

Camphor Inhibits Adipocyte Differentiation via Its Impact on SMO-dependent Regulation of Hedgehog Signaling

Jae Young Choi^{1,3*}, Jong Seok Lim², Ja Bok Lee² and Yung Hun Yang³

¹Department of Culinary Arts & Hotel Food Service-Major in Culinary Arts, Yeonsung University, Yanghwa-ro 37beon-gil 34, Manan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do 14011, Korea

²L.FOUNDER INC., 406, Business Incubation Seoul National University of Science & Technology 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

³Department of Biological Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Neuundong-ro 120, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea

Received August 16, 2020 / Revised November 8, 2020 / Accepted November 11, 2020

In this study, we examined inhibition of adipocyte differentiation associated with the administration of camphor, a substance identified in extracts of the flowering plant *Chrysanthemum indicum* L. (CI). No camphor-mediated cytotoxicity was observed over a period of 1-10 days in studies targeting cells of the 3T3-L1 adipocyte-like line. Experiments that featured siRNA-mediated suppression of the transmembrane proteins Patched (PTCH) and Smoothened (SMO) resulted in inhibition and activation of differentiation, respectively. Interestingly, inhibition of PTCH typically activates SMO protein targeting and serves to activate hedgehog (HH)-mediated signaling. The results of our study suggest that activation of HH-mediated signaling can inhibit adipocyte differentiation. Furthermore, expression of glioma-associated oncogene homologue 1 (Gli1) was detected by flow cytometry in $62.7 \pm 1.5\%$ of cells in response to administration of *Lactobacillus rhamnosus* (KCTC 3237) and in $60.4 \pm 2.2\%$ of cells in response to camphor; these levels are higher than those detected in undifferentiated controls ($24.9 \pm 3.1\%$). No change in the state of fermented camphor was identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), but a 15.41% quantitative increase was confirmed in KCTC 3237. Overall, we conclude that administration of camphor resulted in overexpression of SMO and modulated the differential expression of Gli1. Animal studies focused on the impact of camphor as an agent to counteract obesity might be considered in the future. Indeed, camphor and similar physiologically active compounds from fermented CI might be developed as new and effective treatments for obesity.

Key words : Adipocyte, camphor, hedgehog signal, lipid, SMO

서 론

만성질환 중 비만은 음식물 과잉섭취가 소모되는 에너지보다 많기 때문에 발생하는 질병으로 서구화된 식습관과 경제적인 여유로움으로 인해 발생한 질병이다. 현재 비만은 전 세계적으로 증가하고 있으며, 이는 의료적으로도 문제가 제기되고 있다[21].

비만은 대표적으로 지방이 축적되어 나타나는 질병으로 지방은 지방전구세포에서 지방구세포로의 분화로 생성된다. 지방전구세포에서 지방구세포로 분화하는 과정 중 핵 수용체인 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)가 발현을 조절하는 핵심인자로 작용한다[13]. 특히, PPAR γ 는 adipocyte protein 2, lipoprotein lipase 등의 지방구세포 생성 유전자의

발현을 유도하며, leptin과 adiponectin 등 지방합성 유전자들의 발현을 조절한다[1]. PPAR γ 의 억제로 활성화된 AMP-activated protein kinase (AMPK)가 작용하고, 지방구세포 분화를 유도하는 전사인자의 발현을 조절함으로써 지방전구세포가 지방구세포로의 분화를 억제시키는 것으로 보고되었다[30].

Hedgehog (HH) 신호는 리간드를 통해 활성화되면 smoothened (SMO)를 차단하던 patched (PTCH)를 억제시켜 SMO를 활성화시키고, 이를 통해 glioma-associated oncogene homologue 1 (Gli1)은 핵으로 이동하여 HH 신호를 활성화된 상태로 유지한다[4]. 이때 지방전구세포는 HH 신호를 활성화된 상태로 유지되다가 분화를 통해 지방구세포로 변화되면 HH 신호를 비활성화 상태로 변화시켜 각 지방구세포 분화를 원활히 할 수 있도록 조절한다[11]. 특히, Gli1 단백질이 낮게 발현되면 PPAR를 높게 조절하고 지방구세포를 분화시키는 역할을 하는데, Gli1과 PPAR의 발현은 지방전구세포인 3T3-L1 세포주에서 역상관 관계임을 보고한 바 있다[3].

SMO는 HH 신호의 주된 조절 타겟으로 연구되었다. HEK 293T 세포주에서 SMO를 발현시키는 플라스미드(plasmid)가 형질전환 후 콜레스테롤 농도가 증가되었고[22], SMO를 조절하는 miR-370을 통해 HH 신호를 억제하여 암세포의 성장을

*Corresponding author

Tel : +82-31-441-1082, Fax : +82-70-4275-0573

E-mail : juynay@yeonsung.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.

차단하는 연구가 진행되었다[12]. 천연물에서는 무에서 분리된 설포라펜(sulforaphene)이 SMO를 조절하여 3T3-L1 세포주의 지방구세포 분화를 억제한 연구가 보고되었다[3].

Camphor는 ultraviolet (UV)에 의한 마우스 스킨에서 세포 증식 및 항노화에 대한 연구가 보고되었으며, reactive oxygen species (ROS) 매개 미토콘드리아 apoptosis 신호를 조절하여 암세포를 사멸시키고 항암활성을 갖는 것으로 알려져 있다 [25, 28]. 이처럼 camphor에 대한 연구는 암세포 억제 및 세포 증식에 관한 연구만 진행되었고, 지방구세포 분화관련 연구는 미미한 실정이다.

선행연구에서 감국(*Chrysanthemum indicum* L.) 추출물을 11가지 균주(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kitasatonis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*)로 발효를 시켰으며, 그 중 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115는 발효 시 HH 신호를 조절하면서 지방구세포 분화를 억제하였다[5].

따라서 본 연구에서는 감국 추출물에서 지방구세포 분화를 억제하는 단일물질인 camphor의 효과 및 지방구세포 분화에 영향을 주는 HH 신호의 주된 조절 타겟과 매커니즘을 연구하였다.

재료 및 방법

단일물질

감국(지상부 중 꽃잎 부분)에서 분리할 수 있는 대표물질을 검색하여 camphor를 확인하였고, camphor (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)를 구매하여 본 실험에 이용하였다.

감국 추출물의 유산균 발효

유산균 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115, KCTC 3109, KCTC 3074, KCTC 3237은 생물자원센터(KCTC, Jeong-eup, Korea)에서 분양 받아 실험에 이용하였다. 선행연구에서 이용한 발효된 감국 추출물을 이용하였다[5].

Camphor 발효물 GC-MS 측정

Camphor 및 camphor발효물이 갖는 차이점을 확인하기 위해 GC-MS실험을 진행하였다. Camphor 또는 camphor발효물 또는 감국 발효물 0.5 g에 3차 증류수 5 ml를 넣어 섞어준 후 fiber에 성분을 흡착시키기 위해 70°C에서 20분 동안 방치하여 시료로 사용하였다. 30초 동안 평형을 유지하였고 solid-phase microextraction (SPME) fiber (Pink: PDMS/DVB (StableFlex™))를 사용하였다. 컬럼은 gas chromatography (GC) columns (DB-5, DB-5ms, DB-DIOXIN and Cp-Sil 88, 30 m × 250 μm × 0.25 μm)를 이용하였으며, Agilent 7890 gas chromatogra-

phy/5977B mass spectrometer (GC/MS, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 이용하였다. Data 분석조건은 retention time (RT) 52분, oven온도 50°C로 측정하였으며, post run 110°C에서 분당 5°C씩 280°C까지 올렸고, 각 hold time은 5분간 주었다. Mass parameter는 start time 1에서부터 low mass 35/high mass 400까지 측정하였다. Column과 spectrum을 비교하여 동정하였고 측정된 성분은 각각의 피크 면적을 총 피크 면적으로 나눈 값으로 %로 계산하였다.

세포배양 및 세포독성 측정

3T3-L1세포주는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 세포의 독성테스트Cyto-X (LPS Solution, Daejeon, Korea)시약에 이용하였다. 3T3-L1 세포주를 96 well plate (SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 1×10^4 세포수로 10% bovine calf serum (BCS, Welgene Inc., Gyeongsan, Korea), 1% penicillin streptomycin (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator (WS-180CA, World Science, Bucheon, Korea)에서 배양하였다. 12 hr 배양한 뒤 camphor를 500 mM부터 연속희석법으로 처리한 후 배양 24 hr 후 각 well에 10% (v/v) 농도로 Cyto-X 시약을 첨가한 후 호일로 감싸 4 hr 동일 조건에서 배양 후 450 nm 흡광도 (SpectraMax i3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에서 측정하였다.

세포 분화 및 분화된 세포주의 세포독성

3T3-L1 세포주를 32 well plate (SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 3.5×10^5 세포수로 10% BCS, 1% penicillin streptomycin이 함유된 DMEM배지에 배양 후 95% 세포배양이 완료된 후 10 μg/ml insulin (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA), 0.1 mM dexamethasone (DEX, Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)가 포함된 10% fetal bovine serum (FBS, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) 분화 배지로 교환하여 2일간 배양하였다. 2일마다 10 μg/ml insulin이 포함된 10% FBS배지로 교환하며 camphor를 150, 200 및 250 mM로 처리한다. 10일간 배양을 유지하며 Oil Red O (ORO, Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)염색 후 3T3-L1세포주를 관찰하고 isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 용출시켜 SpectraMax i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에서 흡광도 510 nm로 확인한 뒤 실험을 종료하였다.

Gli1 단백질 FACS 분석

분화된 3T3-L1 세포주의 Gli1 단백질 발현을 분석하기 위해

1.5×10⁵ 세포수로 준비 후 camphor을 150, 200 및 250 mM로 처리한다. 4일 분화유도 후 pH 7.4 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)로 1회 세척 후 DPBS, 0.5% bovine serum albumin (BSA, Amresco, Solon, OH, USA), 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)로 만든 fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer 500 µl에 0.1% (v/v) 농도로 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 조제하여 15분간 permeabilization 시켰다. FACS buffer로 1회 세척 후 Gli1- fluorescein isothiocyanate (FITC) antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)로 1 hr 염색하였다. FACS buffer로 1회 세척 후 Attune ® FACS machine (Life Technologies, Darmstadt, Germany)을 이용하여 490 nm excitation, 520/20 nm emission 파장에서 분석하였다.

siRNA를 이용한 유전자 억제 분석

3T3-L1 세포주를 60 mm 세포배양 접시(SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 3.5×10⁵ 세포수로 24 hr 배양한 뒤 serum free DMEM에 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 20 µl 와 15 pmol PTCH siRNA(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 또는 15 pmol SMO siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 6 µl를 혼합하여 transfection 하였다. 대조구는 control siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였다. 12 hr 후 10% FBS 가 포함된 DMEM 배지로 교환한 뒤 48 hr 동안 추가 분화 유도하였다.

총 단백질 발현분석

3T3-L1 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 4.5×10⁵ 세포수로 12 hr 배양한 뒤 camphor을 150, 200 및 250 mM로 처리한다. 세포를 수집하여 RIPA lysis buffer (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)에 phosphatase inhibitor cocktail (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)과 protease inhibitor cocktail (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)을 1 × 로 섞어 얼음에 1 hr 동안 lysis후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리기(Smart R17 Plus, Hanil, Daejeon, Korea)에서 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 상층액을 회수하여 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 활용해 정량 후 20 µg의 단백질을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel method를 이용하여 전기 영동 하였다. Gel transfer된 단백질을 1× phosphate-buffered saline (PBS, LPS Solution, Daejeon, Korea) buffer 1,000 ml과 Tween20 (USB Corp., Cleveland, OH, USA) 1 ml를 섞어 만든 PBS-T에 5% skim milk (KisanBio, Seoul, Korea)를 1 hr 동안 blocking한 뒤 1차 항체를 각각 1:1,000의 농도로 12 hr 4℃의 냉장실에 처리하였다. PBS-T로 3회 세척한 뒤 2차 항체를 각각 1:5,000의

농도로 실온에서 처리한 뒤 다시 PBS-T로 3 회 세척 후 Amersham enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)를 이용하여 발색을 측정하였다. 항체는 anti-C/EBPα, anti-p-p38 MAPK, anti-p-AMPKα, anti-PPARγ, (BioVision, Milpitas, CA, USA), anti-SMO, anti-β-actin, anti-AMPK (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) 및 anti-Gli1 (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA)를 이용하였다.

유전자 발현 분석

3T3-L1 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 4.5×10⁵ 세포수로 12 hr 배양한 뒤 camphor을 150, 200 및 250 mM로 처리한다. 세포를 수집하여 3T3-L1 세포주로부터 Easy-Blue reagent (iNtRON Biotechnology Co., Seoul, Korea)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 M-MLV RTase (Promega, Madison, WA, USA)와 Random primer (Promega, Madison, WA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하고 SYBR Green Real time polymerase chain reaction (PCR) Master Mix (Roche, Mannheim, Germany)와 LightCycler system (Roche, Mannheim, Germany)을 사용하여 qPCR을 수행하였다. 모든 유전자 발현 정도는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 발현값으로 보정하였다.

Primer sequence는 PPARγ (5'-GGA AGA CCA CTC GCA TTC CTT-3', 5'-GTA ATC AGC AAC CAT TGG GTC-3'), C/EBPα (5'-GCA GCC ACT TGA GTT CTC AGG-3', 5'-GAT GTA GGC GGA GAG GTC GAT-3'), FAS (5'-AGA GAT CCC GAG ACG CTT CT-3', 5'-GCT TGG TCC TTT GAA GTC GAA GA-3'), GAPDH (5'-AGC TTC GGC ACA TAT TTC ATC TG-3', 5'-CGT TCA CTC CCA TGA CAA ACA-3'), Adiponectin (5'-GAA GCC GCT TAT GTG TAT CGC, 5'-GAA TGG GTA CAT TGG GAA CAG T-3'), SMO (5'-CAG CAA GAT CAA CGA GAC CA-3', 5'-GCT GAA GGT GAT GAG CAC AA-3'), Gli1 (5'-ACT GGG GTG AGT TCC CTT CT-3', 5'-TGG CAG GGC TCT GAC TAA CT-3')을 이용하였다.

통계분석

모든 생리활성 실험은 3회 반복 실험을 통해 수치화했으며, 통계분석은 two way analysis of variance (ANOVA)로 신뢰 구간 $p < 0.05$ 으로 검정을 실시하였다. 통계프로그램은 Graph Pad Prism 5 software (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하였다.

결과 및 고찰

Camphor의 세포독성

Camphor의 실험농도 설정을 위해 세포독성을 확인하였다.

Mitochondrial dehydrogenase와 반응하는 WST계열의 시약을 이용하여 세포의 증식률을 측정하였다. Camphor의 3T3-L1 세포주에 대한 세포독성은 고농도인 500 mM에서도 보이지 않았다(Fig. 1A). 또한, 3T3-L1세포주의 분화는 7일 이상 소요되기 때문에 10일까지의 세포독성을 확인한 결과 250 mM 이하의 농도에서 세포독성이 없었다(Fig. 1A). 분화 5일차 세포모양도 dimethyl sulfoxide (DMSO) 처리된 대조군 대비 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 1B).

세포독성은 세포주에 산화스트레스를 발생시켜 단백질, DNA 또는 RNA 손상 및 미토콘드리아를 손상시키고 전체적

으로 세포의 생존유지를 못하는 세포독성 형태로 나타나 세포를 사멸한다[10]. 특히, 유입량에 상관없이 세포속으로 유입된 독성성분은 세포막의 일부 단백질과 결합하여 2차 신호전달 경로를 차단 또는 변형시키고, 독성성분 중 이온을 나타내는 성분은 세포막을 통해 세포 내로 유입되어 세포를 변형시킨다[2]. 현재 연구된 세포독성을 띄는 다수의 물질들은 전하를 띠는 수용성의 세포막에 전기적 성질을 띠는 이온형태로 결집을 유도하여 세포 내 유입을 원활히 할 수 있는 것으로 알려져 있다[14]. 본 연구에서 camphor는 500mM에서 세포내 독성을 보이지 않았으며, 3T3-L1 세포주의 분화 기간인 10일간 처리시

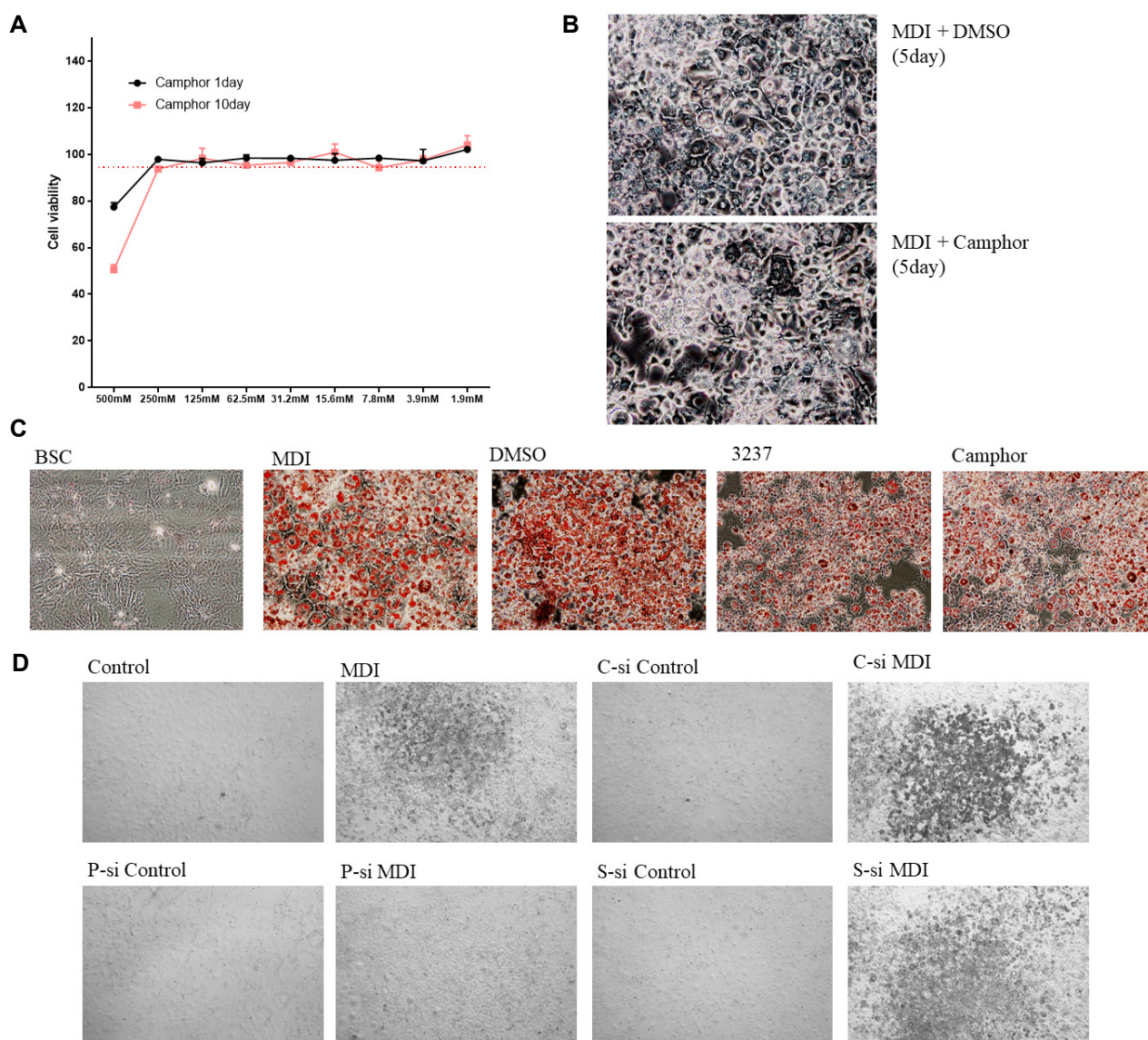


Fig. 1. Camphor inhibits the differentiation of 3T3-L1 cells without inducing cytotoxicity. A. Cell viability at $t=1$ and $t=10$ days in response to administration of varying concentrations of camphor; B. Methyl-isobutyl-xanthine, dexamethasone and insulin (MDI)-induced differentiation of 3T3-L1 cells in the presence of camphor or dimethyl sulfoxide (DMSO); C. Oil Red O (ORO) staining of undifferentiated cells (BSC), cells treated with *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237 (3237) fermented *Chrysanthemum indicum* L., and cells treated with camphor; D. Results of transfection (12 hr) with control siRNA (C-si), SMO siRNA(S-si) or PTCH siRNA (P-si) 12 hr followed by MDI-mediated differentiation.

에도 세포독성을 보이지 않아 250 mM의 세포처리가 적정 농도로 보인다.

Camphor의 SMO 억제효과 및 SMO의 분화 조절

세포분화 과정에서 장시간 농도 별 camphor를 처리한 3T3-L1 세포주에서 HH 신호 중 SMO, PTCH 및 Gli1를 측정하였다. ORO 염색을 통해 감국 발효물 및 camphor 처리군에서 지방구세포 분화가 억제된 것을 확인하였다(Fig. 1C). mRAN 및 단백질에서 SMO 및 Gli1이 증가되는 것을 확인했으며(Fig. 2A, Fig. 2B), 분화 4일차 camphor를 제거하고 SMO siRNA를 이용하여 SMO를 억제 시 분화가 다시 유도되었다(Fig. 1D, Fig. 2C). PTCH 및 SMO siRNA를 각각 처리 시 PTCH 억제 시 분화가 억제되었고, SMO siRNA 단독 처리군에서는 분화가 유도되었다(Fig. 1D). 즉, PTCH 억제는 SMO를 활성화시키는 기전으로 HH를 활성화시킨다. 이러한 결과는 HH 신호의 활성화가 지방구세포 분화를 억제시키는 것을 보여준다. SMO

siRNA를 통해 증가된 SMO를 조절하면 분화기전에 영향을 미치는 것과 동일하게 camphor를 처리하면 분화기전에 영향을 주어 분화억제가 되는 것을 확인할 수 있었다.

HH 신호의 활성화 단계는 PTCH을 비활성화 시키는 HH 리간드의 결합에 의해 시작되며 리소좀을 통해 PTCH의 분해가 유도된다[24]. PTCH의 분해를 통해 SMO가 CSNK1A1 (CK1a) 및 G protein-coupled receptor (GPCR) kinase2 (GRK2)와의 연관을 통해 인산화가 활성화되고, β -arrestin과의 연관을 통해 하위로 전달되도록 한다[4, 6]. 활성화된 SMO는 Gli를 활성화시키고 HH 과 관련된 유전자를 자극, suppressor of fused (SUFU)로부터 해리를 촉진하여 활성화된 Gli가 세포 증식, 생존, 자가재생 및 암세포에서의 침습성에 관련된 인자를 활성화시킨다[17]. 또한, SMO를 타겟으로 활성화 또는 억제시키는 메커니즘을 통해 HH 신호를 조절하는 연구가 다양하게 진행되었다[3, 12]. 특히, 3T3-L1 세포주에서는 SMO를 활성화시키고, 암세포에서는 SMO를 억제해 세포의 성장

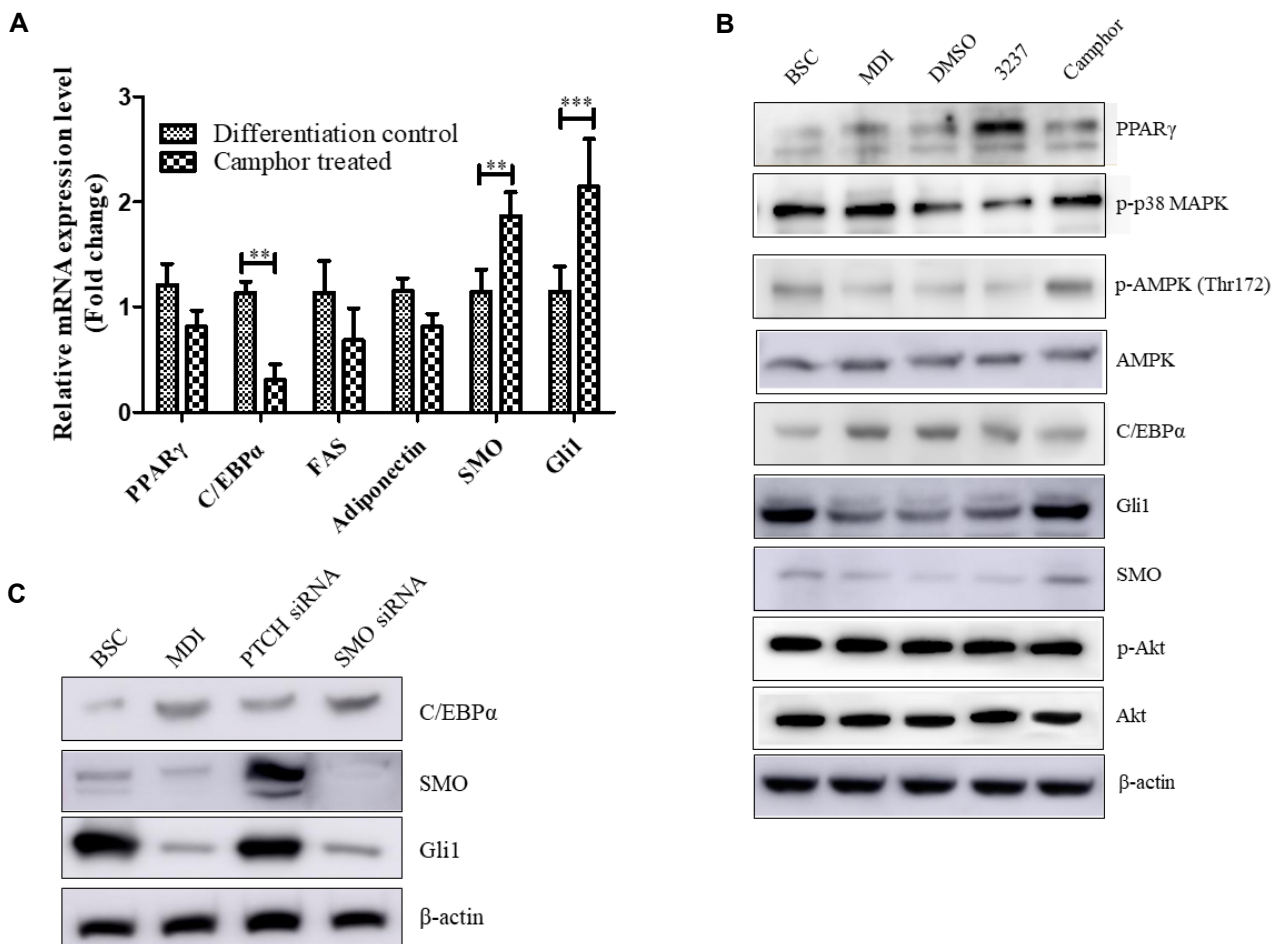


Fig. 2. Evaluation of 3T3-L1 preadipocytes by qPCR and Western blot. A. Relative expression of mRNA in response to camphor (Data are expressed as mean \pm SD. Significant difference from differentiation control by two-way ANOVA followed by the Bonferroni's test: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); B. Western blot of extracts from 3T3-L1 cells differentiated for 5 days in the presence of *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237 (3237)-fermented *Chrysanthemum indicum* L., camphor or DMSO; C. Western blot analysis targeting hedgehog pathway proteins.

및 침습성을 조절하는 연구들이 보고되고 있다[18].

분화를 조절하는 기전은 HH 신호 이외에도 cyclin D1, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3k)/Akt 및 mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) 등이 존재한다. 하지만 camphor의 처리시 protein kinase B (Akt)는 조절되지 않았으며(Fig. 2B), 이는 기존 연구에서 감국 추출물에서 Akt가 조절된 이유는 camphor 이외의 물질에 대한 영향이라 보인다[5].

감국 추출물에서 Akt를 조절한 연구는 Raw264.7 세포주를

이용하여 감국 메탄을 추출물 처리시 세포독성은 없었고, lipopolysaccharide에 의해 유도된 산화질소와 prostaglandin E2 생성을 억제하였다. 또한 Akt1/Akt2를 표적으로 루테올린 (luteolin)이 약리성분으로 확인된 바 있다[19, 27]. Akt 조절인자인 루테올린은 감국 추출물에서 high performance liquid chromatography (HPLC)를 통해 14.9 mg/g으로 높은 함량으로 확인되었다[27]. 하지만 본 연구에서 camphor는 Akt를 조절하지 않았다.

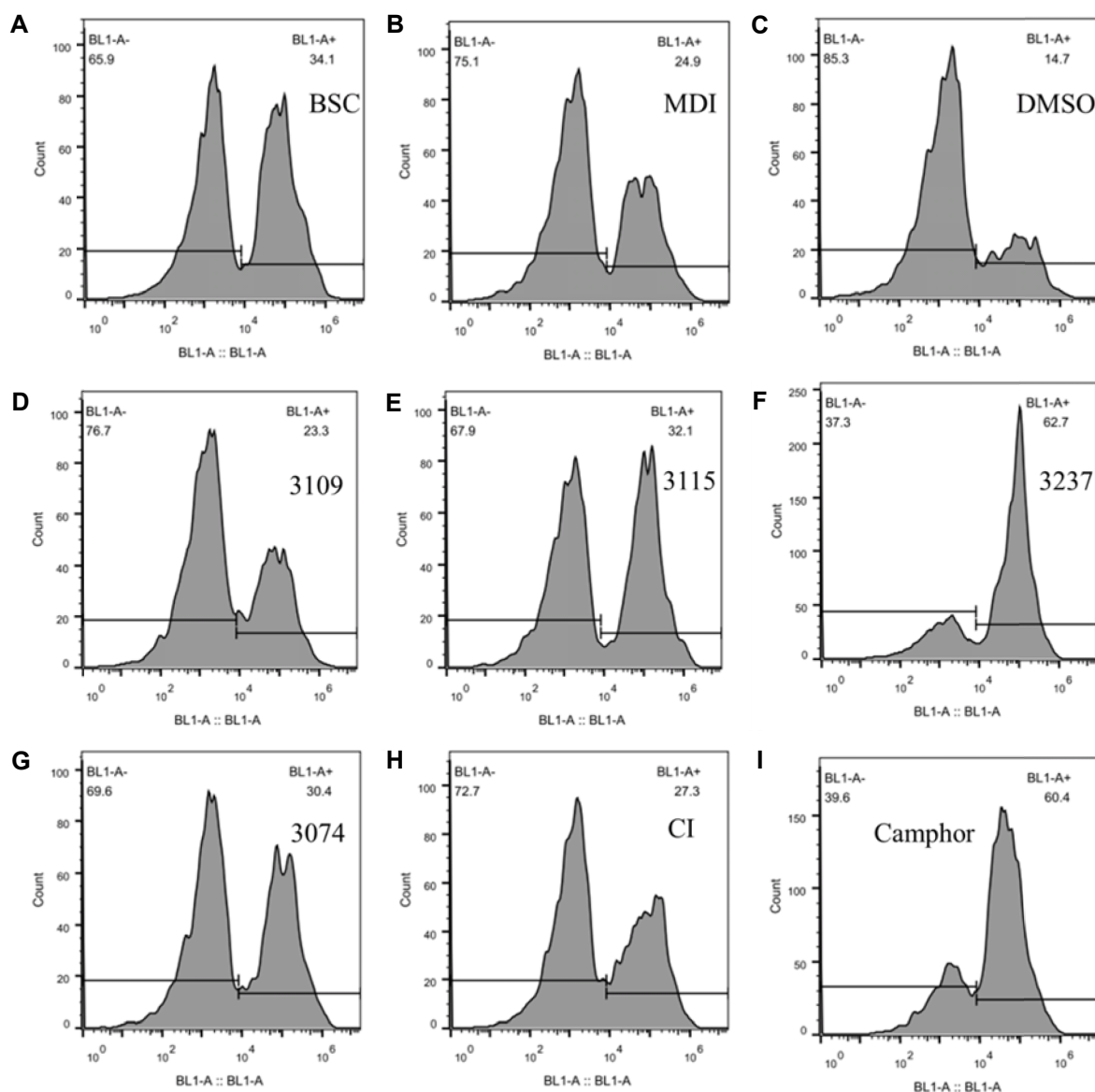


Fig. 3. Expression of Gli 1 (FITC) by 3T3-L1 cells in response to *Chrysanthemum indicum* L. extract (CI) alone, in response to each of the bacterial mediators of fermentation, and to camphor. A. Undifferentiated cells (BSC); B. 3T3-L1 cells differentiated in response to MDI; C. Cells treated with DMSO; Cells treated with D. *Lactobacillus casei* KCTC 3109 (3109)-fermented *Chrysanthemum indicum* L.; E. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115 (3115)-fermented *Chrysanthemum indicum* L.; F. *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237 (3237)-fermented *Chrysanthemum indicum* L.; G. *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074 (3074)-fermented *Chrysanthemum indicum* L.; H. *Chrysanthemum indicum* L. extract (CI); and I. Camphor.

Gli1의 발현차이

분화과정 중 감국 추출물, 감국 발효물 및 camphor에서의 Gli1 발현은 FACS기기를 이용하여 분석하였다. Gli1에 FITC

형광이 conjugation되어 있어, Gli1이 염색되면 blue-laser 1 (BL1)의 수치가 증가된다. Gli1의 단백질 증가가 BL1-A+ 부위에 증가되면서 Gli1의 단백질을 확인할 수 있다.

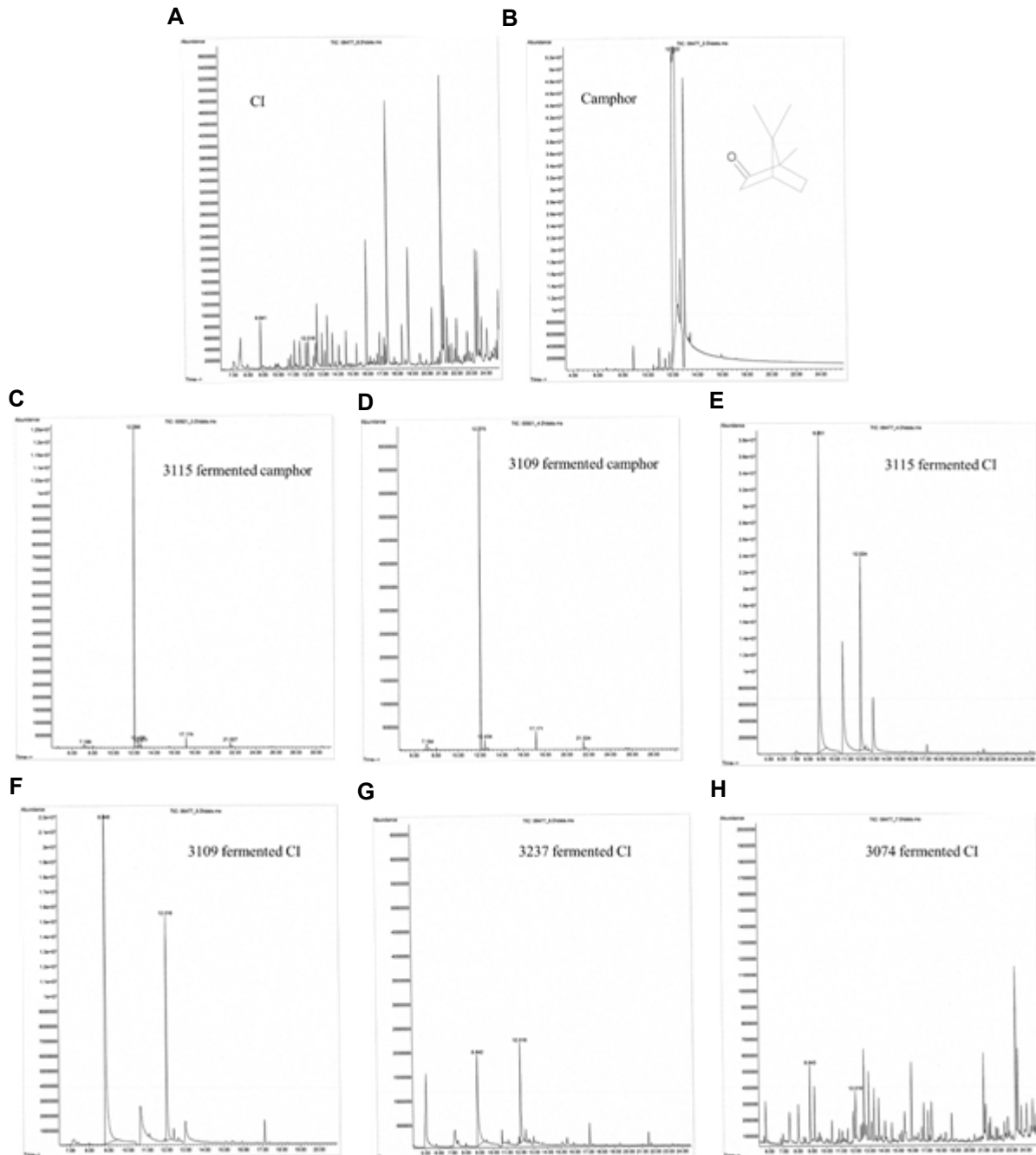


Fig. 4. GC-MS analysis of chemical derivatives associated with the fermentation system used to produce camphor. A. A GC profile of derivatives from *Chrysanthemum indicum* L. extract; B. A GC profile of derivatives from camphor; C. A GC profile of derivatives from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115-fermented camphor; D. A GC profile of derivatives from *Lactobacillus casei* KCTC 3109-fermented camphor; E. A GC profile of derivatives from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115 (3115)-fermented *Chrysanthemum indicum* L.; F. A GC profile of derivatives from *Lactobacillus casei* KCTC 3109 (3109)-fermented *Chrysanthemum indicum* L.; G. A GC profile of derivatives from *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237 (3237)-fermented *Chrysanthemum indicum* L.; H. A GC profile of derivatives from *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074 (3074)-fermented *Chrysanthemum indicum* L..

일반적인 3T3-L1세포주의 Gli1 발현은 $34.1 \pm 5.2\%$ 인 반면 분화된 세포는 $24.9 \pm 3.1\%$, KCTC 3109는 $23.3 \pm 1.9\%$ 로 발현이 감소되었고, KCTC 3115는 $32.1 \pm 2.8\%$, KCTC 3074는 $30.4 \pm 4.2\%$ 로 정상수치만큼 발현되었다. 반면, KCTC 3237은 $62.7 \pm 1.5\%$, camphor는 $60.4 \pm 2.2\%$ 로 Gli1의 발현이 높아지는 것을 확인하였다(Fig. 3).

Gli1 또는 SMO를 조절하는 타겟은 직접적인 영향 이외에 Wnt/ β -catenin의 타겟인 Wnt3a에 의해 T-cell factor 4 (TCF4)/ β -catenin을 통한 조절에 대한 연구가 보고되었다[26], 하지만 본 실험에서 TCF4 및 β -catenin을 Western blot으로 확인한 결과 camphor에 의해 조절되는 것을 확인할 수 없었으며(data not shown), PI3K/Akt를 통해서 조절되는 연구가 보고되어 있지만[31], 본 실험에서 camphor에 의해 Akt가 조절되지 않았다.

Camphor의 발효에 의한 차이와 감국 추출물과 발효물에서의 양적 차이

Camphor를 발효시킨 과정에서 GC-MS에서 확인되는 camphor의 retention time이 12.0정도 shift 되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4B). 다만, MS에서 molecular weight 차이를 보이지 않았고, camphor의 구조는 변화되지 않는 것임을 확인했다(Fig. 4C, Fig. 4D). 이 같은 결과는 발효과정에서 camphor의 구조변화는 없는 것으로 판단된다.

감국 추출물의 발효과정 후 camphor의 양적 차이를 확인하였다. 감국 추출물에서의 camphor의 area는 0.68%로 KCTC 3109는 24.82%, KCTC 3115는 29.33%, KCTC 3237은 15.41%로 감국 추출물보다 camphor의 양이 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A, Fig. 4E, Fig. 4F, Fig. 4G).

Camphor는 3T3-L1 세포주에서 지방구세포 분화 억제효과

를 증가시켰고, FACS를 통해 Gli1의 발현을 $60.4 \pm 2.2\%$ 만큼 증가시켰다. 일반적인 3T3-L1세포주는 $34.1 \pm 5.2\%$ 의 Gli1를 발현시키는데 비해 70%가량 증가된 것을 알 수 있다. 다만 KCTC 3237이 camphor의 함량변화로 Gli1의 발현을 강하게 조절한 것으로 유추할 수 있지만, KCTC 3109를 통해 감국 발효물에서의 Gli1의 조절은 camphor만의 효과가 아닌 감국 발효물에 있는 특정 물질과의 시너지 효과로 인한 조절로 판단된다.

Camphor는 분자 구조에 작용기가 적어, 식물에서 자주 발견되는 glycoside form의 분자가 존재하지 않는다. 한편 그에 비해 luteolin의 경우 식물체에서 비배당체 형태로도 존재하나, 배당체의 형태로 존재하기도 한다. Luteolin의 배당체로는 luteolin-5-O-glucoside와 luteolin-7-O-glucoside가 있으며[15, 16], 이러한 배당체는 주로 β -glucosidase에 의해 비배당체로 전환되며 그 활성이 증가한다[8]. 이러한 β -glucosidase는 여러 유산균에서도 발견되며[20] 본 실험의 결과에도 영향을 미친 것으로 보인다. 이러한 방법으로 식물 활성 성분을 강화한 예로는 유산균 발효를 통한 이소플라본 활성 강화[23], 유산균 발효를 통한 진세노사이드 활성 강화[29], 유산균 발효를 통한 안토시아닌과 퀘세틴 강화[9] 등이 있다. 본 연구에서도 인체에 유익한 유산균을 이용하여 감국 추출물의 활성을 강화시킨 것으로 보인다. Camphor에 관한 연구로 세이지 잎에서 포함된 camphor의 함량변화를 생합성 과정으로 확인하였다. 이는 geranyl pyrophosphate - bornyl pyrophosphate - borneol - camphor로 생합성의 과정을 다루고 있다[7]. 다만, 감국에서도 동일한 과정으로 camphor의 함량이 변하는 것에 대한 추가연구가 필요하다. 또한, 본 연구처럼 감국을 발효시켰을 경우 3T3-L1 세포주 모델에 지방구세포 감소를 증가시킨 것은 구조적 변화를 보인 물질의 영향이라 판단되며, 발효는 통한 구조가 변한 미지의 물질 규명과 camphor의 함량변화에 대한

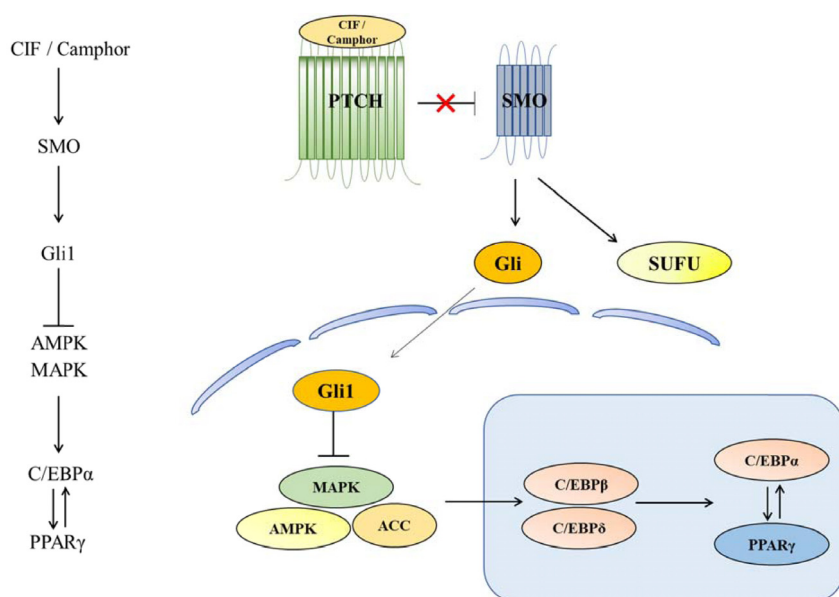


Fig. 5. Schematic representation of camphor-mediated inhibition of adipocyte differentiation by CI fermentation (CIF) products or camphor via PTCH-SMO-Gli1-mediated down-regulation of lipogenesis.

추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

감국 발효물에서 Gli1의 증가를 통한 지방구세포 분화 억제 효과를 확인하였다(Fig. 5). 특히 KCTC 3237의 경우 발효 후 Gli1을 통해 지방구세포 분화 억제를 효과적으로 하는 것을 알 수 있었다. 더불어 감국 추출물과 감국 발효물의 생리활성 물질을 동물실험을 통해 동물모델에서도 적용 가능한지 자료가 추가되어야 할 것으로 여겨지며, 본 연구의 결과로 감국 추출물 및 감국 발효물과 camphor가 HH신호조절을 통해 지방구세포 분화 및 지방구세포 분화 억제를 조절하는 새로운 비만치료제로 개발될 가능성을 제시하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다(과제번호 119116-01).

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Boucher, J. G., Ahmed, S. and Atlas, E. 2016. Bisphenol S induces adipogenesis in primary human preadipocytes from female donors. *Endocrinology* **157**, 1397-1407.
- Caruso, G., Distefano, D. A., Parlascino, P., Fresta, C. G., Lazzarino, G., Lunte, S. M. and Nicoletti, V. G. 2017. Receptor-mediated toxicity of human amylin fragment aggregated by short-and long-term incubations with copper ions. *Mol. Cell. Biochem.* **425**, 85-93.
- Chen, J., Bao, C., Kim, J. T., Cho, J. S., Qiu, S. and Lee, H. J. 2018. Sulforaphene inhibition of adipogenesis via hedgehog signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 11926-11934.
- Chen, Y., Sasai, N., Ma, G., Yue, T., Jia, J., Briscoe, J. and Jiang, J. 2011. Sonic hedgehog dependent phosphorylation by CK1 α and GRK2 is required for ciliary accumulation and activation of smoothened. *PLoS Biol.* **9**, e1001083.
- Choi, J. Y., Lim, J. S., Sim, B. R. and Yang, Y. H. 2020. Inhibitory effect of lactic acid bacteria-fermented Chrysanthemum indicum L. on adipocyte differentiation through hedgehog signaling. *J. Life Sci.* **30**, 532-541.
- Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y. and Reiter, J. F. 2005. Vertebrate smoothened functions at the primary cilium. *Nature* **437**, 1018-1021.
- Croteau, R., Felton, M., Karp, F. and Kjonaas, R. 1981. Relationship of camphor biosynthesis to leaf development in sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiol.* **67**, 820-824.
- Day, A. J., DuPont, M. S., Ridly, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J., Morgan, M. R. and Williamson, G. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Lett.* **436**, 71-75.
- Devi, A., Konerira Aiyappa, A. A. and Waterhouse, A. L. 2020. Adsorption and biotransformation of anthocyanin glucosides and quercetin glycosides by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* in model wine solution. *J. Sci. Food Agric.* **100**, 2110-2120.
- DesMarias, T. L. and Costa, M. 2019. Mechanisms of chromium-induced toxicity. *Curr. Opin. Toxicol.* **14**, 1-7.
- Fan, C., Zhang, Y., Wang, J. and Cheng, J. 2018. Roles of Hedgehog signaling pathway in adipogenic differentiation potential of porcine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Rev. Bras. de Zootec.* **47**, e20170019.
- Gu, Y., Becker, V., Zhao, Y., Menger, M. D. and Laschke, M. W. 2019. miR-370 inhibits the angiogenic activity of endothelial cells by targeting smoothened (SMO) and bone morphogenetic protein (BMP)-2. *FASEB J.* **33**, 7213-7224.
- Hadrich, F. and Sayadi, S. 2018. Apigenin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells by downregulating PPAR γ and CEBP- α . *Lipids Health Dis.* **17**, 95.
- Holmes, A. M., Mackenzie, L. and Roberts, M. S. 2020. Disposition and measured toxicity of zinc oxide nanoparticles and zinc ions against keratinocytes in cell culture and viable human epidermis. *Nanotoxicology* **14**, 263-274.
- Hu, C. and Kitts, D. D. 2004. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264. 7 cell. *Mol. Cell. Biochem.* **265**, 107-113.
- Jung, H. A., Jin, S. E., Min, B. S., Kim, B. W. and Choi, J. S. 2012. Anti-inflammatory activity of Korean thistle *Cirsium maackii* and its major flavonoid, luteolin 5-O-glucoside. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 2171-2179.
- Katoh, Y. and Katoh, M. 2009. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr. Mol. Med.* **9**, 873-886.
- Kim, Y., Kim, M., Shin, J. S., Park, S. H., Kim, S. B., Kim, J., Park, S. C., Han, C. J., Ryu, J. K., Yoon, Y. B. and Kim, Y. 2014. Hedgehog signaling between cancer cells and hepatic stellate cells in promoting cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **21**, 2684-2698.
- Lii, C., Lei, Y., Yao, H., Hsieh, Y., Tsai, C., Liu, K. and Chen, H. 2010. Chrysanthemum morifolium Ramat. reduces the oxidized LDL-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in human umbilical vein endothelial cells. *J. Ethnopharmacol.* **128**, 213-220.
- Michlmayr, H. and Kneifel, W. 2014. β -Glucosidase activities of lactic acid bacteria: mechanisms, impact on fermented food and human health. *FEMS Microbiol. Lett.* **352**, 1-10.
- Ness, S. J., Hickling, D. F., Bell, J. J. and Collins, P. F. 2018. The pressures of obesity: the relationship between obesity, malnutrition and pressure injuries in hospital inpatients. *Clin. Nutr.* **37**, 1569-1574.
- Petrov, K. 2019. Functional mechanisms of patched1, the hedgehog pathway receptor. Ph.D. dissertation, Harvard University, Cambridge, MA, USA.

23. Pyo, Y. H., Lee, T. C. and Lee, Y. C. 2005. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Research International* **38**, 551-559.
24. Rohatgi, R., Milenkovic, L. and Scott, M. P. 2007. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**, 372-376.
25. Tran, T. A., Ho, M. T., Song, Y. W., Cho, M. and Cho, S. K. 2015. Camphor induces proliferative and anti-senescence activities in human primary dermal fibroblasts and inhibits UV-induced wrinkle formation in mouse skin. *Phytother. Res.* **29**, 1917-1925.
26. Wang, Y., Lin, P., Wang, Q., Zheng, M. and Pang, L. 2018. Wnt3a regulated TCF4/ β catenin complex directly activates the key Hedgehog signalling genes Smo and Gli1. *Exp. Ther. Med.* **16**, 2101-2107.
27. Yang, W. S., Kim, D., Yi, Y., Kim, J. H., Jeong, H. Y., Hwang, K., Kim, J., Park, J. and Cho, J. Y. 2017. AKT-targeted anti-inflammatory activity of the methanol extract of *Chrysanthemum indicum* var. *albescens*. *J. Ethnopharmacol.* **201**, 82-90.
28. Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Y., Gu, W., Zhu, Y. and Wang, S. 2019. Novel camphor-based pyrimidine derivatives induced cancer cell death through a ROS-mediated mitochondrial apoptosis pathway. *RSC Adv.* **9**, 29711-29720.
29. Zhong, F. L., Ma, R., Jiang, M., Dong, W. W., Jiang, J., Wu, S., Li, D. and Quan, L. H. 2016. Cloning and characterization of Ginsenoside-Hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus brevis* that transforms Ginsenosides Rb1 and F2 into Ginsenoside Rd and compound K. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1661-1667.
30. Zhong, J., Gong, W., Lu, L., Chen, J., Lu, Z., Li, H., Liu, W., Liu, Y., Wang, M., Hu, R., Long, H. and Wei, L. 2017. Irbesartan ameliorates hyperlipidemia and liver steatosis in type 2 diabetic db/db mice via stimulating PPAR- γ , AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy. *Int. Immunopharmacol.* **42**, 176-184.
31. Zhou, J., Zhu, G., Huang, J., Li, L., Du, Y., Gao, Y., Wu, D., Wang, X., Hsieh, J., He, D. and Wu, K. 2016. Non-canonical GLI1/2 activation by PI3K/AKT signaling in renal cell carcinoma: A novel potential therapeutic target. *Cancer Lett.* **370**, 313-323.

초록 : Camphor의 Hedgehog 신호 SMO 조절을 통한 지방구세포 분화 억제효과

최재영^{1,3*} · 임종석² · 이자복² · 양영현³

(¹연성대학교 호텔외식조리과, ²㈜엘파운더, ³건국대학교 생물공학과)

본 연구는 지방구세포 감소를 위한 소재개발로 감국 추출물의 대표물질인 camphor가 갖는 지방구세포 분화 억제효과를 관찰하였다. camphor의 세포독성을 확인하기 위해 3T3-L1 세포주를 이용하여 세포독성 측정을 1 day에서 10 day까지 확인하였고, 세포독성은 모두 없었다. PTCH siRNA를 처리 시 PTCH가 비활성되어 분화가 억제되었고, SMO siRNA 처리시 SMO가 비활성화되어 분화가 유도되었다. PTCH 억제는 SMO를 활성화시키는 기전으로 HH 신호의 활성화가 지방구세포 분화를 억제시키는 것을 보여준다. FACS를 이용한 Gli1 발현은 KCTC 3237은 62.7 \pm 1.5%, camphor는 60.4 \pm 2.2%로 분화된 세포 24.9 \pm 3.1% 보다 높은 것을 확인하였다. GC-MS에서 발효된 camphor의 구조변화는 없는 것으로 확인되었으나, KCTC 3237에서 15.41% 양적 증가를 확인했다. 또한 camphor가 SMO를 과발현시키고, Gli1의 변화를 조절하였다. 따라서 감국 발효물의 생리활성 물질 중 향후 메커니즘 분석을 위한 활성물질인 camphor를 이용해 동물모델에서 비만억제 효과에 대한 자료가 더 필요할 것으로 여겨지며, 감국 추출물 및 발효물의 HH신호조절이 새로운 비만치료제로 개발될 수 있는 가능성을 제시하고자 한다.