색

지방세포 내 축적된 지질의 확인과 양을 정량적으로 평가하기 위하여 oil red-O 용액을 실시하였다. 이를 위하여 MEZS가 있거나 없는 조건에서 MDI가 함유된 배지에서 8일간 분화된 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 수세 후, 10% formalin (Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)으로 고정시켰다. 세포의 형태를 위상차 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰 후, 고정된 세포를 건조시키고 상온에서 oil red-O 용액(0.35% oil red-O in 100% aqueous 2-isopropanol; Thermo Fisher Scientific)으로 지질 방울을 염색하였다. 20분 후, oil red-O 용액을 제거하고 PBS 및 60% isopropanol (Sigma-Aldrich)로 세척하고 위상차 현미경으로 염색 정도를 관찰하였다. 세포 내 형성된 지질을 정량하기 위해 염색된 지질 방울을 4% Nonidet P-40 (NP-40, Sigma-Aldrich)이 포함된 isopropanol에 용해시키고 microplate reader를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 분리 및 Western blot 분석

단백질 발현 분석을 위하여 세포를 PBS로 세척한 다음, 40 mM Tris (pH 8.0), 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2 µg/ml leupeptin, 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich)를 함유한 용해 완충액에서 20분 동안 세포를 용해시켰다. 상층액을 모아 Bio-Rad 단백질 분석 키트(Bio-Rad Laboratories, Inc., Her-

cules, CA, USA)를 사용하여 단백질 농도를 측정 후, sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc.)와 혼합하여 95°C에서 5분간 변성시켰다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel에서 분리하고 nitrocellulose membrane (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)으로 옮겼다. 그 후, membrane을 5% non-fat milk 용액으로 차단하고 4°C에서 검출 대상 단백질의 1차 항체로 12시간 반응시키고, 실온에서 2차 항체로 1시간 더 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Life Sciences)으로 단백질의 발현 정도를 분석하였다. 본 연구에 사용된 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였고, horseradish peroxidase-conjugated immunoglobulin G는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.에서 구입하였다.

ROS 생성의 분석

MEZS가 있거나 없는 조건에서 분화가 유도된 3T3-L1 세포에서 생성된 ROS의 양을 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA)를 사용하였다. 이를 위하여 세포를 10 µM의 DCF-DA 용액(Sigma-Aldrich)에 20분간 반응시키고, ROS가 존재할 때 변화되는 형광성 DCF에 양성 반응을 나타내는 세포의 빈도를 유세포 분석기(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 아울러 동일한 조건에서 DCF-DA에 염색된 세포의 형광 강도를 형광 현미경(Carl Zeiss) 하에서 관찰하였다.

통계 분석

통계 분석에 의한 결과는 평균 ± 표준 편차(standard deviation, SD)로 제시하였다. 그룹 간 비교는 분산 분석을 사용하여 이루어졌으며, 그룹 간의 유의성은 Duncan의 다중 범위 검정을 사용하여 분석하였다. 통계 분석은 SPSS 버전 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행하였으며, $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

MEZS에 의한 3T3-L1 세포의 지방세포 분화 및 지방 생성 억제

MEZS가 비만세포 분화 과정을 억제할 수 있는지를 조사하기 위한 조건의 설정을 위하여 MEZS가 미분화된 3T3-L1 세포의 생존율에 미치는 먼저 영향을 조사하였다. 이를 위하여 다양한 농도의 MEZS가 함유된 배지에서 배양된 세포를 대상으로 MTT 분석을 통하여 세포 생존력을 평가하였다. Fig. 1A의 결과에 의하면, 500 µg/ml 이하의 MEZS가 함유된 배지에서 배양된 3T3-L1 세포에서 세포

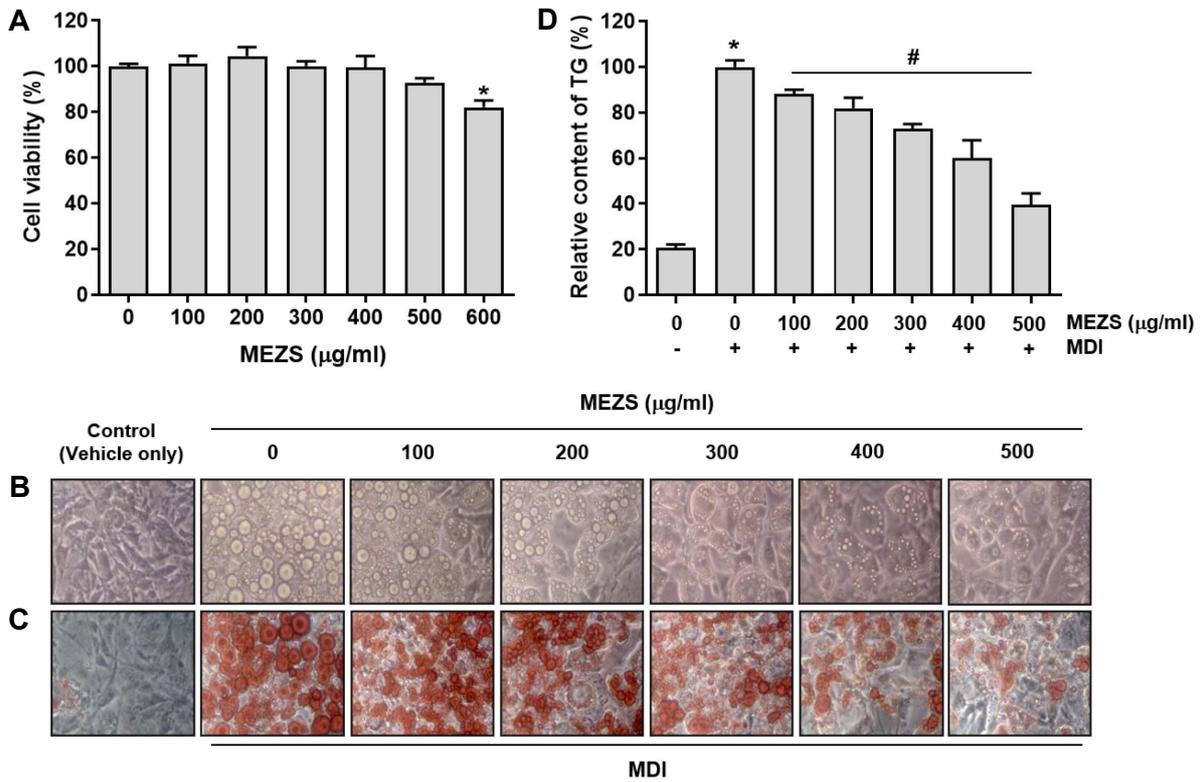


Fig. 1. MEZS suppresses adipogenesis and lipid content in 3T3-L1 adipocytes. (A) 3T3-L1 cells were cultured in media containing various concentrations of MEZS for 72 hr, and cell viability was measured using the MTT assay. (B and C) Differentiation of confluent 3T3-L1 cells was initiated using MDI and maintained in DMEM medium, containing 10% FBS in the absence or presence of different concentrations of MEZS. After culturing for 8 days, cells were observed for morphology under a phase contrast microscope (B), and fixed and stained with oil red-O, and the formation of lipid droplets was visualized under a phase contrast microscope (C). (D) The triglyceride contents of cells were determined by oil red-O staining following treatment in the absence or presence of different concentrations of MEZS. Subsequent to dissolving the triglyceride in isopropanol, the triglyceride contents were measured at 500 nm using a microplate reader. The data are expressed as the mean ± SD of three independent experiments (* $p < 0.05$, vs. undifferentiated control; # $p < 0.05$, vs. differentiated control).

생존율은 대조군 대비 유의적인 억제 효과가 관찰되지 않았지만, 600 µg/ml의 MEZS가 처리된 조건에서 배양된 세포에서는 유의적인 세포 생존율 감소 현상이 나타났다. 따라서 MEZS가 3T3-L1 세포에서 분화 및 지방 생성을 억제하는지를 평가하기 위한 MEZS의 농도는 500 µg/ml 이하로 설정하였다.

미분화된 섬유아세포와 유사한 지방전구세포에서 지방세포의 분화 과정은 지질 축적에 의한 지질 방울의 형성이 특징이기 때문에, 이는 지방세포의 대표적인 분화의 마커로 사용된다[9, 21]. 3T3-L1 지방전구세포는 MDI가 처리된 조건에서 전형적인 지방세포로 분화되기 때문에 지방형성 관련 연구에 가장 광범위하게 사용되는 모델이다[18, 36]. 본 연구에서도 잘 확립된 이 모델을 사용하였으며, MDI를 이용한 선행 방법에 준하여 3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 분화시키면서, 이 과정을 MEZS가 억제할 수 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 3T3-L1

세포를 MDI가 있는 상태에서 다양한 농도의 MEZS 또는 MDI만 단독 처리하여 8일 동안 배양하였다. Fig. 1B 및 C에 나타난 3T3-L1 세포의 형태 변화에서 알 수 있듯이, 대조군 세포에 비하여 MDI 처리로 분화가 유도된 세포에서 지질 방울(lipid droplet)의 과도한 축적을 볼 수 있었으며, oil red-O 염색을 통하여 분화된 지방세포에서 triglyceride의 함량 매우 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 1C 및 1D). 그러나 MEZS의 처리 농도가 증가할수록 세포 내 지질 방울의 형성과 triglyceride 함량이 처리 농도 의존적으로 현저하게 감소하였다. 이러한 결과는 MEZS가 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제하였음을 의미하며, 이는 MEZS의 세포독성에 의한 것은 아니었음을 알 수 있다.

3T3-L1 세포에서 지방세포 분화 및 지방형성 조절 인자의 발현과 PI3K/Akt 신호의 활성화에 미치는 MEZS의 영향

잘 알려진 바와 같이, 지방세포 분화는 지방세포 생성 전사 인자와 지방세포 특이 유전자의 발현 증가를 동반한다. 그중, C/EBP와 PPAR γ 과 같은 전사 인자는 지방세포 분화 및 지질 저장, 그리고 지방세포의 표현형을 생성하거나 유지하는 데 관련된 유전자의 활성을 위한 핵심 조절자로서 작용한다. 특히, 지방세포의 분화 동안 PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현 수준을 매개하는 것으로 알려진 C/EBP β 는 지방전구세포가 분화 배지에 노출된 후 유도되는 첫 번째 전사 인자로서 분화 과정의 개시에 필수적이다[9, 24]. 따라서 MEZS에 의한 지방세포 분화의 억제에 이들의 발현 변화가 관여하는지를 조사하였다. Fig. 2A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, 예상대로 MDI에 의한 분화가 유도된 3T3-L1 세포에서 이들 단백질의 발현은 매우 증가되었다. 그리고 지방세포 분화의 최종 단계에서 지질 대사에 관여하는 aP2, leptin 및 FAS의 발현[16, 17, 37] 또한 MDI에 의해 분화가 완전히 이루어진 세포에서 높게 발현되었다. 그러나 MEZS가 존재하는 조건에서 MEZS 농도 의존적으로 이들의 발현 수준은 점차 감소되었고, 이러한 변화는 지방세포의 분화 및 지방세포 생성의 억제에 직접 기여하였음을 알 수 있다.

세포 내 신호계 중에서 ERK와 함께 PI3K/Akt 경로의 활성화는 지방세포 분화의 상위 조절자로서 지방세포 형성에 필수적으로 관여한다. 많은 선행 연구에서 이들이 활성화되면 지방세포 형성 초기에 PPAR γ 와 C/EBP의 발현 수준을 조절하는 인자들이 활성화되어 지방세포의 분화 유도가 촉진된다는 것이 입증되었으며, 반면에 이들 경로의 억제는 지방세포 형성을 억제하였다[2, 5]. 따라서 본 연구에서는 PPAR γ 와 C/EBP의 상류 신호 전달 경로에 미치는 MEZS의 영향을 평가하기 위해 PI3K/Akt 경로의 활성 변화를 조사하였다. 이를 위하여 3T3-L1 세포를 MEZS가 있거나 없는 상태에서 MDI와 배양하여 시간의 경과에 따른 PI3K와 Akt의 발현 변화를 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면, MDI에 노출된 3T3-L1 세포에서 MDI 처리 시간의 증가에 따라 PI3K와 Akt의 하류 인자인 Akt의 전체 단백질 발현에는 큰 변화가 없었지만, 그들의 인산화(p-PI3K 및 p-Akt)는 MDI 처리 초기에 증가하였다. 이는 MDI에 의한 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화에 PI3K/Akt 경로의 활성화가 관여하고 있음을 의미한다 (Fig. 2B). 그러나 MEZS는 처리 시간 의존적 방식으로 그들의 인산화를 억제하였다.

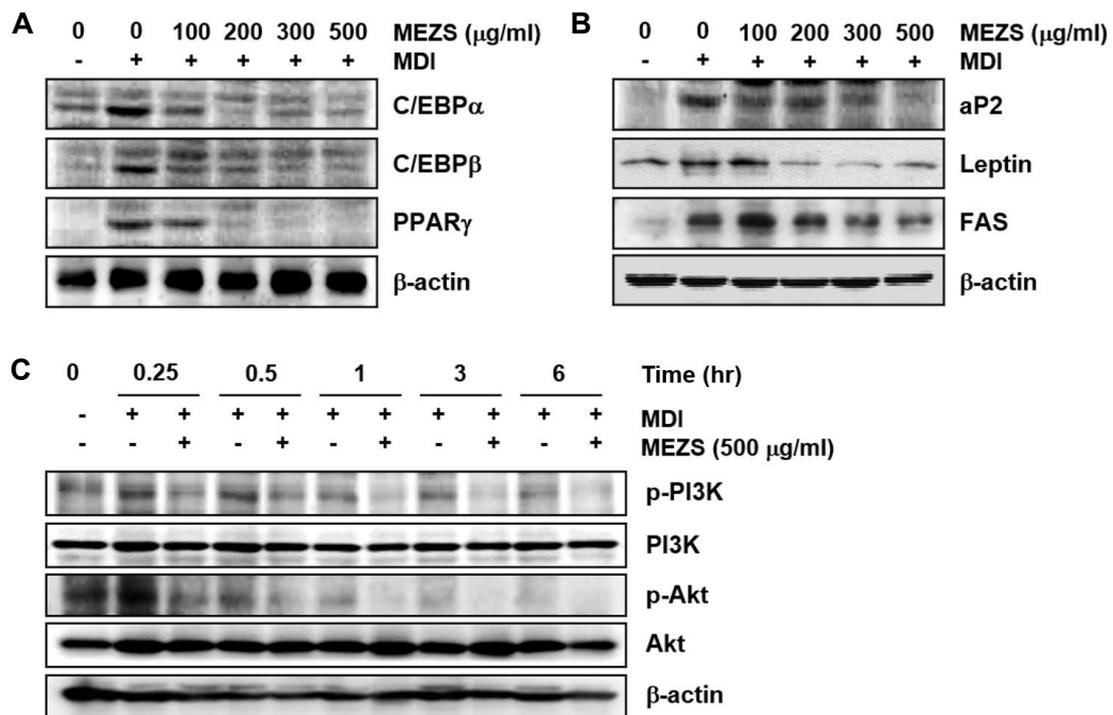


Fig. 2. Effects of MEZS on protein expression levels of adipogenic transcription factors and adipocyte-specific proteins in differentiated 3T3-L1 cells and on phosphorylation of PI3K and Akt in the early stage of differentiation. (A and B) The post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or presence of different concentrations of MEZS for 8 days following initiation with MDI. (C) 3T3-L1 cells were treated with MDI in the presence or absence of 500 μg/ml MEZS for the indicated times. (A-C) The protein expressions of adipogenic transcription factors, adipocyte-specific proteins and PI3K/Akt signaling pathway were analyzed with Western blotting. Equal loading of proteins was verified by immunoblotting for β -actin

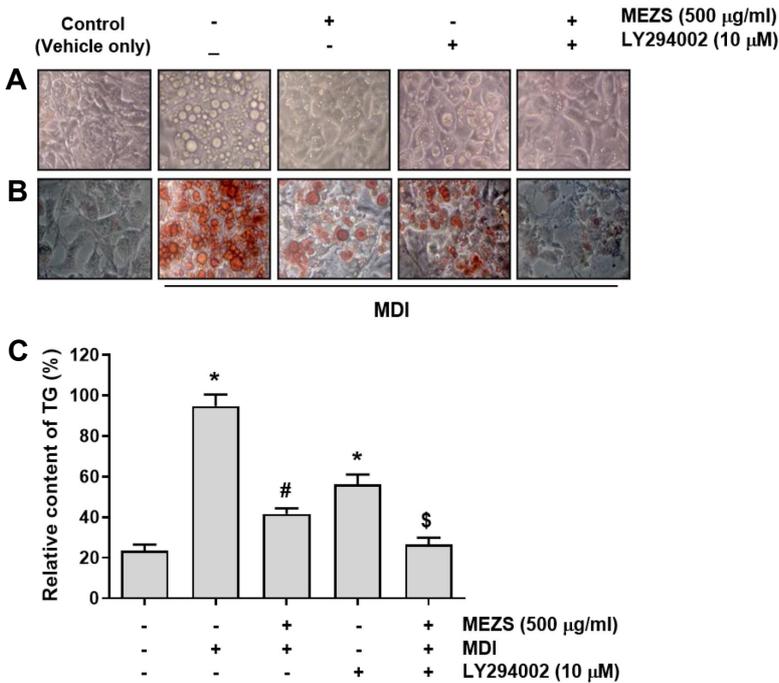


Fig. 3. Role of PI3K/Akt signaling in MEZS-induced reduction of lipid content in 3T3-L1 adipocytes. Differentiation of confluent 3T3-L1 cells was initiated using MDI and maintained in DMEM medium, containing 10% FBS in the absence or presence of 500 µg/ml MEZS and 10 µM LY294002. (A and B) After culturing for 8 days, cells were observed for morphology under a phase contrast microscope (A), and fixed and stained with oil red-O, and the formation of lipid droplets was visualized under a phase contrast microscope (B). (C) The triglyceride contents of cells were determined by oil red-O staining. The data are expressed as the mean ± SD of three independent experiments (**p*<0.05, vs. undifferentiated control; #*p*<0.05, vs. differentiated control).

다음은 MEZS에 의하여 비활성화된 PI3K/Akt 경로가 지방세포로의 분화 억제에 직접 관여하였는지를 조사하였다. 이를 위하여 3T3-L1 세포에 MEZS가 있거나 없는 상태에서 MDI를 처리하기 1시간 전에 PI3K 특이적 억제제인 LY294002를 처리한 후, 지방세포로의 분화 유도가 억제되는지를 관찰하였다. Fig. 3의 결과에서 알 수 있듯이, MDI에 의하여 유도된 지질 방울의 형성과 triglyceride의 함량이 LY294002 단독 처리군에 의해서도 다소 억제되었지만, MEZS와 동시에 처리된 세포에서는 더욱 억제되었다. 이러한 결과는 MEZS에 의한 지방세포 분화 억제가 PI3K/Akt 신호 전달 경로의 비활성화와 직접적인 관련이 있음을 의미하며, 이 신호 경로가 MEZS에 의한 항비만 효능을 위한 지방형성 전사 인자 조절의 상류 인자로서 작용할 가능성이 높음을 시사한다.

분화된 3T3-L1 세포에서 ROS 생성과 Nrf2 신호계에 미치는 MEZS의 영향

한편, 산화 스트레스를 유도하는 과도한 ROS의 생성은 지방의 축적 또는 비만 및 당뇨병을 포함한 대사 장애 유발의 조건에 밀접하게 관련된 것으로 알려져 있다[14, 31]. 특히, 지방전구세포에서 지방세포로 분화하는 동안 ROS는 PPAR γ 의 활성을 증가시키고 분화의 초기 단계를 자극하는 것으로 보고된 바 있다[20, 32]. 이러한 ROS 축적은 지방세포의 분화 동안 미토콘드리아 생합성 및 대사 활성의 증가와 관련이 있는 것으로 보인다[3, 34]. 따라서 본 연구에서는 MEZS에 의한 지방세포 분화 억제가 ROS 생성 조절과 관련성이 있는지를 확인하기 위해 세포 내

ROS 수준을 DCF-DA를 사용하여 분석하였다. 유세포 분석 결과에 의하면, 미분화된 세포에 비해 분화된 3T3-L1 세포에서 ROS 생성의 증가를 의미하는 DCF 양성 반응 세포의 빈도가 크게 상승하였으며(Fig. 4A 및 B), 형광 현미경 분석에서도 ROS 생성 지표인 녹색 형광이 강하게 발현되었다(Fig. 4C). 이는 ROS의 생성이 지방세포의 분화에 따라 증가하였음을 나타낸다. 그러나 증가한 ROS는 MEZS 처리 농도 의존적으로 감소되었으며, 이는 MEZS가 지방세포 분화 과정에서 항산화 분자의 조절을 통해 ROS 생성을 억제하는 데 관여하였음을 의미한다.

이어서 MEZS에 의한 ROS 생성은 차단이 Nrf2 신호계의 활성화와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 Nrf2 신호계와 연관된 인자들의 발현 변화를 조사하였다. 잘 알려진 바와 같이, 세포 항산화 반응의 주요 조절자인 Nrf2는 생리적인 조건에서 Nrf2의 억제제인 kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)과 비활성 복합체를 형성하며 ubiquitin-proteasome 시스템에 의하여 분해된다[4, 44]. 그러나 산화 스트레스 조건이나 Nrf2 활성화제가 존재하는 경우, Nrf2는 Keap1과 분리되고 Keap1의 분해 증가가 동반된다. 이어서 Nrf2는 핵으로 이동하여 전사 인자로서 하류 유전자들의 전사활성을 촉진시키지만, 핵으로 전이되기 위해서는 인산화가 이루어져야 한다[4, 44]. 본 연구의 결과에 의하면, MDI가 단독 처리되어 분화된 3T3-L1 세포에서는 Nrf2의 발현이 다소 증가하였지만, Nrf2가 활성화되었음을 의미하는 인산화된 Nrf2 (p-Nrf2)의 발현은 미분화된 3T3-L1 세포와 비교하여 유의적인 차이점이 없었다. 그리고 Keap1의 발현과 대표적인 Nrf2 하류 항산화 효소인

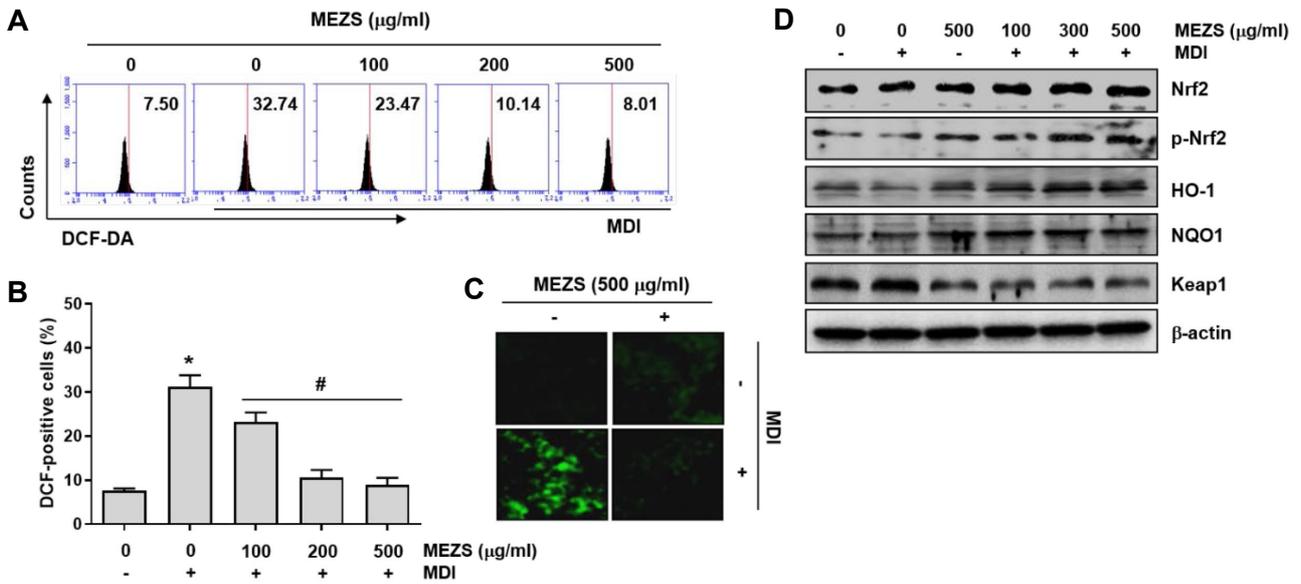


Fig. 4. Effect of MEZS on ROS production and Nrf2 signaling pathway during the adipogenesis of 3T3-L1 cells. (A) Cells were stained with DCF-DA and ROS levels were measured *via* flow cytometry. (B) The frequency of DCF-positive cells in each treatment group was represented as a bar graph. The data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments ($*p < 0.05$, vs. undifferentiated control; $#p < 0.05$, vs. differentiated control). (C) Representative fluorescence images showing ROS production through fluorescence microscopy observation were presented. (D) The protein expressions of Nrf2 signaling pathway were analyzed with Western blotting. Equal loading of proteins was verified by immunoblotting for β -actin.

HO-1과 NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1)의 발현 수준도 미분화 및 분화된 3T3-L1 세포에서 유사하였다. 그러나 MEZS 단독 처리된 미분화된 3T3-L1 세포에서 Keap1의 발현이 대조군 세포에 비하여 다소 감소되면서, Nrf2, p-Nrf2, HO-1 및 NQO1의 발현도 어느 정도 증가되었다. 반면, MEZS로 인한 MDI 유도 3T3-L1 세포의 지방

세포 분화 억제 경향성과 유사하게 MEZS의 처리 농도가 증가할수록 Nrf2와 p-Nrf2의 발현은 증가하여 MEZS가 Nrf2 활성제로 작용할 가능성이 있음을 보여주었다. 그리고 Keap1의 발현은 감소하면서, HO-1과 NQO1의 발현 또한 증가하였다. 비록 Nrf2의 상위 조절자의 탐색이 요구되지만, 이는 Keap1과의 해리에 의한 전사 인자로서 Nrf2

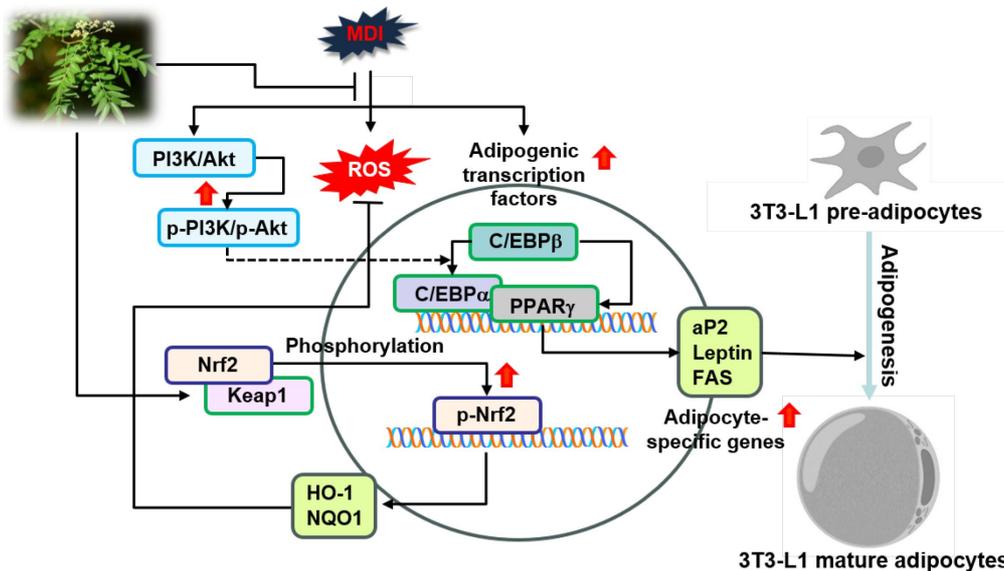


Fig. 5. Summary of the mechanisms involved in inhibition of adipogenesis and lipogenesis by MEZS in 3T3-L1 pre-adipocytes.

신호계의 활성화에 의한 결과이며, Nrf2 신호계의 활성화가 ROS의 생성 억제에 최소한 관여하였음을 시사한다.

본 연구에서는 산초나무 잎의 메탄올 추출물(MEZS)에 의한 지방세포 분화 억제 효능을 이전 연구에서 밝힌 에탄올 추출물(EEZS)에 의한 항비만 효과[12]를 토대로 수행하였다. EEZS에서 나타난 결과와 유사하게, MEZS에 의한 지방세포 분화 차단은 지방세포 생성 전사 인자의 발현 억제와 연관성이 있었으며, 추가로 aP2, leptin 및 FAS와 같은 지방세포 특이적 유전자 발현을 MEZS가 감소시켜 지방세포 분화의 최종 단계와 지방의 형성을 억제하였음을 밝혔다. 이들의 발현은 아마도 EEZS에 의해서도 억제될 수 있을 것이다. 또한 PI3K/Akt 신호계의 불활성도 EEZS 처리에 의해 유도되었지만, MEZS 처리에 의한 이 신호계의 억제가 지방세포 분화와 지방형성을 직접적으로 억제하였음을 제시하였다. 아울러, 본 연구에서는 지방세포 분화 과정에서 산화 스트레스가 유도되었지만, MEZS가 이를 감소시켰음을 제시하였고, MEZS의 항산화 활성이 Nrf2 신호계의 활성화와 연관되었음을 제시하였다 (Fig. 5). 그러나 지방세포가 분화된 산화적 조건에서는 왜 Nrf2가 비활성 상태로 유지되었는지, 그리고, MEZS에 의해 활성화된 Nrf2에 의하여 증가된 항산화 효소인 HO-1과 NQO1이 ROS 소거 작용과 미토콘드리아 항상성 변화가 어떤 역할을 하였는지는 추가로 밝혀야 할 부분이다. 나아가 MEZS에 함유된 생리활성 물질의 탐색과 동물 모델에서 산초나무 추출물의 항비만 활성도 추후 검증되어야 할 것이다. 본 연구의 결과는 이러한 추가 연구를 위한 선행 자료로 활용될 것이며, 이를 통하여 항비만 식·의약 소재로서 산초나무 유효성분의 활용 가능성에 대한 근거 도출이 이루어질 것이다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 “지역혁신클러스터육성(R&D, P0025875)”사업의 지원을 받아 수행된 연구 결과임.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Aaseth, J., Ellefsen, S., Alehagen, U., Sundfjør, T. M., and Alexander, J. 2021. Diets and drugs for weight loss and health in obesity—An update. *Biomed. Pharmacother.* **140**, 111789.
- Acosta-Martinez, M. and Cabail, M. Z. 2022. The PI3K/Akt pathway in meta-inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 15330.
- Ahmed, B., Sultana, R. and Greene, M. W. 2021. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed. Pharmacother.* **137**, 111315.
- Annie-Mathew, A. S., Prem-Santhosh, S., Jayasuriya, R., Ganesh, G., Ramkumar, K. M. and Sarada, D. V. L. 2021. The pivotal role of Nrf2 activators in adipocyte biology. *Pharmacol. Res.* **173**, 105853.
- Aubert, J., Belmonte, N. and Dani, C. 1999. Role of pathways for signal transducers and activators of transcription, and mitogen-activated protein kinase in adipocyte differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 538-542.
- Blüher, M., Aras, M., Aronne, L. J., Batterham, R. L., Giorgino, F., Ji, L., Pietiläinen, K. H., Schnell, O., Tonchevska, E. and Wilding, J. P. H. 2023. New insights into the treatment of obesity. *Diabetes Obes. Metab.* **25**, 2058-2072.
- Boychenko, S., Egorova, V. S., Brovin, A. and Egorov, A. D. 2024. White-to-beige and back: Adipocyte conversion and transcriptional reprogramming. *Pharmaceuticals (Basel)* **17**, 790.
- Cao, L. H., Lee, Y. J., Kang, D. G., Kim, J. S. and Lee, H. S. 2009. Effect of *Zanthoxylum schinifolium* on TNF- α -induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Vascul. Pharmacol.* **50**, 200-207.
- Carobbio, S., Rosen, B. and Vidal-Puig, A. 2013. Adipogenesis: New insights into brown adipose tissue differentiation. *J. Mol. Endocrinol.* **51**, T75-T85.
- Chen, I. S., Lin, Y. C., Tsai, I. L., Teng, C. M., Ko, F. N., Ishikawa, T. and Ishii, H. 1995. Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry* **39**, 1091-1097.
- Chen, J., Wang, Q., Li, R., Li, Z., Jiang, Q., Yan, F. and Ye, J. 2023. The role of sirtuins in the regulation of oxidative stress during the progress and therapy of type 2 diabetes mellitus. *Life Sci.* **333**, 122187.
- Choi, E. O., Park, C., Shin, S. S., Cho, E. J., Kim, B. W., Hwang, J. A., Hwang, H. J. and Choi, Y. H. 2015. *Zanthoxylum schinifolium* leaf ethanol extract inhibits adipocyte differentiation through inactivation of the extracellular signal regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways in 3T3-L1 pre-adipocytes. *Mol. Med. Rep.* **12**, 1314-1320.
- Chung, S., Park, S. H., Park, J. H. and Hwang, J. T. 2021. Anti-obesity effects of medicinal plants from Asian countries and related molecular mechanisms: A review. *Rev. Cardiovasc. Med.* **22**, 1279-1293.
- de Villiers, D., Potgieter, M., Ambele, M. A., Adam, L., Durandt, C. and Pepper, M. S. 2018. The role of reactive oxygen species in adipogenic differentiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1083**, 125-144.
- Elmaleh-Sachs, A., Schwartz, J. L., Bramante, C. T., Nicklas, J. M., Gudzone, K. A. and Jay, M. 2023. Obesity management in adults: A review. *JAMA* **330**, 2000-2015.
- Engin, A. 2017. Fat cell and fatty acid turnover in obesity.

- Adv. Exp. Med. Biol.* **960**, 135-160.
17. Günenc, A. N., Graf, B., Stark, H. and Chari, A. 2022. Fatty acid synthase: Structure, function, and regulation. *Subcell. Biochem.* **99**, 1-33.
 18. Guru, A., Issac, P. K., Velayutham, M., Saraswathi, N. T., Arshad, A. and Arockiaraj, J. 2021. Molecular mechanism of down-regulating adipogenic transcription factors in 3T3-L1 adipocyte cells by bioactive anti-adipogenic compounds. *Mol. Biol. Rep.* **48**, 743-761.
 19. Holendová, B., Benáková, Š., Křivonosková, M. and Plecítá-Hlavatá, L. 2024. Redox status as a key driver of healthy pancreatic β -cells. *Physiol. Res.* **73**, S139-S152.
 20. Ikeda, N., Ishii, M., Miyata, H., Nishi, Y., Suehiro, F., Komabashiri, N., Sakurai, T. and Nishimura, M. 2023. Role of reactive oxygen species (ROS) in the regulation of adipogenic differentiation of human maxillary/mandibular bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol. Biol. Rep.* **50**, 5733-5745.
 21. Jiang, X., Wang, H., Nie, K., Gao, Y., Chen, S., Tang, Y., Wang, Z., Su, H. and Dong, H. 2024. Targeting lipid droplets and lipid droplet-associated proteins: A new perspective on natural compounds against metabolic diseases. *Chin. Med.* **19**, 120.
 22. Jo, Y. S., Huong, D. T., Bae, K., Lee, M. K. and Kim, Y. H. 2002. Monoamine oxidase inhibitory coumarin from *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Med.* **68**, 84-85.
 23. Jun, D. Y., Kim, J. S., Park, H. S., Han, C. R., Fang, Z., Woo, M. H., Rhee, I. K. and Kim, Y. H. 2007. Apoptogenic activity of auraptene of *Zanthoxylum schinifolium* toward human acute leukemia Jurkat T cells is associated with ER stress-mediated caspase-8 activation that stimulates mitochondria-dependent or -independent caspase cascade. *Carcinogenesis* **28**, 1303-1313.
 24. Kim, H. Y., Jang, H. J., Muthamil, S., Shin, U. C., Lyu, J. H., Kim, S. W., Go, Y., Park, S. H., Lee, H. G. and Park, J. H. 2024. Novel insights into regulators and functional modulators of adipogenesis. *Biomed. Pharmacother.* **177**, 117073.
 25. Kim, K. K., Kim, T. W., Kang, Y. H., Kim, D. J. and Choe, M. 2016. Lipid-lowering effects of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc. seed oil (ZSO) in hyperlipidemic rats and lipolytic effects in 3T3-L1 adipocytes. *Food Sci. Biotechnol.* **25**, 1427-1436.
 26. Kim, W. J., Yang, S., Choi, G., Park, I., Noh, P., Seo, C. S. and Moon, B. C. 2019. Development of conventional PCR and real-time PCR assays to discriminate the origins of Chinese pepper oil and herbal materials from *Zanthoxylum*. *J. Sci. Food Agric.* **99**, 2021-2029.
 27. Lee, H. Y., Park, Y. M., Lee, Y. H., Kang, Y. G., Lee, H. M., Park, D. S., Yang, H. J., Kim, M. J. and Lee, Y. R. 2018. Immunostimulatory effect of *Zanthoxylum schinifolium*-based complex oil prepared by supercritical fluid extraction in splenocytes and cyclophosphamide-induced immunosuppressed rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2018**, 8107326.
 28. Lee, S. W., Lim, J. M., Mohan, H., Seralathan, K. K., Park, Y. J., Lee, J. H. and Oh, B. T. 2020. Enhanced bioactivity of *Zanthoxylum schinifolium* fermented extract: Anti-inflammatory, anti-bacterial, and anti-melanogenic activity. *J. Biosci. Bioeng.* **129**, 638-645.
 29. Lee, Y. J., Yoon, J. J., Lee, S. M., Kim, J. S., Kang, D. G. and Lee, H. S. 2012. Inhibitory effect of *Zanthoxylum schinifolium* on vascular smooth muscle proliferation. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **34**, 354-361.
 30. Li, W., Sun, Y. N., Yan, X. T., Yang, S. Y., Kim, E. J., Kang, H. K. and Kim, Y. H. 2013. Coumarins and lignans from *Zanthoxylum schinifolium* and their anticancer activities. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 10730-10740.
 31. Liang, Y., Kaushal, D. and Wilson, R. B. 2024. Cellular senescence and extracellular vesicles in the pathogenesis and treatment of obesity – A narrative review. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 7943.
 32. Liu, G. S., Chan, E. C., Higuchi, M., Dusting, G. J. and Jiang, F. 2012. Redox mechanisms in regulation of adipocyte differentiation: beyond a general stress response. *Cells* **1**, 976-993.
 33. Lupianez-Merly, C., Dilmaghani, S., Vosoughi, K. and Camilleri, M. 2024. Review article: Pharmacologic management of obesity – Updates on approved medications, indications and risks. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **59**, 475-491.
 34. Masschelin, P. M., Cox, A. R., Chernis, N. and Hartig, S. M. 2020. The impact of oxidative stress on adipose tissue energy balance. *Front. Physiol.* **10**, 1638.
 35. Mellemkjær, A., Kjær, M. B., Haldrup, D., Grønbæk, H. and Thomsen, K. L. 2024. Management of cardiovascular risk in patients with metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Eur. J. Intern. Med.* **122**, 28-34.
 36. Molani-Gol, R. and Rafraf, M. 2024. The anti-obesity effects of resveratrol on the 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **94**, 252-263.
 37. Münzberg, H., Heymsfield, S. B., Berthoud, H. R. and Morrison, C. D. 2024. History and future of leptin: Discovery, regulation and signaling. *Metabolism* **6**, 156026.
 38. Nguyen, P. H., Zhao, B. T., Kim, O., Lee, J. H., Choi, J. S., Min, B. S. and Woo, M. H. 2016. Anti-inflammatory terpenylated coumarins from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium* with α -glucosidase inhibitory activity. *J. Nat. Med.* **70**, 276-281.
 39. Paik, S. Y., Koh, K. H., Beak, S. M., Paek, S. H. and Kim, J. A. 2005. The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 802-807.
 40. Park, C., Choi, E. O., Hwangbo, H., Lee, H., Jeong, J. W., Han, M. H., Moon, S. K., Yun, S. J., Kim, W. J., Kim, G. Y., Hwang, H. J. and Choi, Y. H. 2022. Induction of apoptotic cell death in human bladder cancer cells by ethanol extract of *Zanthoxylum schinifolium* leaf, through ROS-dependent inactivation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Nutr. Res. Pract.* **16**, 330-343.
 41. Pratelli, G., Carlisi, D., D'Anneo, A., Maggio, A., Eman-

- uele, S., Palumbo Piccionello, A., Giuliano, M., De Blasio, A., Calvaruso, G. and Lauricella, M. 2022. Bio-waste products of *Mangifera indica* L. reduce adipogenesis and exert antioxidant effects on 3T3-L1 cells. *Antioxidants (Basel)* **11**, 363.
42. Pratelli, G., Di Liberto, D., Carlisi, D., Emanuele, S., Giuliano, M., Notaro, A., De Blasio, A., Calvaruso, G., D'Anneo, A. and Lauricella, M. 2023. Hypertrophy and ER stress induced by palmitate are counteracted by mango peel and seed extracts in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 5419.
43. Sun, X. and Duan, Z. 1996, Research progress of medicinal plants of *Zanthoxylum* linn. *Yao Xue Xue Bao* **31**, 231-240.
44. Wang, Z., Zuo, Z., Li, L., Ren, S., Gao, T., Fu, J., Hou, Y., Chen, Y. and Pi, J. 2020, Nrf2 in adipocytes. *Arch. Pharm. Res.* **43**, 350-360.
45. Xu, J. X., Lin, L. W., He, M., Peng, X. R., Zhang, Z. T. and Qiu, M. H. 2024. New alkylamides from the pericarps of *Zanthoxylum schinifolium*. *Fitoterapia* **177**, 106057.
46. Yadav, N. and Paul, A. T. 2024. Pancreatic lipase and its related proteins: Where are we now? *Drug Discov. Today* **29**, 103855.
47. Yan, L. and Guo, L. 2023. Exercise-regulated white adipocyte differentiation: An insight into its role and mechanism. *J. Cell. Physiol.* **238**, 1670-1692.
48. You, Y. L., Lee, J. Y. and Choi, H. S. 2023. *Schisandra chinensis*-derived gomisins C suppresses lipid accumulation by JAK2-STAT signaling in adipocyte. *Food Sci. Biotechnol.* **32**, 1225-1233.

초록 : ROS 생성의 저해와 PI3K/Akt 신호계의 불활성화를 통한 산초나무 잎의 메탄올 추출물의 지방세포 분화 억제

최은옥¹ · 황혜진^{1,2} · 최영현^{2,3*}

(¹동의대학교 의료·보건·생활대학 식품영양학과, ²동의대학교 항노화연구소, ³동의대학교 한의과대학 생화학교실)

본 연구에서는 산초나무 잎의 메탄올 추출물(MEZS)에 의한 항비만 기전을 조사하였다. 3T3-L1 지방전구세포 모델을 이용한 결과에 의하면 MEZS는 지방세포 분화 유도제에 의한 지방세포로의 분화와 지방의 형성을 처리 농도 의존적으로 차단하였다. 이는 C/EBPs와 PPAR γ 와 같은 지방세포 생성 전사 인자 뿐만 아니라 aP2, leptin 및 FAS와 같은 지방세포 특이적 유전자의 발현 억제에 의한 것이었다. MEZS는 또한 PI3K/Akt 경로의 활성을 억제하였으며, PI3K/Akt의 경로를 인위로 차단하였을 경우, MEZS에 의한 지방세포로의 분화와 지방 형성 억제 효능은 더욱 증가하였다. 나아가 MEZS는 분화된 지방세포에서의 ROS 생성을 차단하였으며, 이는 Nrf2 신호계의 활성화와 연관성이 있었다. 본 연구의 결과는 산초나무 잎 추출물이 항비만 효과를 가질 수 있는 식·의약 소재의 잠재력이 우수함을 의미한다.