

Inhibitory Effects of *Rosa rugosa* Crude Extract and Solvent Fractions on Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes

Hyunjung Lee¹, Jiho Yang¹, Mi-na Choi¹, Seongeun Jeon¹, Zhou Xianrong¹, Jung Hwan Oh^{2,3}, Fatih Karadeniz², Youngwan Seo⁴ and Chang-Suk Kong^{1,2*}

¹Department of Food and Nutrition, Silla University, Busan 46958, Korea

²Marine Biotechnology Center for Pharmaceuticals and Foods, Silla University, Busan 46958, Korea

³Nutritional Education, Graduate School of Education, Silla University, Busan 46958, Korea

⁴Division of Convergence on Marine Science, Korean Maritime and Ocean University, Busan 49112, Korea

Received November 16, 2022 / Revised November 28, 2022 / Accepted November 29, 2022

Halophytes have been reported to possess a variety of physiological activities, such as anti-cancer, anti-oxidant, anti-diabetes, anti-inflammatory, and anti-obesity. Studies on the roots of the halophyte *Rosa rugosa*, in particular, have shown a variety of physiological activities and are known to be effective for nursing diabetic complications in traditional Korean medicine. In this study, the effect of *R. rugosa* on adipogenesis was investigated in 3T3-L1 pre-adipocytes treated with crude extract and solvent fractions (H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, and *n*-Hex) obtained from *R. rugosa* roots. Treatment with extract and the solvent fractions inhibited the formation of intracellular lipid droplets in differentiated 3T3-L1 adipocytes compared to the untreated group. In particular, *n*-BuOH and 85% aq. MeOH fractions effectively decreased the expression of adipogenic transcription factors: peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α), and sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) in both mRNA and protein levels. In conclusion, these results suggest that *R. rugosa* contains anti-adipogenic molecules that can be utilized as a nutraceutical against obesity. Further refining of *n*-BuOH and 85% aq. MeOH fractions and analysis of their action mechanisms could yield potential therapeutic agents with anti-adipogenic effects.

Key words : Adipocyte differentiation, AMPK, Halophyte, *Rosa rugosa*, 3T3-L1

서 론

비만은 체내 지방 조직이 과다하거나 비정상적으로 축적되어 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 심근경색 등 심혈관 질환을 유발하는 주요 원인이다. 세계보건기구(WHO)에서는 2019년을 기준으로 전 세계 사망 원인 1위가 협심증 및 심근경색 등과 같은 심혈관 질환이며, 사망자의 16%가 심혈관 질환으로 사망한 것으로 보고하였다[6, 8, 16]. 우리나라의 경우에는 서구화된 식생활 및 생활 환경 변화 등으로 인해 비만율이 지속적으로 증가하는 경향을 보이고 있으며, 비만과 관련된 질환 발병률이 증가하고 있다[12, 24]. 이로 인해 비만 치료 및 예방에 대한 관심이 급증하고 있는 추세이며, 비만 치료제가 전 세계적으로 개발

되고 있는 실정이다[3]. 그러나 비만 치료제는 과도한 신경계 자극으로 많은 부작용을 초래하여 시판이 중단되고 있거나 장기복용이 금지되어 있다. 이러한 문제를 막기 위해 부작용이 적으면서 항비만 효과를 가지는 천연 소재를 활용한 연구가 진행되고 있다[1, 13].

염생식물은 물과 육지가 만나서 각각 유입되는 유기질 및 무기염류가 혼합되는 특수한 중간지대이므로 생물의 종류가 다양하고 영양염류와 에너지가 풍부하며 육상식물과 달리 높은 염분성분으로 인해 발생하는 활성산소종의 축적으로 인한 손상에도 세포 보호 및 이온 항상성을 유지하는 대사과정을 발전시켜 왔기 때문에 육상식물의 2차 대사산물들과 구별되는 새로운 형태들이 발견되고 있다. 이러한 물질들은 항산화, 항균, 항염 및 항종양 등 다양한 생리활성을 가지고 있어 암, 만성염증, 심혈관 질환 등과 같은 다양한 질병의 치료와 예방에 이용되고 있는 것으로 알려져 있다[7, 9, 18]. 염생식물에 속하는 해당화는 장미과에 속하는 낙엽활엽관목으로서 추위와 공해에도 잘 견디고 내건성도 강하다. 해당화의 꽃은 설사 및 월경과다에 사용되며, 뿌리는 당뇨병 치료제로 사용되고 있다. 뿐만 아니라 항염증, 항산화 효과, 노화방지, 혈당

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5429, Fax : +82-51-999-5657

E-mail : cskong@silla.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.

강하작용, 혈청 콜레스테롤 수치 저하작용, HIV protease 저해 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 생리 활성 효능, 식이섭취 및 무기질의 함량 등에 대한 연구들이 보고되고 있다[15, 23, 25].

본 연구에 사용된 3T3-L1 지방전구세포는 항비만 소재 개발 연구를 위해 가장 많이 사용되고 있으며, 분화유도 물질을 처리하여 성숙한 지방세포로 유도시킨다[17, 20]. 이러한 과정에서 세포의 모양이 변화하며 지방세포 분화 과정에서 발현하는 전사 인자 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP-1c 등의 발현이 활성화된다. SREBP-1c는 AMPK에 의해 직접 인산화되어 ACC 및 FAS의 발현을 유도하여 지방산 합성을 자극하며, 이 외에도 LPL을 비롯한 여러 지방세포 생성 관련 전사 인자의 발현을 증가시킨다[2, 21]. AMPK는 세포 내 에너지 인식 및 항상성 조절 역할을 하는 효소로서, AMP가 증가하면 활성화되어 지방산 및 콜레스테롤 합성을 억제하며 지방산 산화 및 당 흡수를 촉진시켜 지방생성을 억제시킨다. 즉 AMPK는 비만, 고지혈증 등을 비롯한 대사성 질환의 발생을 예방하고 치료하는데 있어 중요한 역할을 할 것이라고 제시되고 있다[11, 22].

따라서 본 연구에서는 염생식물에 속하는 해당화를 이용한 항비만 소재 개발 연구의 일환으로, 3T3-L1 지방전구세포 모델을 사용하여 지방세포 내에서의 분화 과정에 관여하는 신호전달기전 및 전사 인자의 발현에 미치는 효과에 대한 연구를 진행하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 추출 및 분석

본 연구에서 사용된 해당화(*Rosa rugosa*)는 2020년 7월 인천광역시 강화도 동검도에서 채집하였으며, 건조된 시료에 Methylene chloride (CH₂Cl₂), Methanol을 사용해서 24시간 동안 2회 침지시킨 후 여과하였다. 얻어진 추출액을 농축한 뒤 용매 극성에 따라 H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, and *n*-Hex으로 순차적 분획하여 분획물 4종을 획득하였다.

세포배양

3T3-L1 지방전구세포는 10% Fetal Bovine Serum (FBS)와 1% L-Glutamine penicillin streptomycin solution (Gibco™, USA)을 처리한 Dulbecco's modified Eagle's medium (Welgene, Korea)으로 37°C, 5% CO₂ 배양조건을 설정하여 incubator에서 세포를 배양하였다.

세포생존율 측정

해당화 추출물 및 분획물에 대한 세포 증식 및 독성을 측정하기 위해서 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 시약을 사용하여 확인하였다.

3T3-L1 지방전구세포를 96-well plate에 24시간 동안 배양한 후, 새로운 배지에 해당화 추출물 및 분획물을 농도별로 처리하여 추가적으로 24시간 동안 배양하였다[9]. 배지를 제거하고 MTT 시약을 100 μ l씩 처리하여 동일한 조건에서 4시간 동안 배양하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)로 10분간 용해하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

지방세포로의 분화 유도

3T3-L1 지방전구세포를 12-well plate에 배양하여 100% confluent 상태가 되었을 때, 0.5 mM IBMX, 0.25 μ M dexamethasone, 5 μ g/ml insulin의 분화유도물질이 포함된 DMEM으로 교체하여 해당화 추출물 및 분획물을 농도별로 처리하였다. 3일 동안 분화를 유도시킨 후, 분화유도 촉진을 위해 배지에 insulin만 처리하여 2일 간격으로 교체하였으며 총 8일 동안 분화를 유도하였다[12].

Oil-Red O 염색법

3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨 후, 세포 내 지질 축적량을 측정하기 위해 Oil-Red O 염색법으로 확인하였다. 배양된 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고 4% formaldehyde으로 상온에서 고정시킨 후, Oil-Red O solution을 처리하여 1시간 동안 염색하였다. 염색 후 염색액을 제거하여 PBS로 세척하고 세포내 지질 생성 정도를 현미경으로 관찰하였다[16, 24].

Western blot 분석법

3T3-L1 지방전구세포를 6-well plate에 배양한 후, 해당화 추출물 및 분획물을 농도별로 처리하여 지방세포로의 분화를 유도하였다. 분화 및 샘플 처리가 완료된 세포를 PBS로 세척한 후 RIPA buffer (Sigma, USA)를 400 μ l씩 첨가하여 단백질을 추출하였으며, 회수된 세포를 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 BCA protein assay kit (Thermo scientific, USA)를 사용하여 단백질 농도를 정량하였다. 정량한 단백질은 SDS-PAGE법으로 전기영동하여 분리한 후 Nitrocellulose Blotting Membrane (Amersham protran Biotech, Germany)에 transfer 하였으며, 1시간 동안 5% skim milk로 blocking하여 1X tris buffered saline with tween-20 buffer (TBS-T)로 10분간 3회 반복하여 세척하였다. 1차 항체 반응을 위해 TBS-T에 희석하여 4°C에서 overnight한 후, TBS-T로 세척한 후, 2차 항체를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시키고 TBS-T로 세척하였다. 2차 항체에 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 활성화시키기 위해 ECL-solution에 반응시켜서 이미지분석장치를 사용하여 단백질 발현을 확인하였다[13, 19].

통계처리

대조군과 각 시료에서 얻은 결과의 유의성 검증을 위해

분산분석(Oneway Analysis Of Variance: ANOVA)을 진행하였으며, $p < 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 통해 비교 분석하였다. 모든 실험 결과는 평균 \pm 표준편차(Mean \pm Standard deviation, $n=3$)로 산출하였으며, 모든 통계 분석은 SPSS+/Win 12.0 (Statistical Package for the Social Science version 12.0, USA) 프로그램을 이용하여 통계분석하였다[12].

결 과

해당화 추출물의 세포 생존율 평가

MTT 분석법은 세포의 증식 및 살아있는 세포를 측정할 수 있는 기법으로, 탈수소 효소작용을 이용하여 노란색을 띠는 수용성 기질의 MTT를 적자색을 띠는 비수용성의 formazan 결정으로 환원되는 특성을 이용한 방법이다. 해당화 추출물에 대한 세포 증식 억제 효과를 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약을 사용하여 3T3-L1 세포에 대한 세포 독성을 평가하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 배양한 후, 해당화 추출물을 5, 10, 15, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 24시간 동안 처리하여 세포 생존율을 평가하였다(Fig. 1). 그 결과 그 결과 대조군(0 $\mu\text{g/ml}$)과 비교하였을 때 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였으며, 이 결과를 토대로 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 선정하여 추후 실험을 진행하였다.

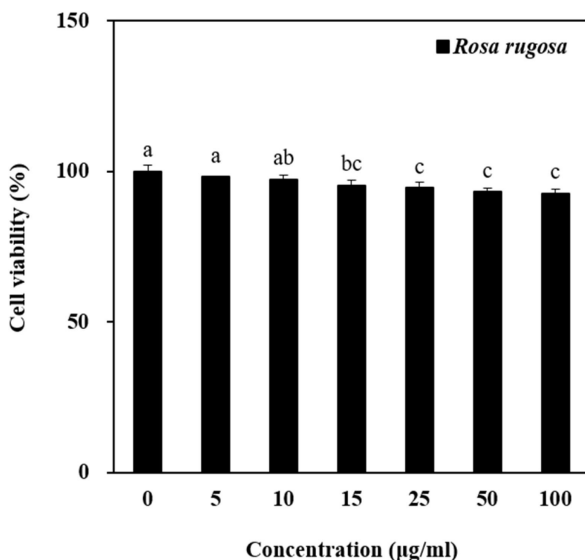


Fig. 1. Effect of *R. rugosa* crude extract on 3T3-L1 cell viability. 3T3-L1 cells were treated with 5, 10, 15, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ *R. rugosa* crude extract for 24 hr. Cell viability was determined using the MTT analysis. Data are expressed as a mean \pm SD ($n=3$). ^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

해당화 추출물의 Oil-Red O 염색

항비만 소재 탐색을 위해 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 해당화 추출물의 지질 축적 정도를 측정하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 배양한 후, 100% confluent 상태가 되었을 때 분화유도물질을 처리하여 지방세포로 분화를 유도시켰다. 분화 초기에는 3일 동안 0.5 mM IBMX, 0.25 μM dexamethasone, 5 $\mu\text{g/ml}$ insulin을 처리한 배지로 분화를 유도시켰으며, 분화 촉진을 위해 분화 후기에는 2일 간격으로 5 $\mu\text{g/ml}$ insulin을 처리한 배지로 교환하여 총 8일 동안 진행되었다. 분화된 지방세포의 지질 축적량을 측정하기 위해 Oil-Red O 염색법을 통해 해당화 추출물의 지방세포분화 억제능을 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 88.09, 85.99, 61.31%의 억제율을 보였으며, 농도의존적으로 지방세포생성이 감소하였다(Fig. 2). 따라서 해당화 추출물의 처리에 의해 지질 축적량이 감소하였으므로 항비만 효과를 확인할 수 있었다.

해당화 추출물의 지방세포생성 관련 단백질 발현에 미치는 효과

지방세포 분화과정에서 발현하는 전사 인자인 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP1c의 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하기 위해 western blot을 실시하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 배양한 후, 해당화 추출물을 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 처리하여 전사 인자들의 단백질 발현 정도를 관찰하였다. 그 결과 대조군에 비해 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP1c의 단백질 발현이 크게 감소하였으며, 농도의존적으로 단백질 발현이 감소된 것을 확인하였다(Fig. 3). 따라서 해당화 추출물이 지방세포 분화과정에서 발현하는 전사 인자들의 단백질 발현을 억제함으로써 항비만 효과를 확인할 수 있었다.

해당화 추출물의 AMP-activated protein kinase (AMPK) 신호전달경로에 미치는 효과

AMPK는 에너지의 균형을 조절하는 주요 조절 인자로서 지방산의 산화 및 지방 합성 억제는 AMPK 경로에 의해 조절된다. 조절 경로의 활성화는 AMP의 증가로 인해 지방세포 분화과정에서 발현하는 전사 인자들을 억제함으로써 지질 가수분해 및 지방산 산화를 조절한다[11]. 해당화 추출물의 AMPK 신호전달경로를 통한 지방생성억제 효과를 알아보기 위해 western blot을 실시하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 배양한 후, 해당화 추출물을 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 처리하여 전사 인자들의 단백질 발현 정도를 관찰하였다. 그 결과 대조군에 비해 AMPK의 인산화가 증가하는 것을 확인하였으며, 농도의존적으로 p-AMPK의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 따라

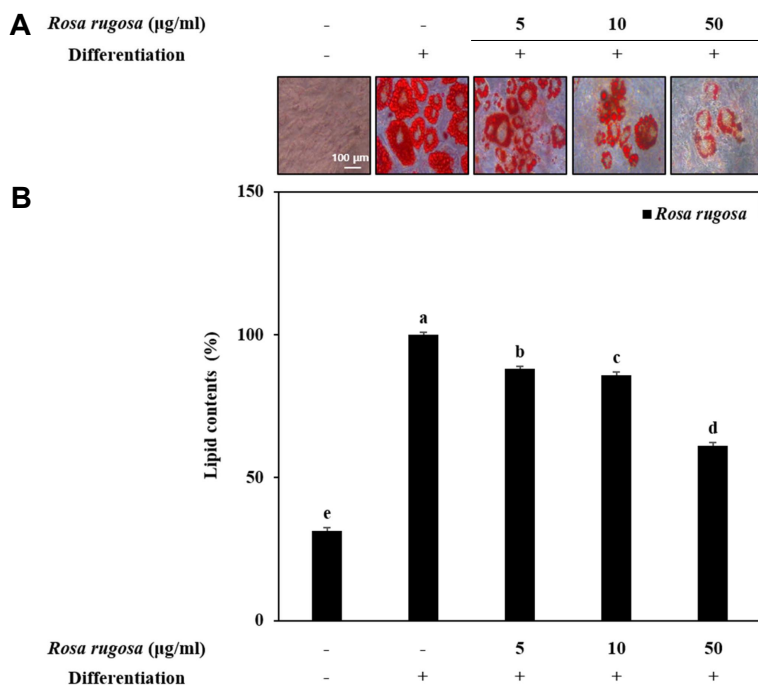


Fig. 2. Effect of *R. rugosa* crude extract on 3T3-L1 cell lipid accumulation. Cells were treated with 5, 10, 50 μg/ml *R. rugosa* crude extract and differentiated with MDI in 12-well plates. (A) Intracellular lipid content were visualized by a light microscope. (B) The lipid contents were quantified by measuring the absorbance at 500 nm. Data are expressed as a mean \pm SD (n=3). ^{a-e}Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

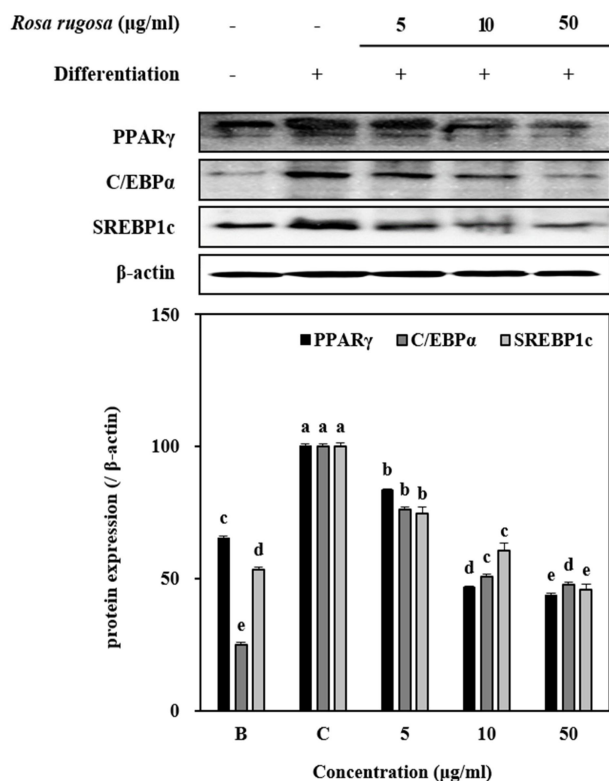


Fig. 3. Effect of *R. rugosa* crude extract on adipogenic transcription factors. The expression levels of PPARγ, C/EBPα and SREBP1c in protein were determined using Western blot respectively. Data are expressed as a mean \pm SD (n=3). ^{a-e}Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

서 해당화 추출물은 AMPK 신호전달경로를 통해 항비만 효과를 가지는 것을 알 수 있었다.

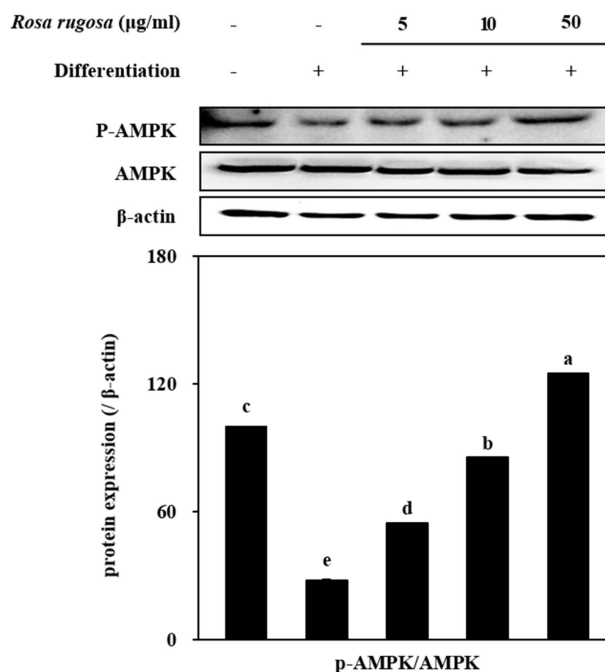


Fig. 4. Effect of *R. rugosa* crude extract on the AMPK pathway in protein levels. The expression levels of p-AMPK were determined using Western blot respectively. Data are expressed as a mean \pm SD (n=3). ^{a-e}Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

해당화 분획물의 세포 생존을 평가

해당화 추출물의 항비만 효과를 확인하였으며 이를 바탕으로 조추출물에 유기용매를 첨가하여 용매 극성에 따라 H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, and *n*-Hex으로 순차적 분획하여 실험에 사용하였다. 3T3-L1 지방전구세포에 대한 해당화 분획물의 세포 독성을 확인하기 위해 MTT assay

를 사용하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 배양한 후, 해당화 분획물을 5, 10, 15, 25, 50, 100 µg/ml 농도별로 24시간 동안 처리하여 세포 생존율을 평가하였다(Fig. 5). 그 결과 대조군(0 µg/ml)과 비교하였을 때 5, 10, 15, 25, 50 µg/ml에서 90% 이상의 생존율을 보였으며, 이 결과를 토대로 5, 10, 50 µg/ml를 선정하여 추후 실험을 진행하였다.

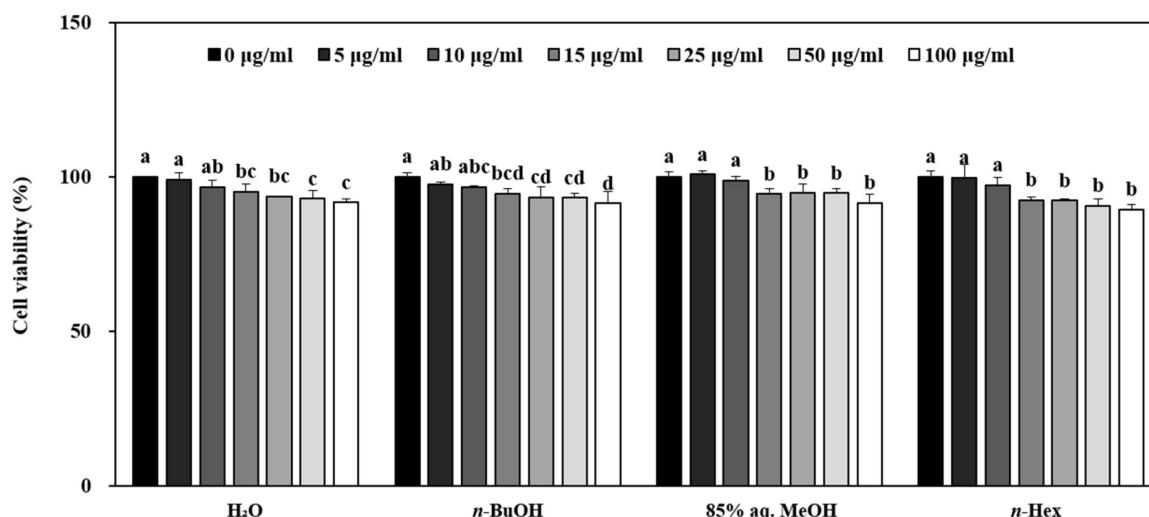


Fig. 5. Effect of *R. rugosa* solvent fractions on 3T3-L1 cell viability. 3T3-L1 cells were treated with 5, 10, 15, 25, 50, 100 µg/ml *R. rugosa* solvent fractions for 24 hr. Cell viability was determined using the MTT analysis. Data are expressed as a mean \pm SD (n=3). ^{a-d}Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

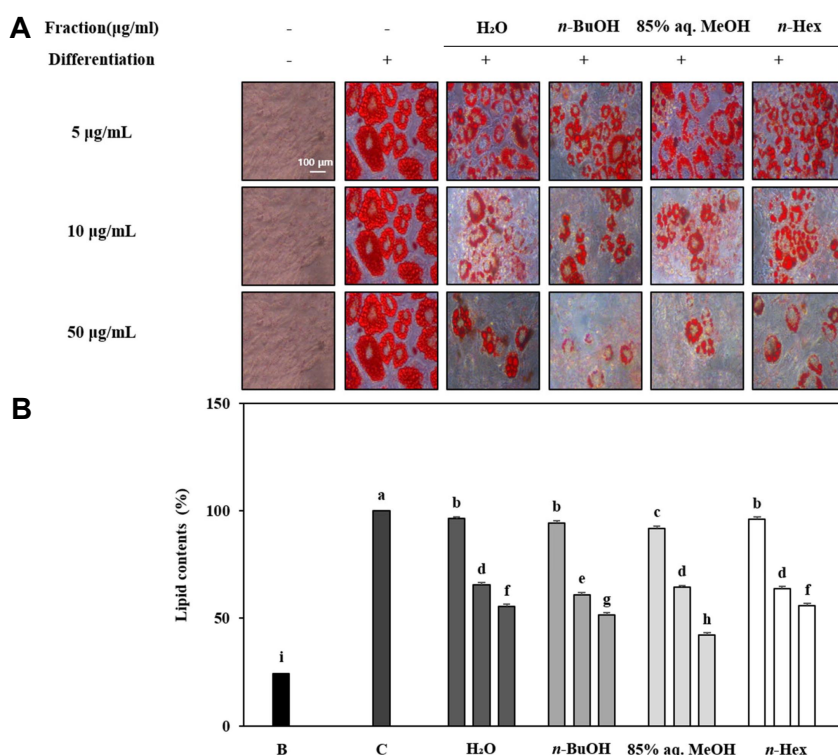


Fig. 6. Effect of *R. rugosa* solvent fractions on 3T3-L1 cell lipid accumulation. Cells were treated with 5, 10, 50 µg/ml *R. rugosa* solvent fractions and differentiated with MDI in 12-well plates. (A) Intracellular lipid content were visualized by a light microscope. (B) The lipid contents were quantified by measuring the absorbance at 500 nm. Data are expressed as a mean \pm SD (n=3). ^{a-i}Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

해당화 분획물의 Oil-Red O 염색

해당화 추출물의 항비만 효과를 확인하였으며, 이를 바탕으로 해당화 분획물의 지질 축적 정도를 3T3-L1 지방전구세포로 측정하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 배양한 후, 100% confluent 상태가 되었을 때 분화유도물질을 처리하

여 지방세포로 분화를 유도시켰다. 분화 초기에는 3일 동안 0.5 mM IBMX, 0.25 μ M dexamethasone, 5 μ g/ml insulin을 처리한 배지로 분화를 유도시켰으며, 분화 촉진을 위해 분화 후기에는 2일 간격으로 5 μ g/ml insulin을 처리한 배지로 교환하여 총 6일 동안 진행되었다. 분화된 지방세

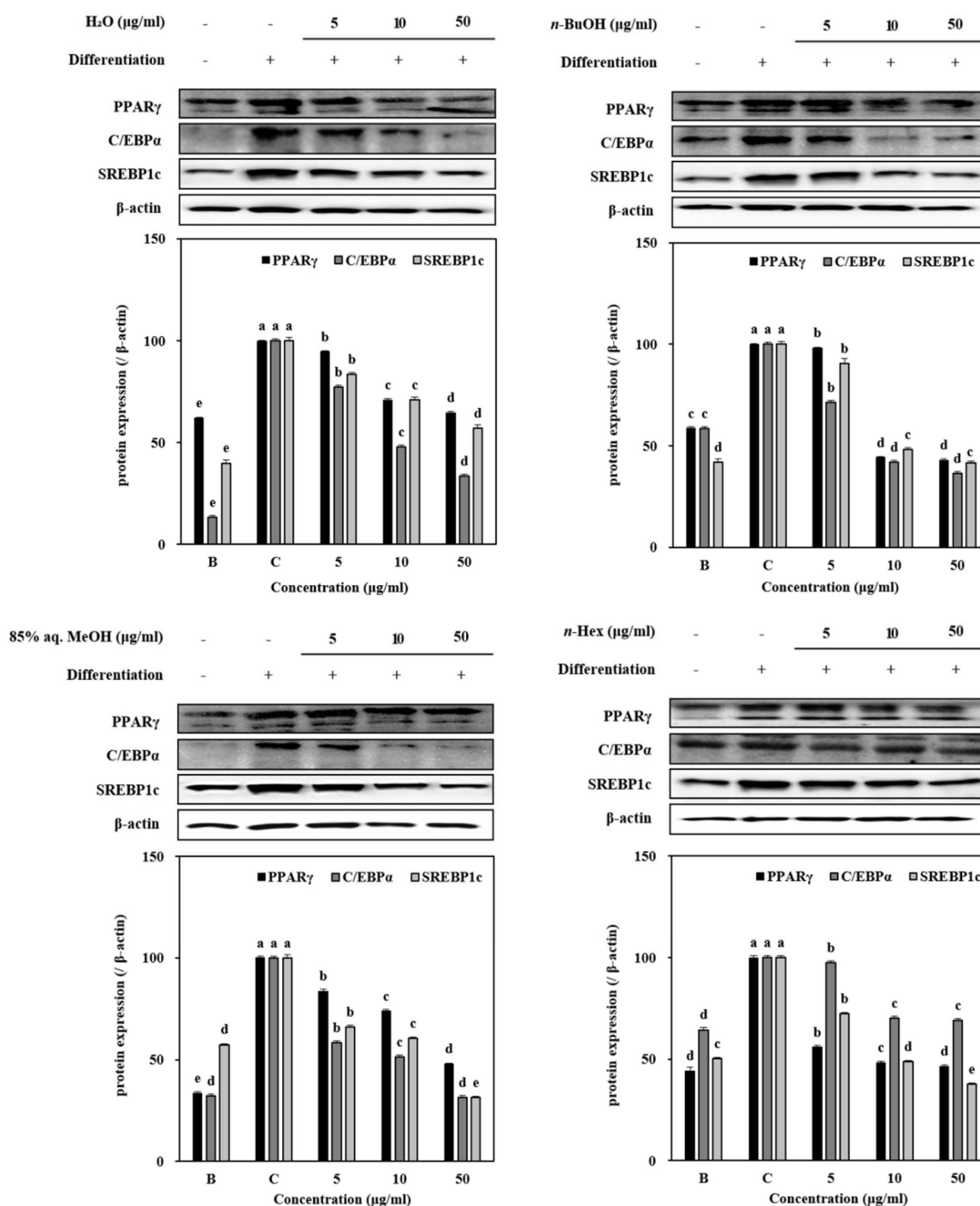


Fig. 7. Effect of *R. rugosa* solvent fractions on adipogenic transcription factors. The expression levels of PPAR γ , C/EBP α and SREBP1c in protein were determined using western blot respectively. Data are expressed as a mean \pm SD (n=3). ^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

포의 지질 축적량을 측정하기 위해 Oil-Red O 염색법을 통해 해당화 분출물의 지방세포분화 억제능을 측정하였다. 그 결과 대조군과 비교했을 때 H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-Hex층은 50 µg/ml에서 각각 55.42, 51.61, 42.18, 55.78%의 억제율을 보였으며, 농도의존적으로 지방세포 생성이 감소하였다(Fig. 6).

해당화 분획물의 지방세포생성 관련 단백질 발현에 미치는 효과

해당화 추출물의 항비만 효과를 확인하였으며, 이를 바탕으로 해당화 분획물의 단백질 발현에 미치는 경향을 확인하기 위해 Western blot을 실시하였다. 지방세포 분화과정에서 발현하는 전사 인자인 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP1c의 단백질 발현에 미치는 경향을 확인하기 위해 3T3-L1

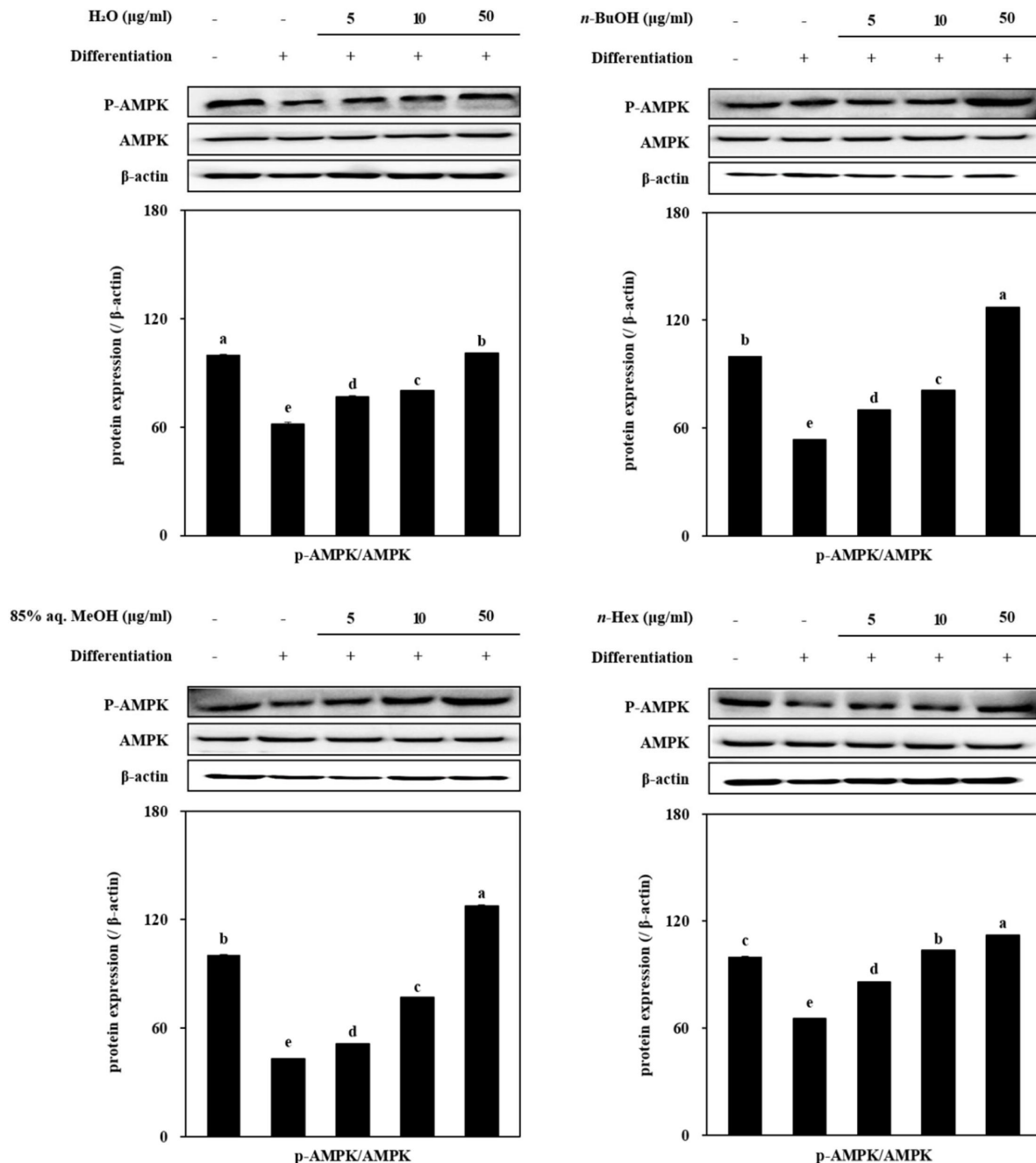


Fig. 8. Effect of *R. rugosa* solvent fractions on the AMPK pathway in protein levels. The expression levels of p-AMPK were determined using Western blot respectively. Data are expressed as a mean \pm SD (n=3). ^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

지방전구세포를 배양한 후, 해당화 추출물을 5, 10, 50 µg/ml 농도별로 처리하여 전사 인자들의 단백질 발현 정도를 관찰하였다. 그 결과 대조군과 비교했을 때 H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-Hex층에서 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP1c의 단백질 발현이 크게 감소하였으며, 농도의존적으로 단백질 발현이 감소된 것을 확인하였다(Fig. 7). 특히 *n*-BuOH, 85% aq. MeOH층에서 가장 효과적으로 단백질 발현이 억제된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 해당화 분획물이 지방세포 분화과정에서 발현하는 전사 인자들의 단백질 발현을 억제함으로써 항비만 효과를 확인할 수 있었다.

해당화 분획물의 AMP-activated protein kinase (AMPK) 신호전달경로에 미치는 효과

해당화 추출물이 AMPK 신호전달경로를 통해서 항비만 효과를 가지는 것을 확인하였으며, 이를 바탕으로 해당화 분획물의 AMPK 신호전달경로를 통한 지방생성억제 효과를 알아보기 위해 Western blot을 실시하였다. AMPK는 에너지의 균형을 조절하는 주요 조절 인자로서 지방산의 산화 및 지방 합성 억제는 AMPK 경로에 의해 조절된다. 조절 경로의 활성화는 AMP의 증가로 인해 지방세포 분화과정에서 발현하는 전사 인자들을 억제함으로써 지질 가수분해 및 지방산 산화를 조절한다. 3T3-L1 지방전구세포를 배양한 후, 해당화 추출물을 해당화 분획물을 5, 10, 50 µg/ml 농도별로 처리하여 단백질 발현 정도를 관찰한 결과, 대조군과 비교하였을 때 H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-Hex층에서 p-AMPK의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며 농도의존적으로 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 8). 특히 *n*-BuOH, 85% aq. MeOH층에서 가장 효과적으로 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 해당화 분획물은 AMPK 신호전달경로를 통해 항비만 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

비만과 관련된 질환 발병률이 증가하고 있으며 이로 인해 국가적으로 의료비 부담 및 삶의 질 저하에 주범이 되고 있다. 이러한 문제를 막기 위해 전 세계적으로 비만 치료제가 개발되고 있으나 부작용이 심해 시판이 중단되거나 장기복용이 금지되고 있는 실정이다. 이로 인해 최근에는 부작용이 적으면서 항비만 효과를 가지는 천연소재를 활용한 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서 사용된 해당화는 염생식물에 속하여 천연소재로서의 의미를 가지며 생리 활성 연구가 보고되어 있으므로 항비만 효과에 대한 연구를 진행하였다. 해당화 추출물 및 분획물 4종 H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-Hex을 활용하여 지방세포의 지질 축적량을 측정 후, 지방세포생성 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 검토하였다. MTT 분석법을 통

해 5, 10, 50 µg/ml 농도로 설정하여 실험을 진행하였으며, Oil-Red O 염색법으로 지방세포의 지질 축적량을 측정하였다. 그 결과 추출물 및 분획물 4종에서 모두 농도의존적으로 감소된 것을 확인하였으며, 특히 85% aq. MeOH층은 다른 분획물층에 비해 큰 억제 효과를 나타내었다. 또한 단백질 발현 정도를 Western blot으로 확인한 결과 추출물 및 분획물 4종에서 모두 농도 의존적으로 감소된 것을 확인하였으며, 특히 *n*-BuOH, 85% aq. MeOH층에서 가장 효과적으로 감소된 것을 확인하였다. 이는 지방세포생성 전사 인자의 활성을 조절하는 AMPK의 인산화가 경로를 통한 것으로 확인이 되었다. 본 연구를 통해 해당화 추출물 및 분획물 4종의 지방생성 억제효과를 확인하였으며, 나아가 지방생성 억제 효과를 가지는 천연 소재의 비만 치료제 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Choi, H. M., Suk, J. M., Yang, C. H., Kim, S. C. and Kim, M. R. 2009. Effects of natural dietary supplement on body weight and lipid metabolism in high fat diet-induced obese mice. *Herb. Formula Sci.* **17**, 133-142.
- Choi, J. H., Banks, A. S., Estall, J. L., Kajimura, S., Bostrom, P., Laznik, D., Ruas, J. L., Chalmers, M. J., Kame-nicka, T. M., Bluher, M., Griffin, P. R. and Spiegelman, B. M. 2010. Obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by cdk5 is a direct target of the anti-diabetic PPAR γ ligands. *Nature* **466**, 451-456.
- Dagon, Y., Avraham, Y. and Berry, E. 2006. M. AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2 α in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 43-47.
- Jeong, H., Kim, H., Ju, E., Kong, C. S. and Seo, Y. 2016. Antioxidant effect of the halophyte *Atriplex gmelinii*. *KSBB J.* **31**, 200-207.
- Jeong, Y. H., Kim, S. Y., Jeong, G. H. and Kim, T. H. 2018. Anti-glycation and radical scavenging activities of *Ligustri fructus* by extraction method. *Kor. J. Herbol.* **33**, 95-100.
- Kim, B. K., Ryu, J. H., Jang, S. O. and Kim, M. H. 2020. Antioxidant activity and cell differentiation effects of *Monascus purpureus* pigment on osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J. Life Sci.* **30**, 468-475.
- Kim, I. S., Yang, M., Lee, O. H. and Kang, S. N. 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT Food Sci. Technol.* **44**, 1328-1332.
- Kim, J. A., Ahn, B. N., Oh, J. H., Fatih Karadeniz, Lee,

- J. I., Seo, Y. W. and Kong, C. S. 2022. *Limonium tetragonum* enhances osteoblastogenesis while suppressing the adipocyte differentiation. *Ocean Polar Res.* **44**, 29-38.
9. Kim, J. S., Kong, C. S., Moon, K. H. and Seo, Y. W. 2020. Inhibitory effects of the halophyte *Ligustrum japonicum* on matrix metalloproteinases activity in PMA-stimulated HT-1080 cells. *J. KSBB.* **35**, 57-63.
10. Kim, M. J., Kim, J. S., Kim, K. E., Shin, K. H., Heo, K., Cho, D. H., Park, C. H. and Yu, C. Y. 2001. Comparison of antioxidative activities from different organs of *Rosa rugosa* Thunb. *KJMCS.* **9**, 40-44.
11. Kong, C. S., Kim, J. A., Bak, S. S., Byun, H. G. and Kim, S. K. 2011. Anti-obesity effect of carboxymethyl chitin by AMPK and aquaporin-7 pathways in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 276-281.
12. Kong, C. S., Lee, J. I., Kwon, M. S. and Seo, Y. W. 2015. Inhibitory effect of crude extracts from a brown alga *Sargassum siliquanstrum* on 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Ocean Polar Res.* **37**, 279-285.
13. Lavie, C. J., Milani, R. V. and Ventura, H. O. 2009. Obesity and cardiovascular disease: Risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J. Am. College Cardiol.* **53**, 1925-1932.
14. Lee, J. I., Kong, C. S., Jung, M. E., Hong, J. W., Noh, I. and Seo, Y. 2011. Peroxynitrite-scavenging activity of the halophyte *Limonium tetragonum*. *Ocean Polar Res.* **33**, 185-191.
15. Lee, M. K., Yu, C. Y., Young, L. S., Lee, J. H. and Lee, H. Y. 2003. Screening of immune enhancement activities of the extracts from *Rosa rugosae* radix. *KJMCS.* **11**, 13-18.
16. Lee, S. B., Keum, D. H. and Lee, M. J. 1996. Oriental and western medical study on the cause and treatment of obesity. *Dongguk J. of the Institute of Oriental Medicine* **5**, 33-52.
17. Otto, T. C. and Lane, M. D. 2005. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **40**, 229-242.
18. Pariza, M. W., Park, Y. and Cook, M. E. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* **40**, 283-298.
19. Park, E. N., Song, J. H., Kim, G. N. and Kim, H. O. 2015. Anti-oxidant and anti-obese effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaf extract in 3T3-L1 cells. *Kor. J. Aesthet Cosmetol.* **13**, 19-26.
20. Park, J. A., Park, C., Han, M. H., Kim, B. W., Chung, Y. H. and Choi, Y. H. 2011. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by aged black garlic extracts in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Life Sci.* **21**, 720-728.
21. Park, M. J. 2005. Recent Advances in regulating energy homeostasis and obesity. *Kor. J. Pediatr.* **48**, 126-137.
22. Rosen, E. D. and MacDougald, O. A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 885-896.
23. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M. and Yoga Latha, L. 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **8**, 1-10.
24. Sun, K., Kusminski, C. M. and Scherer, P. E. 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *J. Clin. Investig.* **121**, 2094-2101.
25. Yang, M. H., Kim, N. H., Heo, J. D., Sung, S. H. and Jeong, E. J. 2014. Hepatoprotective effects of *Limonium tetragonum*, edible medicinal halophyte growing near seashores. *Pharmacogn. Mag.* **10**, 563-568.

초록 : 해당화 추출물이 3T3-L1 지방세포 분화에 미치는 영향

이현정¹ · 양지호¹ · 최미나¹ · 전성은¹ · 주선용¹ · 오정환^{2,3} · 카라데니즈 파티² · 서영완⁴ · 공창숙^{1,2*}

(¹신라대학교 보건복지대학 식품영양학과, ²신라대학교 해양식의약소재융합기술연구소, ³신라대학교 교육대학원 영양교육전공, ⁴한국해양대학교 해양과학융합학부)

비만은 당뇨, 고혈압, 심근경색 등 심혈관 질환을 유발하는 주요 원인으로 이와 관련된 질환의 발병률이 증가하고 있다. 이로 인해 비만 치료 및 예방에 대한 관심이 급증하는 추세이며, 비만 치료제가 전 세계적으로 개발되고 있지만 많은 부작용을 초래하여 시판이 중단되거나 장기복용이 금지되어 있다. 이러한 문제를 막기 위해 부작용이 적으면서 항비만 효과를 가지는 천연 소재를 활용한 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서 사용된 해당화(*Rosa rugosa*)는 장미과에 속하는 낙엽활엽관목으로서 토혈, 하리, 월경과다 등에 이용되고 있으며, 항염증, 항산화 효과, 노화방지, 혈당 강하작용, 혈청 콜레스테롤 수치 저하작용, HIV protease 저해 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 해당화 추출물 및 분획물 4종(H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-Hex)의 지방세포분화에 미치는 효과에 대한 연구를 진행하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로의 분화를 유도하여 Oil-Red O staining으로 지방생성 억제 정도를 측정하였다. 그 결과, 깻완두 추출물 및 분획물 처리군에서 농도 의존적으로 지방세포 형성이 억제되는 것을 확인하였다. 또한 지방세포분화에 관여하는 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP1c와 같은 인자의 mRNA 및 단백질 발현에 미치는 효과를 확인한 결과, 지방세포분화 조절인자의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이는 AMPK 신호전달경로를 통한 지방분화인자의 억제를 통한 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구결과로부터 해당화 추출물 및 분획물의 항비만 효과를 확인하였으며, 나아가 비만 치료제의 소재로 개발될 수 있는 가능성을 제시할 것으로 기대된다.