



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 석사 학위논문

갯완두 추출물이 3T3-L1  
지방세포분화에 미치는 효과

Effect of *Lathyrus japonicus* on adipogenesis  
differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes

2023년 8월

신라대학교 일반대학원

식품영양학과

이 현 정

이학 석사 학위논문

갯완두 추출물이 3T3-L1  
지방세포분화에 미치는 효과

Effect of *Lathyrus japonicus* on adipogenesis  
differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes

지도교수 공 창 숙

이 논문을 이학 석사 학위논문으로 제출함

2023년 6월

신라대학교 일반대학원

식품영양학과

이 현 정

# 이현정의 이학 석사 학위논문을 인준함

2023년 6월

위 원 장 김 미 향 (인)

위 원 김 미 정 (인)

위 원 공 창 숙 (인)

신라대학교 일반대학원

## 갯완두 추출물이 3T3-L1 지방세포분화에 미치는 효과

이 현 정

신라대학교 일반대학원

식품영양학과

비만은 지방 조직이 과도하게 축적된 상태를 말하며 고지혈증, 당뇨, 심근경색, 고혈압 등과 같은 심혈관 질환을 유발하는 주요 원인으로 이와 관련된 질환의 발병률은 갈수록 증가하고 있는 추세이다. 노령화 사회로 접어드는 시점에서 비만은 국가적인 의료비 증가 및 경제활동 인구의 감소를 일으켜 사회적 손실이 발생하고 있다. 이러한 문제를 막기 위해서 비만 치료를 위한 다양한 종류의 비만 치료제가 개발되고 있으나, 대부분 과도한 신경계 자극을 일으켜 부작용을 초래하는 것으로 보고되었다. 이로 인해 최근에는 부작용이 적으면서 지방 억제 효과가 있는 천연 소재를 이용한 연구가 진행되고 있다. 갯완두(*Lathyrus japonicus*)는 콩과에 속하는 여러해살이풀로서 국내 해안 사구에 서식하는 염생식물의 일종이다. 갯완두는 열매보다 잎과 줄기를 사용하여 약재로 쓰이며 민간요법에서는 소화제, 이뇨제, 해독제, 건위제, 소염제 등으로 사용되어왔다. 이 외에도 우황청심환의 원료 식물로 쓰이며 산후병에 사용하는 등 다양한 약효를 가지고 있음에도 불구하고 생리활성에 관한 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 갯완두 추출물 및 분획물 4종( $H_2O$ , *n*-butanol, 85% aq. methanol, *n*-hexane)을 사용하여 항비만 효과를 확인하고자 하였다. 3T3-L1 마우스 지방전구세포를 이용하여 지방세포로의 분화를 유도한 후, Oil Red O 염색법으로 지방세포의 지질축적량을 측정하였다. 그 결과, 갯완두 추출물 및

분획물 단계에서 농도 의존적으로 지질축적량이 감소된 것을 확인하였다. 또한 지방세포생성에 관여하는 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 SREBP1c 인자를 유전자 및 단백질 수준에서 발현에 미치는 효과를 확인한 결과, 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 지방세포분화에 관여하는 것으로 알려져 있는 MAPK 및 AMPK 신호전달경로를 단백질 수준에서 확인하였다. MAPK 경로에서는 갯완두 추출물 및 분획물 단계에서 ERK, JNK 및 p38의 인산화가 억제되는 것을 확인하였으며, MAPK 경로에서는 갯완두 추출물과 분획물 4종 중 H<sub>2</sub>O, 85% aq. methanol, *n*-hexane층에서 AMPK의 인산화 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구결과를 통해서 갯완두 추출물 및 분획물의 지질 축적 억제 효과를 확인하였으며, 나아가 항비만 효능 기능성 소재로서의 개발 가능성이 있는 것으로 기대된다.

**주제어:** 갯완두, 비만, 염생식물, 지방세포분화, 3T3-L1

# 목 차

제1장 서 론 .....	1
제1절 비만 .....	1
제2절 염생식물 .....	5
제2장 실험 재료 및 방법 .....	6
제1절 실험 재료 .....	6
1. 실험 재료 .....	6
2. 추출 방법 .....	6
제2절 실험 방법 .....	8
1. 세포배양 .....	8
2. 세포독성평가 .....	8
3. 지방세포분화 .....	8
4. Oil Red O staining .....	10
5. 역전사 중합 효소 연쇄 반응(RT-PCR) .....	10
6. Western blot 분석 .....	12
7. 통계 처리 .....	13
제3장 결과 및 고찰 .....	14
제1절 갯완두 추출물이 지방세포분화에 미치는 효과 .....	14
1. 갯완두 추출물의 세포독성평가 .....	14
2. 갯완두 추출물의 지방세포 분화에 미치는 효과 .....	16

3. 갯완두 추출물이 지방세포생성 관련 mRNA 발현에 미치는 효과 .....	18
4. 갯완두 추출물이 지방세포생성 관련 protein 발현에 미치는 효과 .....	20
5. 갯완두 추출물이 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로에 미치는 효과 .....	22
6. 갯완두 추출물이 AMP-activated protein kinase (AMPK) 경로에 미치는 효과 .....	24
 제2절 갯완두 분획물이 지방세포분화에 미치는 효과 .....	26
1. 갯완두 분획물의 세포독성평가 .....	26
2. 갯완두 분획물의 지방세포 분화에 미치는 효과 .....	28
3. 갯완두 분획물의 지방세포생성 관련 mRNA 발현에 미치는 효과 .....	30
4. 갯완두 분획물의 지방세포생성 관련 protein 발현에 미치는 효과 .....	32
5. 갯완두 분획물이 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로에 미치는 효과 .....	34
6. 갯완두 분획물이 AMP-activated protein kinase (AMPK) 경로에 미치는 효과 .....	36
 제4장 결 론 .....	38
 참고문헌 .....	40
 Abstract .....	45



## <List of Figures>

<Fig. 1> Adipogenesis progression in 3T3-L1 pre-adipocytes .....	03
<Fig. 2> Adipogenesis signaling pathway .....	04
<Fig. 3> Procedure scheme of crude extract and solvent fractions from <i>L. japonicus</i> .....	07
<Fig. 4> Adipocyte differentiation and treated with <i>L. japonicus</i> .....	09
<Fig. 5> Cytotoxicity of <i>L. japonicus</i> crude extract .....	15
<Fig. 6> Effect of <i>L. japonicus</i> crude extract on the intracellular lipid accumulation of 3T3-L1 cells .....	17
<Fig. 7> Effect of <i>L. japonicus</i> crude extract on the expression of key adipogenesis transcriptional factors in mRNA expression levels .....	19
<Fig. 8> Effect of <i>L. japonicus</i> crude extract on the expression of key adipogenesis transcriptional factors in protein expression levels .....	21
<Fig. 9> Effect of <i>L. japonicus</i> crude extract on the MAPK pathway in protein levels .....	23
<Fig. 10> Effect of <i>L. japonicus</i> crude extract on the AMPK pathway in protein levels .....	25
<Fig. 11> Cytotoxicity of <i>L. japonicus</i> solvent fractions .....	27
<Fig. 12> Effect of <i>L. japonicus</i> solvent fractions on the intracellular lipid accumulation of 3T3-L1 cells .....	29
<Fig. 13> Effect of <i>L. japonicus</i> solvent fractions on the expression of key adipogenesis transcriptional factors in mRNA expression levels .....	31
<Fig. 14> Effect of <i>L. japonicus</i> solvent fractions on the expression of key adipogenesis transcriptional factors in protein expression levels .....	33
<Fig. 15> Effect of <i>L. japonicus</i> solvent fractions on the MAPK pathway in protein levels .....	35
<Fig. 16> Effect of <i>L. japonicus</i> solvent fractions on the AMPK pathway in protein levels .....	37

## <List of Table>

<Table 1> Specific genes primer used for the RT-PCR .....	12
---	----

# 제1장 서론

## 제1절 비만

비만은 에너지 소비량과 에너지 섭취량 사이의 불균형에 의해 지방 조직이 과도하게 축적되어 발생하며 고지혈증, 당뇨, 심근경색, 고혈압 등을 포함한 심혈관 질환을 유발하는 주요 원인이다[1]. 세계보건기구에서는 전 세계 사망원인 1위가 2019년을 기준으로 협심증 및 심근경색 등을 포함한 심혈관 질환이며 사망자 중에서 약 16%가 사망 원인이 심혈관 질환인 것으로 발표하였다[2]. 우리나라의 경우에는 서구화된 식습관 및 생활환경의 변화 등으로 인하여 비만율이 지속적으로 증가하고 있으며, 2020년 기준 비만율이 약 38%로 3명 중 1명은 비만으로 보고되어 있다[3]. 따라서 비만으로 인한 관련 질환 발병률이 증가하고 있으며 노령화 사회로 접어드는 단계에서 비만은 국가적인 의료비 부담과 삶의 질 저하에 주범이 되고 있다[4]. 이러한 문제를 막기 위해 전 세계에서 비만 예방 및 치료에 대한 관심이 급증하고 있다[5,6]

항비만 소재 개발 연구를 위해 *in vitro* model system에는 mouse embryo fibroblast에서 유래된 3T3-L1 지방전구세포가 가장 많이 사용되며 1974년 Howard Green이 제시한 *in vitro* model이다[7,8,9]. 지방세포는 에너지를 지방으로 저장하여 지방조직을 주로 이루는 세포이며 지방조직의 증가는 지방세포 수의 증가와 지질 축적에 의한 지방세포 크기의 증가에 의해 발생한다[6,10]. 지방세포의 역할은 지방산 저장 및 분비, 간과 체내 당 대사 조절뿐만 아니라 지방세포에서 분비되는 여러 신호전달물질과 호르몬을 통해 다양한 체내 활성조절을 통제한다[7]. 지방세포가 되기 전 단계인 3T3-L1 마우스 지방전구세포를 배양한 후 100% confluence 상태가 되었을 때 IBMX (3-isobutylmethylxanthine), dexamethasone, insulin 등과 같은 분화유도물질들을 처리하여 성숙한 지방세포로 분화를 유도시킨다. 이 과정에서 세포의 모양이 변화하며 지방세포생성 관련 전사 인자의 발현이 활성화되어 지방세포의 특이 유전자 발현이 발생하며, signaling pathway를 통해 지방세포분화가 조절된다. 이후부터는 insulin만 첨가하여 지방세포로의 분화를 촉진시켜 현미경으로 관찰할 수 있다[11,12]. 지방세

포분화는 분화 전사 인자의 상호작용에 의해 초기, 중기, 후기 단계별로 진행되는 데 PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ), C/EBP $\alpha$  (CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ ) 및 SREBP1c (sterol regulatory element binding transcriptional regulatory factor 1c)와 같은 지방세포생성 관련 전사 인자들이 성숙한 지방세포로의 분화를 유도시킨다[13,14]. PPAR은 peroxisome proliferator를 ligand로 작용하는 핵 호르몬 수용체로서 에너지와 지질 대사를 조절하는 주요 전사 인자이다. PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  및 PPAR $\delta$  유형으로 존재하며 이 중에서 비만과 관련하여 가장 많이 연구되는 전사 인자는 PPAR $\gamma$ 이며, 지방 조직생성 및 지방산 대사 조절 등의 기능을 가지는 지방세포분화에 가장 중요한 요소로 보고되어 있다. C/EBP $\alpha$ 는 지방세포 증식과 인슐린 민감도의 향진에 관여하는 전사 인자로서 지방세포분화 초기 단계에 C/EBP $\delta$ 와 C/EBP $\beta$ 의 발현이 유도되어 C/EBP $\alpha$ 가 발현되며, 이는 PPAR $\gamma$ 와 상호작용을 하여 지방세포분화의 형성을 촉진시킨다. SREBP1c은 콜레스테롤의 농도에 따라 조절되는 sterol regulatory element 결합 단백질로서 콜레스테롤 대사 및 지방산 대사에 관여하는 유전자들의 발현을 조절한다[15,16].

또한 MAPK는 세포 내 주요 신호전달경로로서 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 한다. MAPK의 주요 경로로는 ERK, JNK 및 p38 kinase가 존재하며, 분화 초기 단계에서 활성화되어 지방생성 관련 인자들의 발현을 억제시킨다. ERK는 세포 외 신호 조절, 세포분열 및 분화에 관여하며 외부 자극으로부터 오는 스트레스로 인한 세포 반응을 통해서 JNK와 p38이 활성화된다[17,18,19]. AMPK는 세포 내 에너지 항상성을 유지하는 효소로서 지질 대사 조절에 중요한 역할을 한다. AMPK는 AMP의 증가로 인해 활성화되어 지방세포분화 관련 전사인자들의 발현을 억제함으로써 지방산의 산화를 증가시키거나 지방 합성을 억제시킨다[20,21,22]. 이처럼 MAPK 및 AMPK는 지방세포생성 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며 항비만 효능 기능성 소재로서의 개발을 위해서 지방세포로의 분화 과정에 관여하는 지방세포 관련 전사인자 및 신호전달경로에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다[23,24,25].

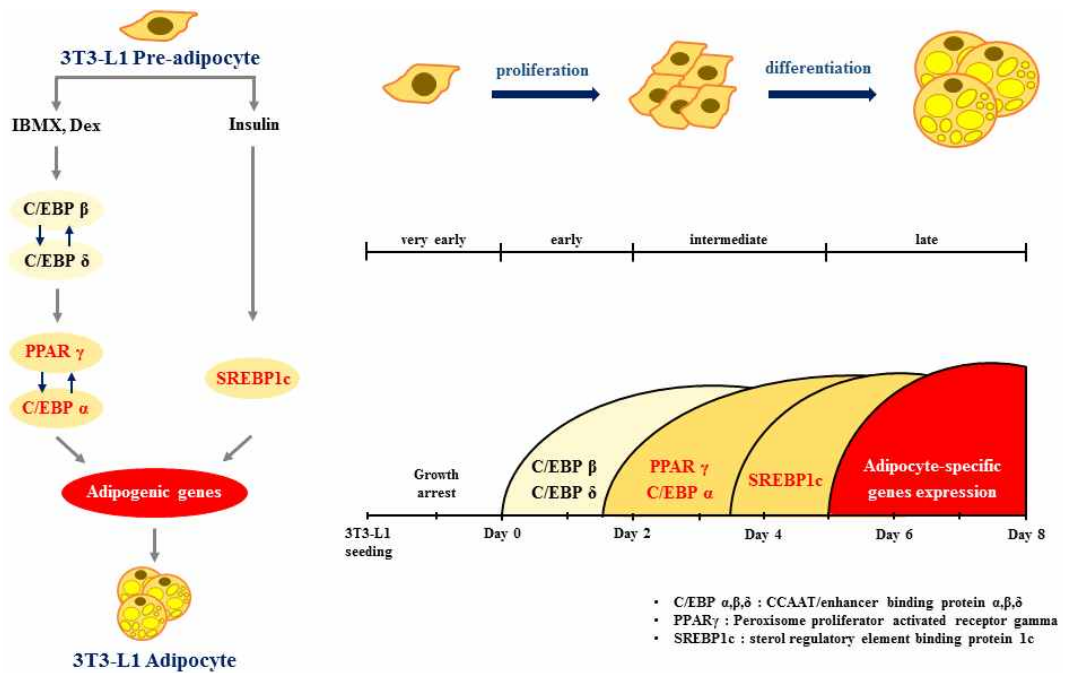


Fig. 1. Adipogenesis progression in 3T3-L1 pre-adipocytes. Adipocyte differentiation is characterized by the sequential changes in expression of adipogenesis specific genes that induce the differentiation of the pre-adipocytes into mature adipocytes.

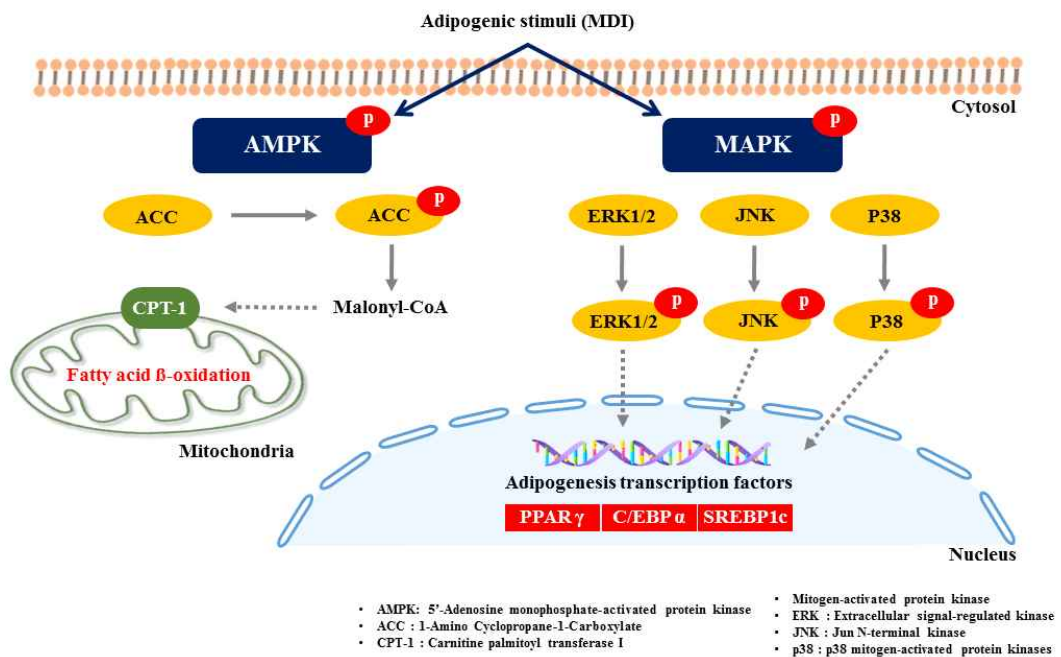


Fig. 2. Adipogenesis signaling pathway. The cascade of MDI signaling is divided into two main pathways.

## 제2절 염생식물

비만 치료를 위한 여러 종류의 비만 치료제가 계속해서 개발되고 있으나 대부분 과도한 신경계 자극을 일으켜 부작용들을 초래하여 시판이 중단되거나 장기복용을 금지하고 있는 실정이다. 이로 인해 최근에는 부작용이 적으면서 생리 활성 기능을 가지는 천연 소재에 관한 연구들이 활발하게 진행되고 있다[26,27,28].

우리나라는 서남해안을 중심으로 수많은 해안 습지가 발달되어 있으며, 해안습지의 높은 지면에 바닷물이 유입되면 염분에 잘 견디는 식물들이 생장하기 시작한다[29,30]. 이와 같이 해안가, 염전 주변 및 염생 습지 등 염분의 농도가 높은 지역에서 생육하는 식물을 염생식물이라고 한다. 국내에는 염생식물이 49과 110여종이 자생하는 것으로 보고되어 있으며, 특히나 서남해안 갯벌 상부 지역에는 군락이 잘 발달 되어 있다. 대표적인 종으로는 갯질경, 나문재, 칠면초, 비쭉 등이 있으며 강한 자외선, 해풍 및 염분농도가 매우 높은 환경에 적응된 염생식물들의 세포 안에는 많은 염분이 들어있어 이를 배출하며 염분농도를 낮춰 삼투압을 조절한다[31,32,33]. 생육 조건이 어려운 환경에서 자라는 염생식물은 기존의 육상 식물들과는 다르게 독특하고 다양한 2차 대사산물을 생산한다[34,35]. 또한 염생식물은 갯벌 형성 촉진, 해안침식 방지 및 오염물질 정화 등 다양한 역할을 수행하고 있다. 이로 인해 염생식물을 소재로 한 항비만, 항염증, 항암 등과 관련된 생리 활성 물질 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[36,37,38].

갯완두(*Lathyrus japonicus*)는 콩과에 속하는 여러해살이풀로서 국내 해안 사구에 서식하는 염생식물의 일종이다. 길이는 약 60 cm로 꽃은 붉은 자주색이며 열매보다 잎과 줄기를 사용하여 약재로 쓰인다. 민간요법에서는 소화제, 이뇨제, 해독제, 건위제, 소염제 등으로 사용되고 있으며, 이 외에도 우황청심환의 원료 식물로 쓰이거나 산후병에 사용하는 등 다양한 약효를 가지고 있다[39,40]. 또한 갯완두는 선행 연구를 통해 항산화 물질 및 다양한 플라보노이드 성분이 다량 함유되어 있는 것으로 보고되어 있으나 항비만과 관련된 연구는 아직 보고되어 있지 않다[41,42,43].

따라서 본 연구에서는 염생식물에 속하는 갯완두를 이용하여 항비만 효능 기능성 소재로서의 개발 가능성에 대한 연구를 진행하고자 하였다.

## 제2장 실험 재료 및 방법

### 제1절 실험 재료 및 방법

#### 1. 실험 재료

본 연구에 사용한 갯완두(*Lathyrus japonicus*)는 강원도 양양군 강현면 주청리에서 채집하였으며, 한국해양대학교에서 제공받아 실험에 사용하였다.

#### 2. 추출 방법

음지에서 건조한 갯완두를 methylene chloride ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )에 침지시켜 실온에서 24시간동안 방치한 후 여과하였다. 남은 잔사에 동량의 methanol을 사용하여 동일한 방법을 반복해서 얻은 추출액을 여과한 후, 회전 증발 농축기로 감압 농축해서 추출물을 제조하였다. 또한 추출물을 용매 극성에 따라  $\text{H}_2\text{O}$ , *n*-butanol, 85% aq. methanol 및 *n*-hexane으로 순차적 분획하여 분획물 4종을 획득하였다.



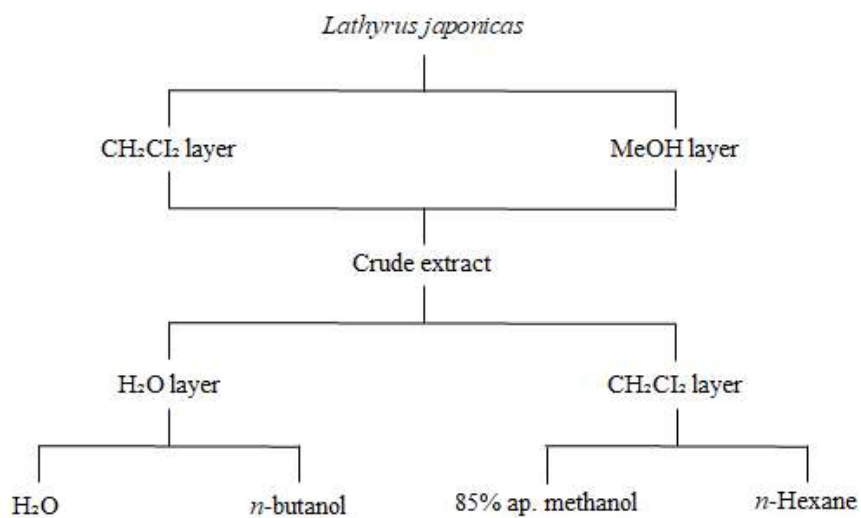


Fig. 3. Procedure scheme of crude extract and solvent fractions from *L. japonicus*.

## 제2절 실험 방법

### 1. 세포배양

3T3-L1 마우스 지방전구세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 분양 받아 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (Welgene, Korea)와 1% L-Glutamine penicillin streptomycin solution (Gibco™, USA)을 처리한 Dulbecco's modified Eagle's medium (Welgene, Korea)을 사용하고 5% CO<sub>2</sub>, 37℃로 배양조건을 설정하여 incubator에서 세포를 배양하였다.

### 2. 세포독성평가

세포독성평가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay로 측정하였다. 3T3-L1 마우스 지방전구세포를 96 well cell plate에  $1 \times 10^5$  cell/well의 밀도로 24시간 배양하여 새로운 배지에 갯완두 추출물 및 분획물 4종을 각각 농도별로 처리한 후, 추가적으로 24시간 동안 배양하였다. 배지 제거 후 MTT 시약을 100  $\mu$ L씩 처리하고 동일한 조건에서 4시간 동안 배양했으며, 배양 후 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide로 10분동안 용해하여 540 nm에서 흡광도 측정을 하였다.

### 3. 지방세포분화

3T3-L1 마우스 지방전구세포를 12-well plate에 배양한 후, 100% 융합되었을 때 분화유도배지로 교체하여 농도별로 처리하였다. 분화유도배지에는 0.25  $\mu$ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 5  $\mu$ g/mL insulin을 처리하여 3일 동안 분화를 유도시켰으며, 분화유도 촉진을 위해 2일 간격으로 insulin이 처리된 배지로 교환하여 6일 동안 진행되었다[11].

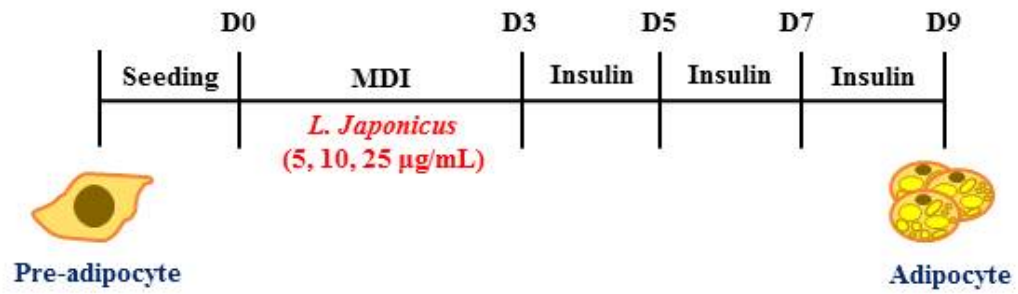


Fig. 4. 3T3-L1 predipocytes treated with *L. japonicus* (5, 10, 25 µg/mL) were induced to differentiation for 9 days.

#### 4. Oil Red O 염색

3T3-L1 마우스 지방전구세포를 지방세포로의 분화를 유도한 후, 지질 축적량 측정을 위해 Oil Red O 염색법을 통해서 확인하였다. 분화된 세포를 PBS로 세척한 후, 4% formaldehyde 용액으로 상온에 고정시켜서 Oil Red O solution을 처리하여 30분 동안 염색하였다. Oil Red O solution을 제거하여 PBS로 세척하고 현미경으로 염색된 지방구를 관찰하였다. 또한 정량적 측정을 위해 2-propanol(Sigma, USA)을 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5. 역전사 중합 효소 연쇄 반응(RT-PCR)

3T3-L1 마우스 지방전구세포를 6-well plate에 배양하여 깃완두 추출물 및 분획물 4종을 각각 농도별로 처리하여 지방세포로의 분화를 유도시켰다. 분화된 세포를 PBS로 세척하고 QIAzol lysis reagent (QIAGEN, USA)를 처리하여 eppendorf tube에 세포를 회수하였다. 회수한 세포에 Chloroform (Sigma, USA)을 첨가하여 15분 동안 4℃에서 13,000 rpm으로 원심 분리한 후, 상층액을 회수하여 새로운 eppendorf tube에 2-propanol을 혼합하여 원심 분리하였다. 침전된 RNA에는 저온의 75% ethanol로 세척하여 건조시킨 후, DEPC water로 RNA를 녹여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA에 Oligo dT를 첨가하여 70℃에서 5분 동안 반응시킨 후 냉각시키고 reverse transcription 1X RT buffer, 140 U M-MLV(reverse transcriptase), 1 mM dNTPs, DEPC water를 혼합하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다[22]. 합성된 cDNA에 지방세포생성 관련 주요 전사 인자로 알려진 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , SREBP1c primer를 사용하였으며, internal control을 위해  $\beta$ -actin을 사용하였다(Table 1). T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) denaturation, 60℃에서 45초 동안 annealing, 72℃에서 1분 동안 extension시키는 cycle을 34회 반복한 뒤, 72℃에서 5분 동안 extension시키고 4℃에서 종결하였다. 1X tris-acetate-EDTA buffer (Biosesang, Korea)를 사용하여 1.5% agarose gel에 loading하여 100 V에 10분 동안 전기영동 후, ethidium bromide (AMRESCO, USA)에 20분 동안 염색하여 mRNA 발현을 확인하였다[44].

Table 1. Specific gene primers used for the RT-PCR

Gene	Direction	Sequence
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Forward	5'-TTT-TCA-AGG-GTG-CCA-GTT-TC-3'
	Reverse	5'-AAT-CCT-TGG-CCC-TCT-GAG-AT-3'
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b>	Forward	5'-AGG-GAA-AGC-TTT-GGG-GTC-TA-3'
	Reverse	5'-TGT-TGG-CAT-CCT-GCT-ATC-TG-3'
<b>SREBP1c</b>	Forward	5'-GGC-TGG-CGA-CAT-ACA-GTA-CA-3'
	Reverse	5'-TTA-CAA-CAG-GCC-AGG-TTT-CC-3'
<b><math>\beta</math>-actin</b>	Forward	5'-CCA-CAG-CTG-AGA-GGG-AAA-TC-3'
	Reverse	5'-AAG-GAA-GGC-TGG-AAA-AGA-GC-3'

## 6. Western blot 분석

3T3-L1 마우스 지방전구세포를 6-well plate에 배양하여 갯완두 추출물 및 분획물 4종을 각각 농도별로 처리하여 지방세포로의 분화를 유도시켰다. 분화된 세포를 PBS로 세척하여 RIPA buffer (Sigma USA)를 500  $\mu$ L씩 처리한 후 단백질을 추출하였다. 정량한 단백질은 SDS-PAGE법으로 전기영동하여 분리한 후 Nitrocellulose Blotting Membrane (Amersham protran Biotech, Germany)에 transfer 하였으며, 1시간 동안 5% skim milk로 bloking하여 1X tris buffered saline with tween-20 buffer (TBS-T)로 10분간 3회 반복하여 세척하였다. 1차 항체의 반응을 위해서 TBS-T에 희석한 후, 4℃에서 overnight하여 TBS-T로 10분간 3회 반복하여 세척하였다. 또한 상온에서 2차 항체를 1시간 동안 반응시킨 후, TBS-T로 10분간 3회 반복하여 세척하였다. 2차 항체의 horseradish peroxidase (HRP)를 활성화시키기 위해 ECL solution으로 단백질 발현을 확인하였다[44].

## 7. 통계 처리

모든 실험 결과는 각 그룹별 나누어 Mean  $\pm$  Standard deviation deviation, (평균 $\pm$ 표준편차, n=3)로 산출 및 SPSS+/Win12.0 프로그램을 이용하여 통계분석하였다. 결과의 유의성 검증을 위해 일원배치 분산분석(Oneway Analysis Of Variance: ANOVA)을 진행하였으며, 각 구간의 유의성 차이를  $p < 0.05$  에서 Duncan's multiple range test로 비교 분석하였다[45].

## 제3장 결과 및 고찰

### 제1절 갯완두 추출물이 지방세포분화에 미치는 효과

#### 1. 갯완두 추출물의 세포독성평가

갯완두 추출물이 3T3-L1 마우스 지방전구세포의 독성에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 사용하여 확인하였다. 3T3-L1 마우스 지방전구세포를 96-well plate에 배양한 후, 갯완두 추출물을 각각 1, 5, 10, 15, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 세포생존율을 확인하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때 1, 5, 10, 15, 25  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 90% 이상의 생존율을 보였으며, 50  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 89.36%의 세포 생존율을 보였다(Fig. 4). 따라서 90% 이상의 세포 생존율을 보이는 농도(5, 10, 25  $\mu\text{g/mL}$ )를 선정하여 이후 실험을 진행하였다.



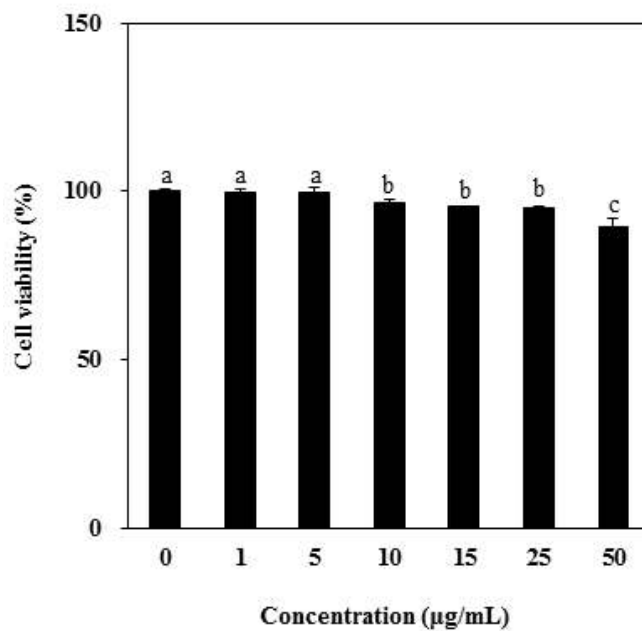
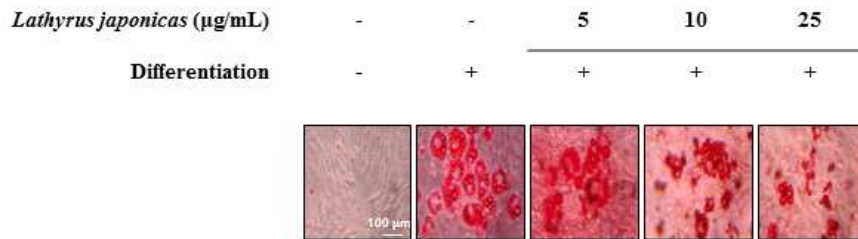


Fig. 5. Effect of crude extract from *L. japonicus* with different concentrations on viability of 3T3-L1 cells. Cell viability was determined by MTT assay. <sup>a-c</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P<0.05$ ).

## 2. 갯완두 추출물의 지방세포 분화에 미치는 효과

지방세포로의 분화가 유도된 3T3-L1 세포에 갯완두 추출물 5, 10, 25  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 후, 중성지방을 단색으로 염색하는 Oil red O 염색법을 이용하여 지방세포의 분화 억제능을 측정하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때 5, 10, 25  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 각각 79.58, 71.08, 59.59%의 지방 생성율을 보였으며, 농도의존적으로 지방생성률이 감소하였다(Fig. 5). 또한 현미경으로의 관찰에서도 농도의존적으로 염색된 중성지방이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 갯완두 추출물 처리에 의해 지방세포생성이 감소되었으므로 항비만 효과를 확인할 수 있었다.

(A)



(B)

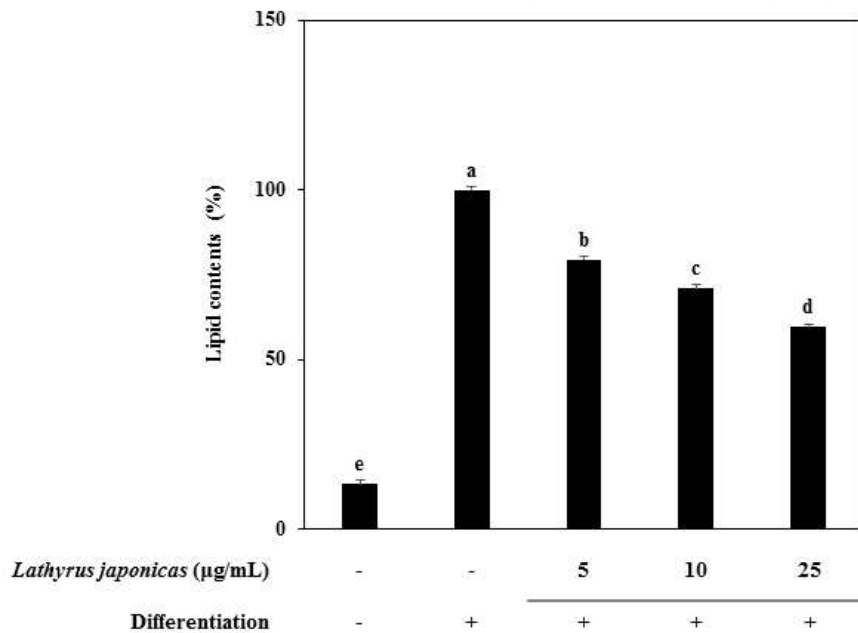


Fig. 6. The effect of crude extract from *L. japonicus* on triglycerides in 3T3-L1 cells. The 3T3-L1 cells were treated with *L. japonicus* containing various concentrations for 8 days. (A) Lipid accumulation were visualized by a light microscope. (B) The lipid area ratio (%) were quantified by measurement the absorbance at 500 nm. <sup>a-e</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P<0.05$ ).

### 3. 갯완두 추출물이 지방세포생성 관련 mRNA 발현에 미치는 효과

지방세포생성 관련 전사인자인 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 SREBP1c의 mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하기 위해 RT-PCR 방법을 통해 확인하였다. 지방세포로의 분화가 유도된 세포에 갯완두 추출물 5, 10, 25  $\mu$ g/mL 농도로 처리하여 지방세포생성에 관여하는 주요 전사인자들의 mRNA 발현 정도를 측정하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 SREBP1c의 mRNA 발현이 감소된 것을 확인하였으며 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 6). 양성 대조군으로 사용된 genistein은 대두에 다량으로 함유되어있는 이소플라본의 일종으로, 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포로의 증식 및 지질 축적을 억제하는 역할을 한다. 뿐만 아니라 genistein은 신호전달과정을 통해 지방조직의 생성을 억제하는 것으로 보고되어 있으므로 갯완두 추출물과 비교하여 양성대조군에 대비한 지방세포생성 억제 효과를 확인하였다. 25  $\mu$ M의 genistein을 사용하였으며, PPAR $\gamma$  및 SREBP1c mRNA 발현에서는 양성대조군보다 갯완두 추출물을 처리하였을 때 더 높은 지방세포생성 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 따라서 갯완두 추출물이 지방세포생성 관련 전사 인자들의 mRNA 발현을 억제함으로써 지방세포생성 억제 효과를 확인할 수 있었다.

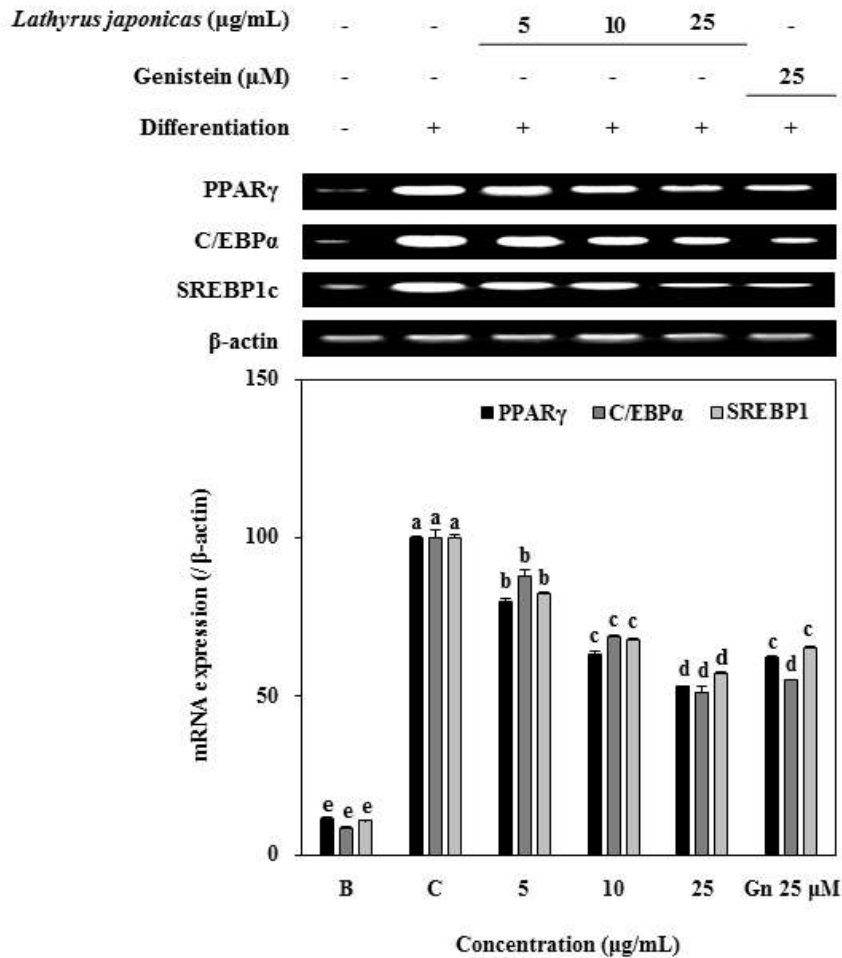


Fig. 7. Effect of crude extract from *L. japonicus* on mRNA expression levels of adipogenesis transcriptional factors in 3T3-L1 cells. The expression levels of PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  and SREBP1c in mRNA were determined using RT-PCR, respectively. <sup>a-e</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P < 0.05$ ).

#### 4. 갯완두 추출물이 지방세포생성 관련 protein 발현에 미치는 효과

mRNA 발현에서의 결과를 확인한 후 protein 수준에서의 발현을 확인하였다. 지방세포생성 관련 전사인자인 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 SREBP1c의 protein 발현에 미치는 영향을 측정하기 위해 Western blot 방법을 통해 확인하였다. 양성 대조군으로는 genistein을 사용하여 갯완두 추출물과 비교하여 양성대조군에 대비한 지방세포생성 억제 효과를 확인하였다. 지방세포로의 분화가 유도된 세포에 갯완두 추출물 5, 10, 25  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 후, 지방세포생성에 관여하는 주요 전사인자들의 protein 발현 정도를 관찰하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 SREBP1c의 protein 발현이 감소된 것을 확인하였으며 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 7). 양성 대조군으로 사용된 25  $\mu\text{M}$  genistein과 비교하였을 때, 지방세포생성 관련 전사인자들의 protein 발현 수준이 갯완두 추출물의 최고 농도에서 유사한 지방세포생성 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 따라서 갯완두 추출물이 지방세포생성 관련 전사 인자들의 protein 발현을 억제함으로써 지방세포생성 억제 효과를 확인할 수 있었다.

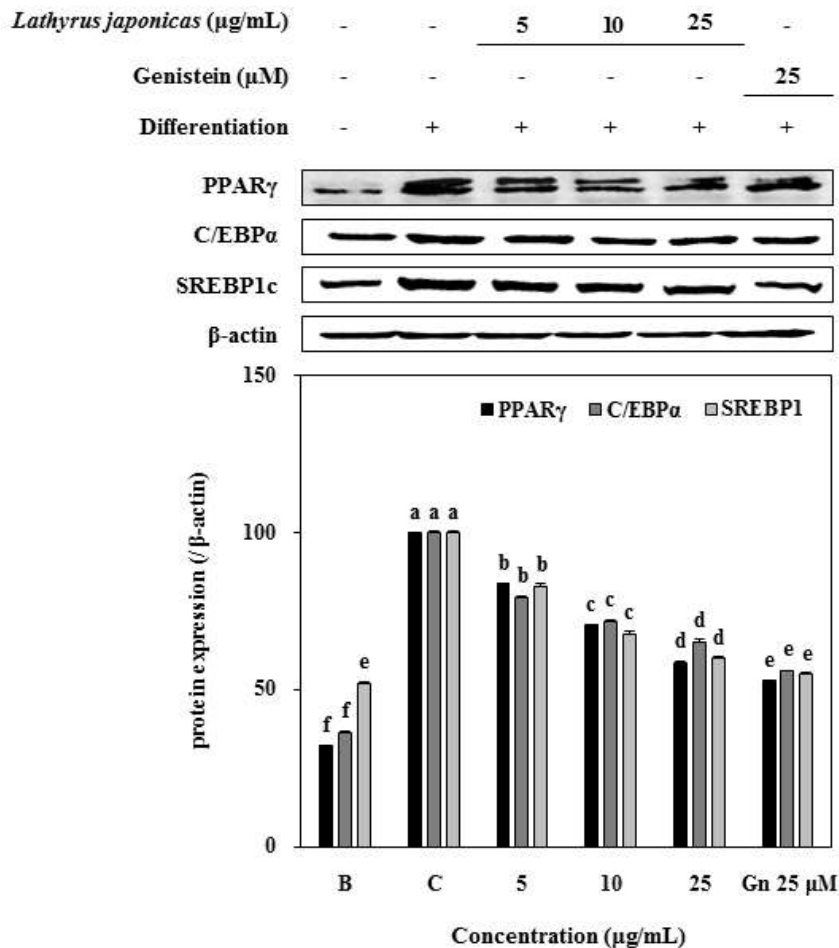


Fig. 8. Effect of crude extract from *L. japonicus* on protein expression levels of adipogenesis transcriptional factors in 3T3-L1 cells. The expression levels of PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  and SREBP1c in protein were determined using western blot, respectively. <sup>a-f</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P < 0.05$ ).

## 5. 갯완두 추출물이 Mitogen activated protein kinase (MAPK) 경로에 미치는 효과

갯완두 추출물의 지방생성억제 효과를 확인하였으며, 이 결과를 바탕으로 갯완두 추출물의 MAPK 신호전달경로를 통한 항비만 효과를 확인하기 위해 MAPK 발현에 미치는 영향을 western blot 방법을 통해 확인하였다. 양성 대조군으로 사용된 genistein은 신호전달경로를 통해서 지방조직의 생성을 억제하는 것으로 보고되어 있으므로, 갯완두 추출물과 비교하여 양성대조군에 대비한 MAPK 신호전달경로에 미치는 지방생성억제 효과를 함께 확인하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때 ERK, JNK 및 p38의 인산화 발현이 억제된 것을 확인하였으며, 농도 의존적으로 protein 발현이 감소된 것을 확인하였다(Fig. 8). 양성 대조군으로는 25  $\mu$ M genistein을 사용하였으며 p-ERK, p-JNK 및 p-p38에서 protein 발현 수준이 양성대조군과 유사한 지방세포생성 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 따라서 갯완두 추출물은 MAPK 신호전달경로를 통해 지방세포생성 억제 효과를 가지는 것으로 사료된다.



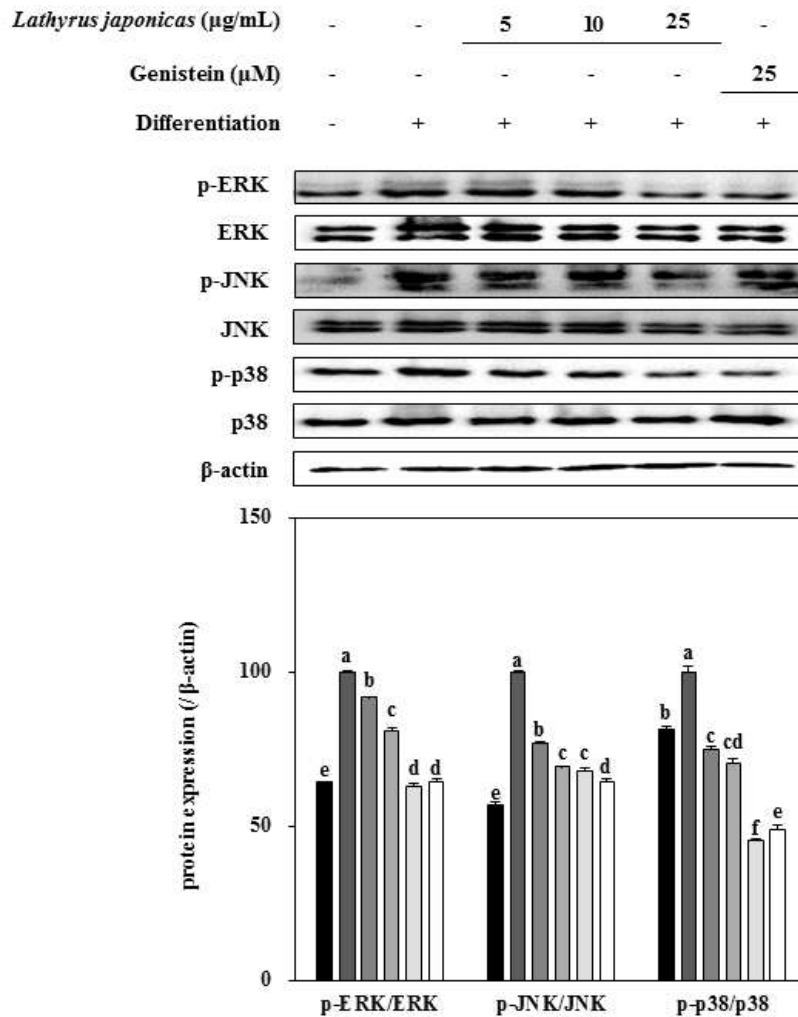


Fig. 9. Effect of *L. japonicus* crude extract on the MAPK signaling pathway in protein levels. The expressions of p-ERK, p-JNK and p-p38 protein were analyzed by western blot. <sup>a-f</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P < 0.05$ ).

## 6. 갯완두 추출물이 AMP-activated protein kinase (AMPK) 경로에 미치는 효과

갯완두 추출물의 AMPK 신호전달경로를 통한 항비만 효과를 알아보기 위해 AMPK 발현에 미치는 영향을 western blot 방법을 통해 확인하였다. 양성 대조군으로 사용된 genistein은 신호전달경로를 통해서 지방조직의 생성을 억제하는 것으로 보고되어 있으므로, 갯완두 추출물과 비교하여 양성대조군에 대비한 AMPK 신호전달경로에 미치는 지방생성억제 효과를 함께 확인하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때 AMPK의 인산화 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 농도 의존적으로 protein 발현이 증가된 것을 확인하였다(Fig. 9). 양성 대조군으로는 25  $\mu$ M genistein을 사용하였으며 p-AMPK에서 protein 발현 수준이 양성대조군보다 갯완두 추출물을 처리하였을 때 더 높은 지방세포생성 억제 효과를 보이는 것을 확인하였다. 따라서 갯완두 추출물은 AMPK 신호전달경로를 통해 지방세포생성 억제 효과를 가지는 것으로 사료된다.

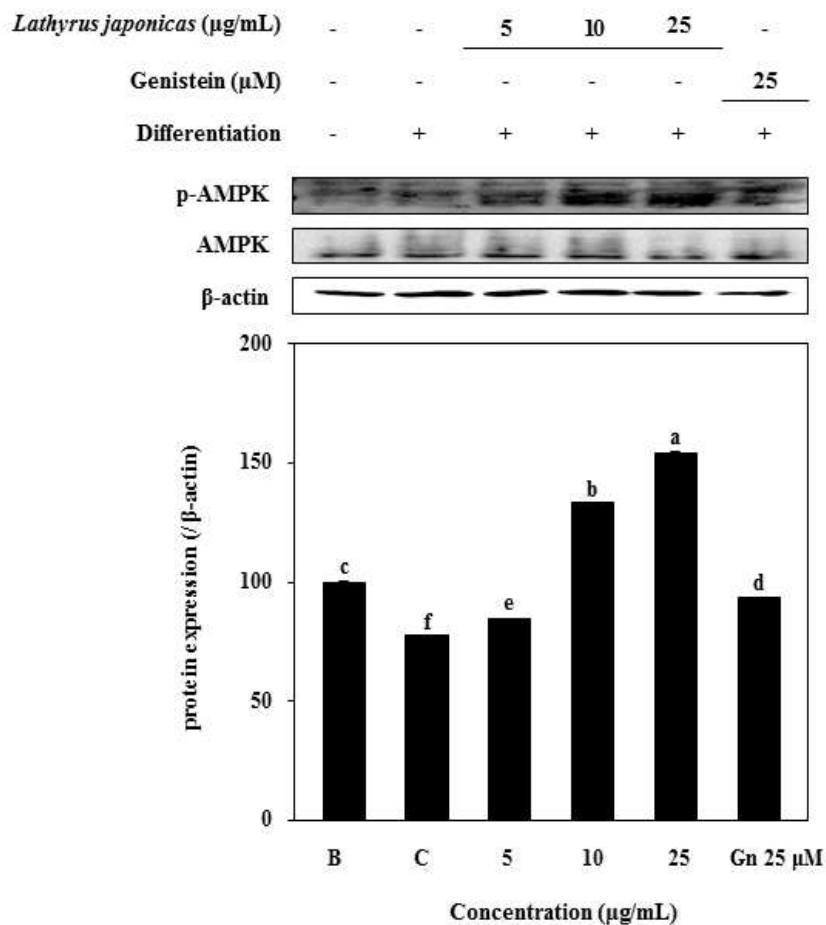


Fig. 10. Effect of *L. japonicus* crude extract on the AMPK signaling pathway in protein levels. The expressions of p-AMPK protein were analyzed by western blot. <sup>a-f</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P < 0.05$ ).

## 제2절 갯완두 분획물이 지방세포분화에 미치는 효과

### 1. 갯완두 분획물의 세포독성평가

갯완두 추출물의 지방세포생성 억제 효과를 확인하였으며 이 결과를 바탕으로 분획물 4종( $H_2O$ , *n*-butanol, 85% aq. methanol, *n*-hexane)을 분획하여 실험에 사용하였다. 갯완두 분획물이 3T3-L1 마우스 지방전구세포의 독성에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 사용하여 확인하였다. 3T3-L1 마우스 지방전구세포를 96-well plate에 배양한 후, 갯완두 분획물 4종을 각각 1, 5, 10, 15, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때  $H_2O$ , *n*-butanol, 85% aq. methanol, *n*-hexane층은 25  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 보였으며, 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 각각 90.52, 90.34, 85.58, 83.84%의 생존율을 보였다(Fig. 10). 따라서 모든 분획물이 90% 이상의 세포생존율을 보이는 농도(5, 10, 25  $\mu\text{g/mL}$ )를 선정하여 이후 실험을 진행하였다.

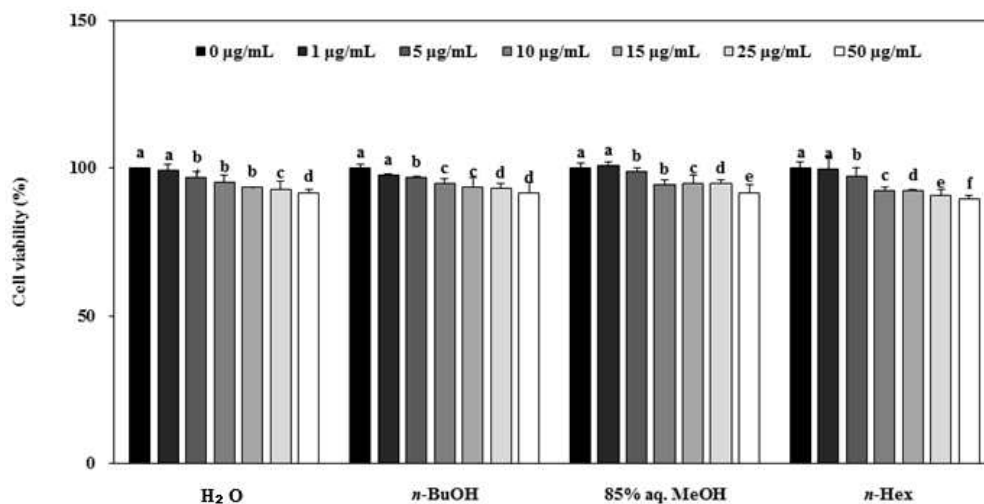


Fig. 11. Effect of solvent fractions from *L. japonicus* with different concentrations on viability of 3T3-L1 cells. Cell viability was determined by MTT assay. <sup>a-f</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P<0.05$ ).

## 2. 갯완두 분획물의 지방세포 분화에 미치는 효과

지방세포로의 분화가 유도된 세포에 갯완두 분획물 4종( $H_2O$ , *n*-butanol, 85% aq. methanol, *n*-hexane)을 각각 5, 10, 25  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하여 중성지방을 단색으로 염색하는 Oil red O 염색법을 이용하여 지방세포분화 억제능을 측정하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때  $H_2O$ , *n*-butanol, 85% aq. methanol, *n*-hexane층은 25  $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 59.59, 61.22, 32.70, 45.46%의 지질 억제율을 보였으며, 농도 의존적으로 지질축적량이 감소하였다(Fig. 11). 또한 분획물 4종 중에서 가장 지방세포생성 억제 효과가 높은 분획물은 85% aq. methanol, *n*-hexane층인 것으로 확인되었다. 따라서 갯완두 추출물 처리에 의해 지방세포생성이 감소되었으므로 항비만 효과를 확인할 수 있었다.

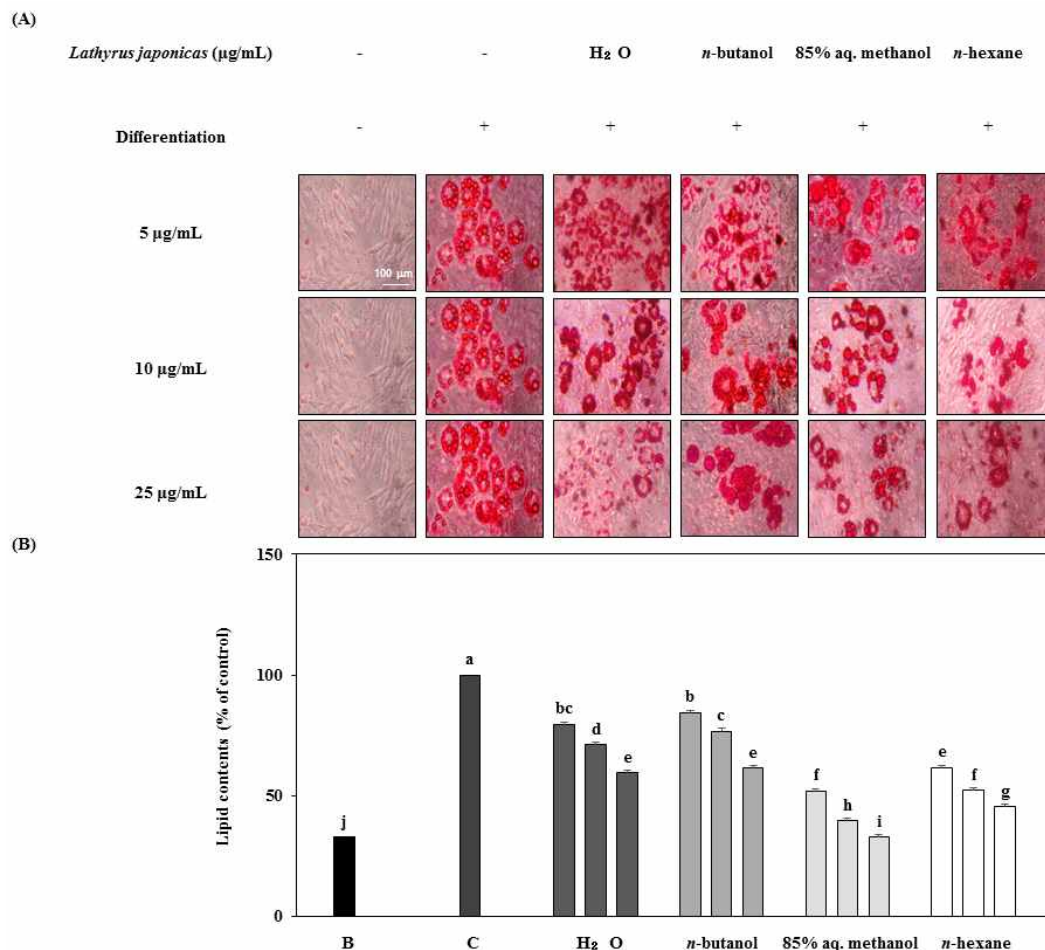


Fig. 12. The Effect of solvent fractions from *L. japonicus* triglycerides in 3T3-L1 cells. The 3T3-L1 cells were treated with *L. japonicus* containing various concentrations for 8 days. (A) Lipid accumulation were visualized by a light microscope. (B) The lipid area ratio (%) were quantified by measurement the absorbance at 500 nm. <sup>a-j</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P < 0.05$ ).

### 3. 갯완두 분획물이 지방세포생성 관련 mRNA 발현에 미치는 효과

갯완두 분획물 4종( $H_2O$ , *n*-butanol, 85% aq. methanol, *n*-hexane)의 처리에 의해 지방세포생성 억제 효과를 확인하였으며, 이 결과를 바탕으로 지방세포생성 관련 전사인자인 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 SREBP1c의 mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하기 위해 RT-PCR 방법을 통해 확인하였다. 지방세포로의 분화가 유도된 세포에 갯완두 분획물 4종을 5, 10, 25  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하여 지방세포생성에 관여하는 주요 전사인자들의 mRNA 발현 정도를 관찰하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 SREBP1c의 mRNA 발현이 감소된 것을 확인하였으며 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 12). 양성 대조군으로는 25  $\mu\text{M}$  genistein을 사용하였으며, 갯완두 분획물 처리군과 대부분 유사한 지방세포생성 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 특히 85% aq. methanol층에서 mRNA의 발현이 가장 효과적으로 저해되는 것으로 나타났다. 따라서 갯완두 분획물 4종이 지방세포생성 관련 전사 인자들의 mRNA 발현을 억제함으로써 지방세포생성 억제 효과를 확인할 수 있었다.



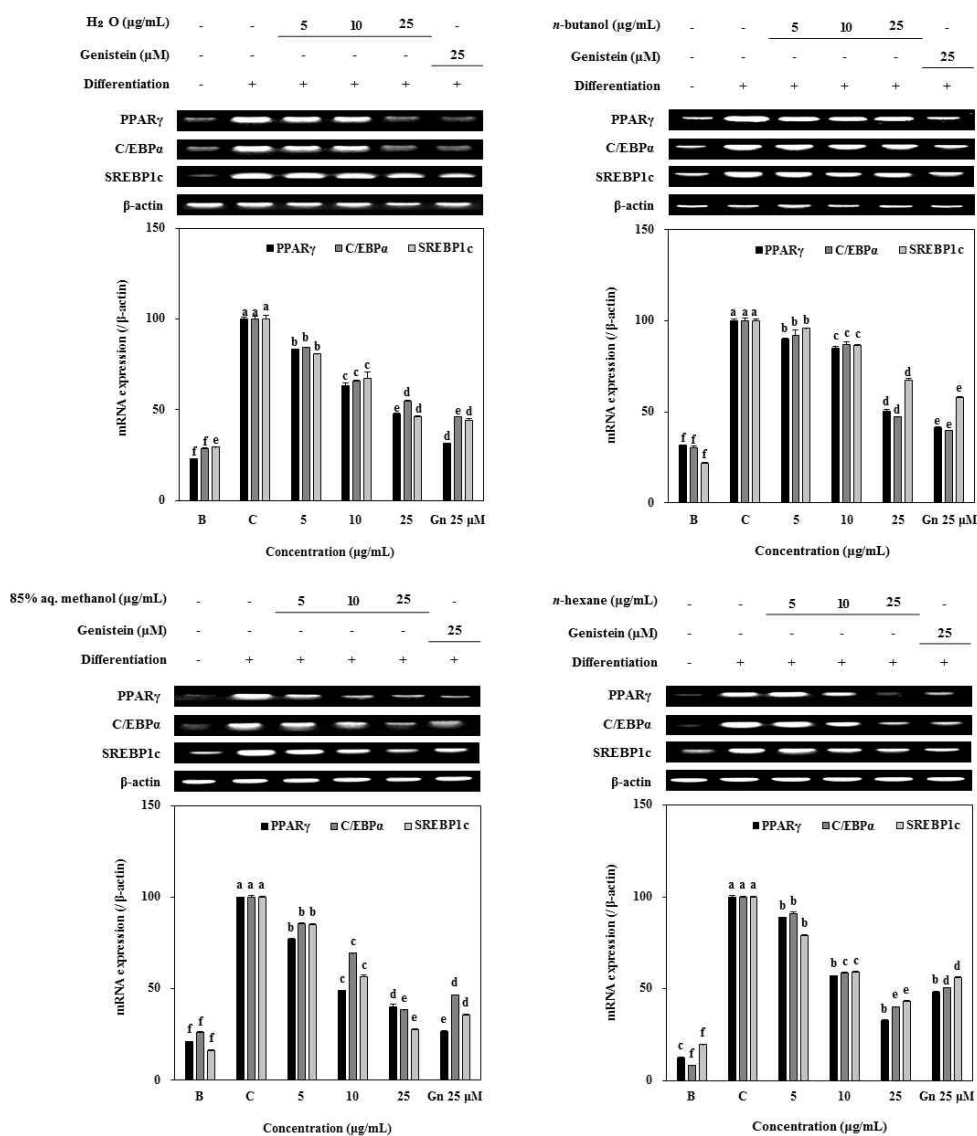


Fig. 13. Effect of solvent fractions from *L. japonicus* on mRNA expression levels of adipogenesis transcriptional factors in 3T3-L1 cells. The expression levels of PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  and SREBP1c in mRNA were determined using RT-PCR respectively. <sup>a-f</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P < 0.05$ ).

#### 4. 갯완두 분획물이 지방세포생성 관련 protein 발현에 미치는 효과

갯완두 분획물 4종( $H_2O$ , *n*-butanol, 85% aq. methanol, *n*-hexane)으로 지방세포생성 관련 전사인자인 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 SREBP1c의 protein 발현에 미치는 영향을 측정하기 위해 Western blot 방법을 통해 확인하였다. 지방세포로의 분화가 유도된 세포에 갯완두 분획물 4종을 5, 10, 25  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하여 지방세포생성에 관여하는 주요 전사인자들의 protein 발현 정도를 관찰하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 SREBP1c의 protein 발현이 감소된 것을 확인하였으며 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 13). 양성 대조군으로는 25  $\mu\text{M}$  genistein을 사용하였으며, 갯완두 분획물 처리군과 대부분 유사한 지방세포생성 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 특히 85% aq. methanol층에서 protein의 발현이 가장 효과적으로 저해되는 것으로 나타났다. 따라서 갯완두 분획물 4종이 지방세포생성 관련 전사 인자들의 protein 발현을 억제함으로써 지방세포생성 억제 효과를 확인할 수 있었다.

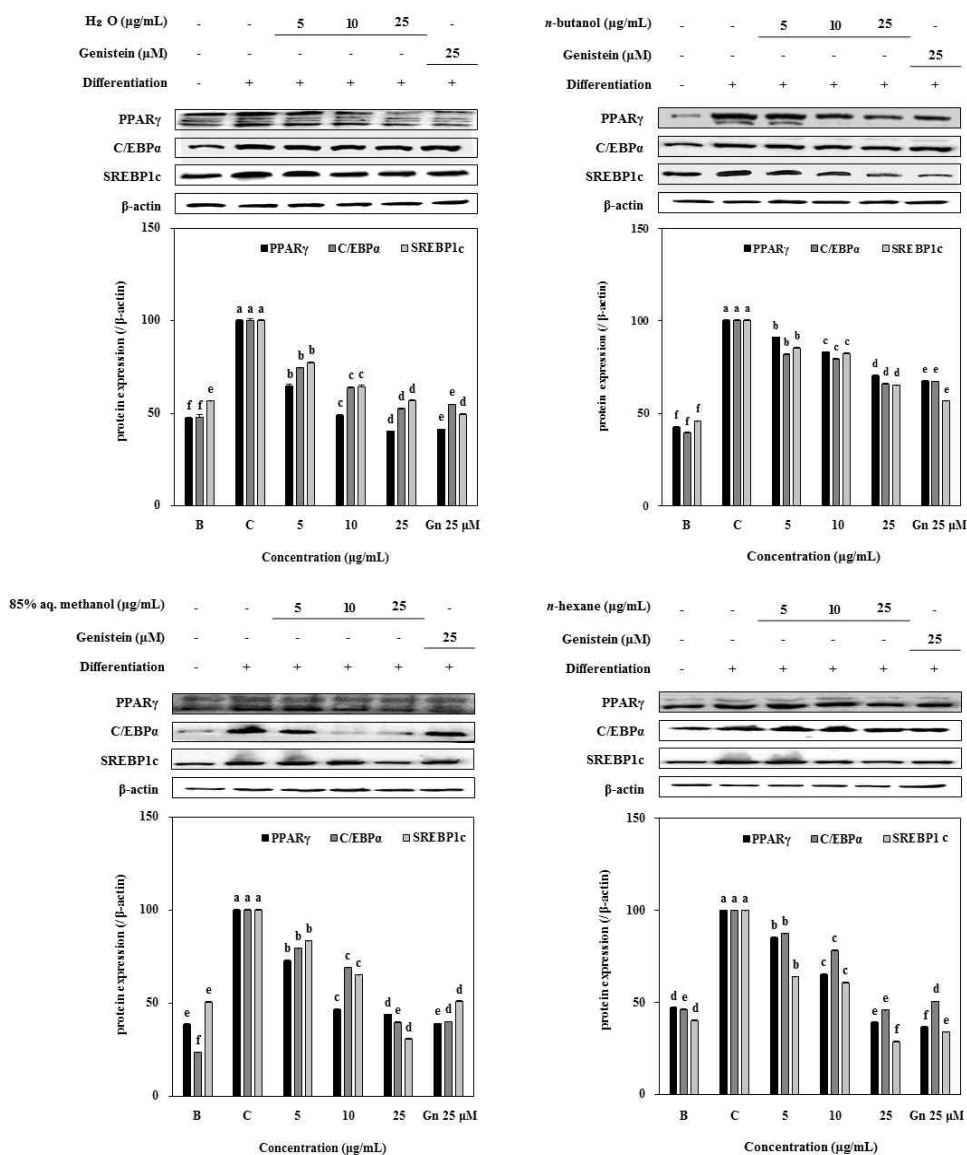


Fig. 14. Effect of solvent fractions from *L. japonicus* on protein expression levels of adipogenesis transcriptional factors in 3T3-L1 cells. The expression levels of PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  and SREBP1c in protein were determined using western blot respectively. <sup>a-f</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P < 0.05$ ).

## 5. 갯완두 분획물이 Mitogen activated protein kinase (MAPK) 경로에 미치는 효과

갯완두 분획물 4종의 지방생성억제 효과를 확인하였으며, 이 결과를 바탕으로 갯완두 분획물의 MAPK 신호전달경로를 통한 항비만 효과를 알아보기 위해 MAPK 발현에 미치는 영향을 western blot 방법을 통해 확인하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때 ERK, JNK 및 p38의 인산화 발현이 억제된 것을 확인하였으며, 농도 의존적으로 protein 발현이 감소된 것을 확인하였다(Fig. 14). 양성 대조군으로는 25  $\mu$ M genistein을 사용하였으며 p-ERK, p-JNK 및 p-p38에서 protein 발현 수준이 양성대조군과 유사한 지방세포생성 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 따라서 갯완두 분획물은 MAPK 신호전달경로를 통해 지방세포생성 억제 효과를 가지는 것으로 사료된다.

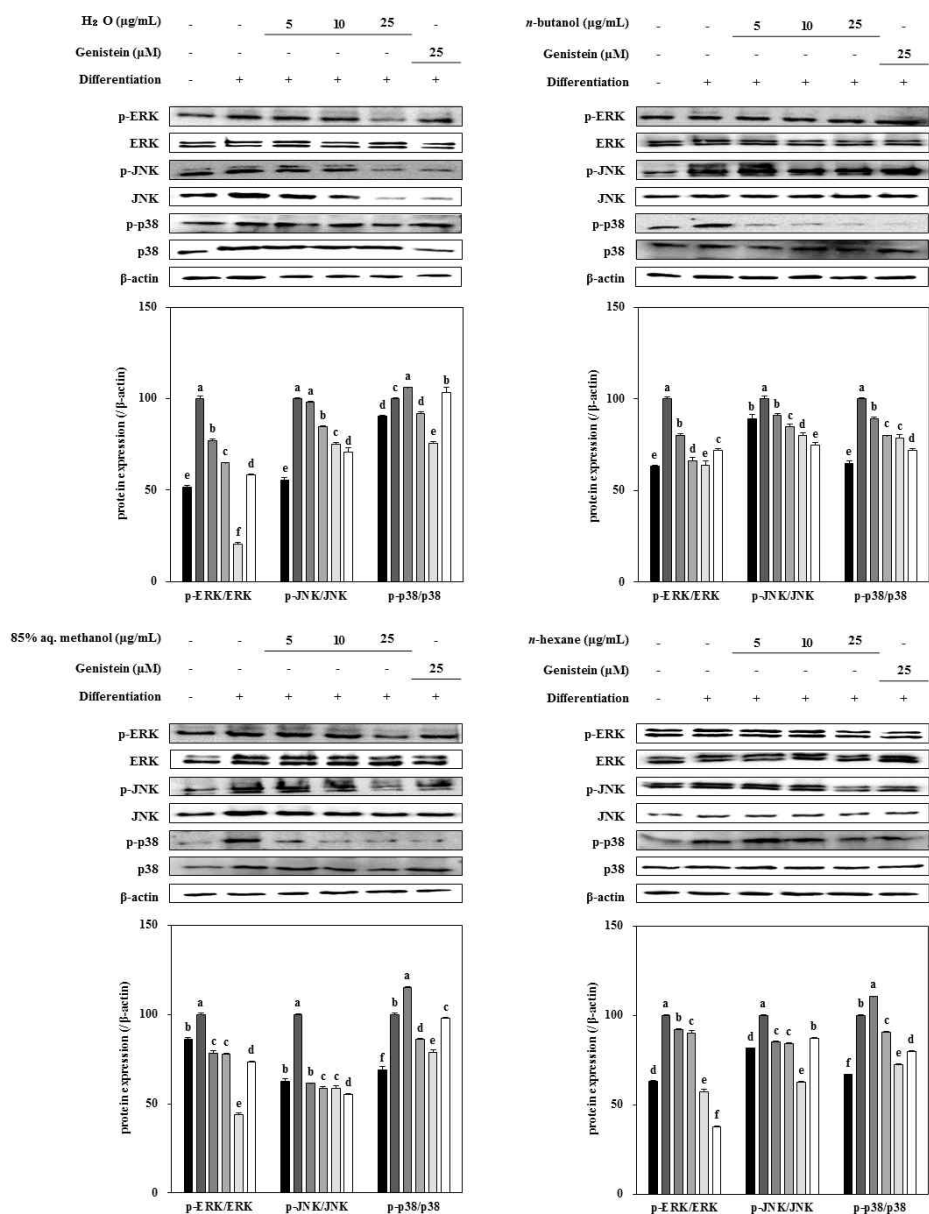


Fig. 15. Effect of *L. japonicus* solvent fractions on the MAPK signaling pathway in protein levels. The expressions of p-ERK, p-JNK and p-p38 protein were analyzed by western blot. <sup>a-f</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P < 0.05$ ).

## 6. 갯완두 분획물이 AMP-activated protein kinase (AMPK) 경로에 미치는 효과

갯완두 분획물의 AMPK 신호전달경로를 통한 항비만 효과를 알아보기 위해 AMPK 발현에 미치는 영향을 western blot 방법을 통해 확인하였다. 그 결과 *n*-butanol층을 제외한 H<sub>2</sub>O, 85% aq. methanol, *n*-hexane층에서 AMPK의 인산화 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 농도 의존적으로 protein 발현이 증가된 것을 확인하였다(Fig. 15). 양성 대조군으로는 25  $\mu$ M genistein을 사용하였으며 p-AMPK에서 protein 발현 수준이 양성대조군과 유사한 지방세포생성 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 따라서 갯완두 분획물 4종 중 H<sub>2</sub>O, 85% aq. methanol, *n*-hexane층은 AMPK 신호전달경로를 통해 지방세포생성 억제 효과를 가지는 것으로 사료된다.

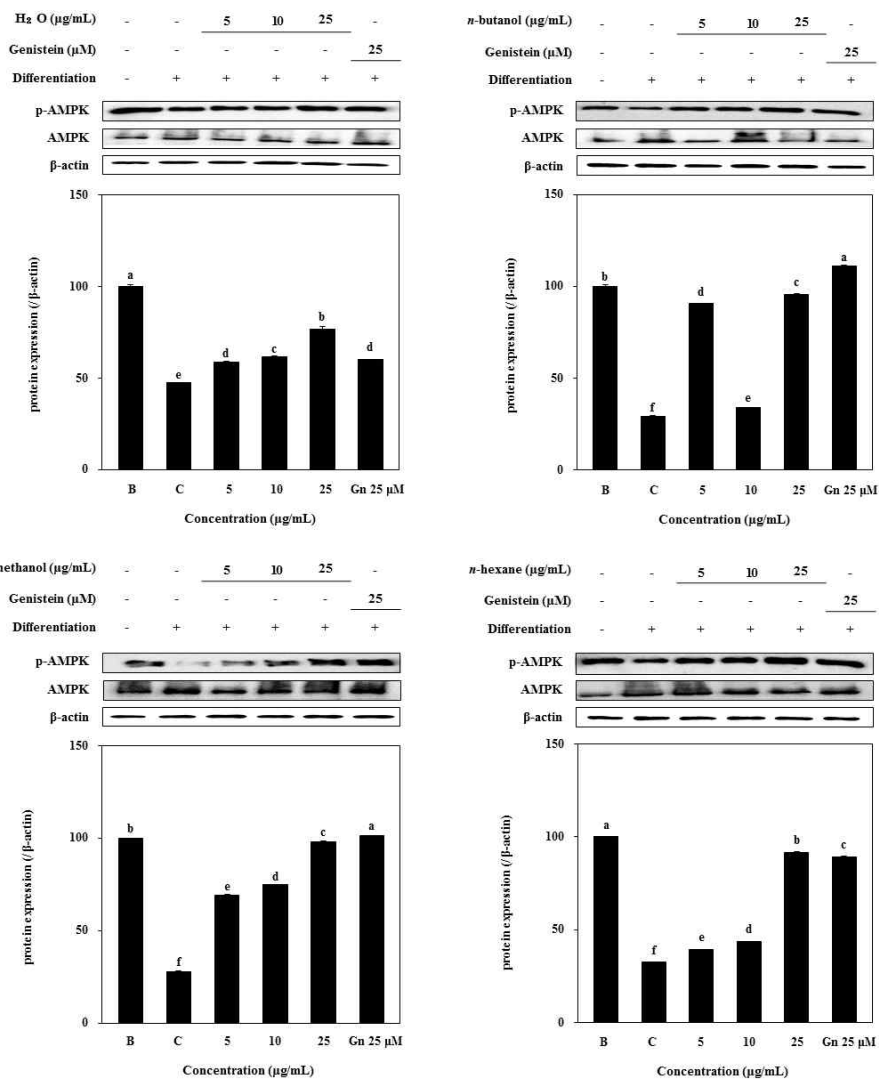


Fig. 16. Effect of *L. japonicus* solvent fractions on the AMPK signaling pathway in protein levels. The expressions of p-AMPK protein were analyzed by western blot. <sup>a-f</sup>Means with different letters are significantly differences in accordance with the Duncan's MRT ( $P < 0.05$ ).

## 제 4장 결 론

본 연구에서는 염생식물에 해당되는 갯완두(*Lathyrus japonicus*)를 추출 및 분획하여 부작용이 적으면서 항비만 효과를 가지는 천연 소재로서의 비만 치료제 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

갯완두 추출물 및 분획물 4종( $H_2O$ , *n*-butanol, 85% aq. methanol, *n*-hexane)의 단계에서 3T3-L1 마우스 지방전구세포의 세포 생존율을 평가하기 위해 MTT assay로 확인하였다. 1, 5, 10, 15, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ 로 24시간 동안 처리하여 세포 생존율을 측정한 결과, 25  $\mu\text{g/mL}$ 에서 90% 이상의 생존율을 보였으며 5, 10, 25  $\mu\text{g/mL}$ 로 농도를 설정하여 이후 실험을 진행하였다. 3T3-L1 마우스 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨 후, Oil Red O 염색법으로 갯완두 추출물 및 분획물 4종의 지질 축적량을 확인하였다. 그 결과, 25  $\mu\text{g/mL}$ 을 기준으로 하였을 때 추출물에서는 59.59% 억제율을 보였으며,  $H_2O$ , *n*-butanol, 85% aq. methanol, *n*-hexane층에서는 각각 59.59, 61.22, 32.70, 45.46% 억제율을 보였다. 추출물 및 분획물 4종에서 모두 농도 의존적으로 지방세포생성이 억제된 것을 확인할 수 있었으며, 분획물 4종에서는 85% aq. methanol > *n*-hexane > *n*-butanol >  $H_2O$  순으로 억제율을 보였다.

Oil Red O 염색법으로 추출물 및 분획물 4종의 지질 축적량을 확인한 후, 지방세포생성 관련 전사인자인 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 SREBP1c의 mRNA 발현에 미치는 효과를 확인하기 위해 RT-PCR을 진행하였다. 그 결과, 모두 농도 의존적으로 mRNA 발현이 감소된 것을 확인하였으며, 양성 대조군으로 사용된 25  $\mu\text{M}$  genistein과 유사한 수준의 지방세포생성 억제 효과를 보였다. 특히 85% aq. methanol층에서 가장 효과적으로 mRNA 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 또한 protein 발현에 미치는 효과를 확인하기 위해 western blot을 진행하였으며 마찬가지로 모두 농도 의존적으로 protein 발현이 감소된 것을 확인하였다. 양성 대조군으로 사용된 25  $\mu\text{M}$  genistein과 유사한 수준의 지방세포생성 억제 효과를 보였으며, 85% aq. methanol, *n*-hexane층에서 가장 효과적으로 protein 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

이 결과를 바탕으로 지방세포생성 관련 전사인자의 발현과 관련된



신호전달경로인 MAPK 및 AMPK의 protein 발현을 확인하였다. MAPK 경로에서는 ERK, JNK 및 p38의 인산화 발현이 억제된 것을 확인하였으며, 농도 의존적으로 protein 발현이 감소된 것을 확인하였다. 양성 대조군으로는 25  $\mu$ M genistein을 사용하였으며 p-ERK, p-JNK 및 p-p38에서 protein 발현 수준이 양성대조군과 유사한 지방세포생성 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. AMPK 경로에서는 추출물과 분획물 4종 중 H<sub>2</sub>O, 85% aq. methanol, *n*-hexane층에서 AMPK의 인산화 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 농도 의존적으로 protein 발현이 증가된 것을 확인하였다. 마찬가지로 25  $\mu$ M genistein을 양성 대조군으로 사용하였으며, p-AMPK에서 protein 발현 수준은 양성대조군보다 갯완두 분획물을 처리하였을 때 더 높은 지방세포생성 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 따라서 갯완두 추출물 및 분획물은 MAPK 및 AMPK 신호전달경로를 통해 지방세포생성 억제 효과를 가지는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구결과로부터 갯완두 추출물 및 분획물의 항비만 효과를 확인하였으며, 나아가 항비만 효능 기능성 소재로서의 개발 가능성을 제시하는 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. Yoon YS, Keum SO, Lee SW, Kim IH, Lee HI, Song YS. 2014. Effects of Cheongshimyeonja-tang on Body Weight and Serum Lipid Levels in High Fat Diet Induced Obese Mice. Herbal Formula Science, 22(1): 123-139.
2. WHO. 2020.12.29. "The top 10 causes of death".
3. 질병관리청. 2023.03.16. "국민건강통계 국민건강영양조사 제8기 2차년도".
4. Chun HR, Park EJ, Kim IH, Cho SI. 2014. Comparisons of obesity indicators for obesity and chronic diseases management among older adults. Korean J Health Educ Promot, 31(5): 109-120.
5. 한국바이오협회, 2022.05.23. "글로벌 비만치료제 개발 동향".
6. Park MJ. 2005. Recent Advances in Regulating Energy Homeostasis and Obesity. Korean Journal of Pediatrics, 48(2): 126-137.
7. Kim DH, Kwon BR, Kim SJ, Kim HJ, Jeong SI, Kang YY, Kim SY. 2017. Anti-obese Effects and Signaling Mechanisms of *Chaenomeles sinensis* extracts in 3T3-L1 Preadipocytes and Obese Mice Fed a High-fat Diet. Herbal Formula Science, 25(4): 457-469.
8. Jeong ES, Park SY, Lee KH, Na JR, Kim JS, Park KM, Kim SN. 2018. Anti-obesity Effects and Safety of the Mixture of Herbal Extracts in 3T3-L1 Cells and HR-1 Mice Fed a High Fat Diet. J Physiol & Pathol Korean Med, 32(6): 384~395.
9. Lee SB, Pyo YH. 2021. *In Vitro* Anti-Obesity Effects of Raw Garlic and Pickled Garlic. J Korean Med Obes Res, 21(2): 69-79.
10. Choi JH, Park YH, Lee IS, Lee SP, Yu MH. 2013. Antioxidant Activity and Inhibitory Effect of *Aster scaber* Thunb. Extract on Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL, 45(3): 356-363.
11. Lee SJ, Kim WI, Kang KH. 2014. Inhibitory Effects of Bojungchiseub-tang on Adipocyte Differentiation and Adipogenesis in

- 3T3-L1 Preadipocytes. Korean J. Oriental Physiology & Pathology, 28(3): 288-295.
12. Maria SM, Rasmus S, Michael B, Ronni N, Susanne M. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading. Mol Cell Biol, 34(6): 939-954.
  13. Lluís F, Kristina S, Laurent G, Kim JB, Jamila N, Genevieve M, Fruchart JC, Michael B, Bruce MS, Johan A. 1999. Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Expression by Adipocyte Differentiation and Determination Factor 1/Sterol Regulatory Element Binding Protein 1: Implications for Adipocyte Differentiation and Metabolism. Mol Cell Biol, 19(8): 5495-5503.
  14. Lee JH. 2014. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)  $\alpha/\gamma$  Agonist. The Korean Journal of Medicine, 87(1): 19-25.
  15. Choi HM, Kim SJ, Moon SO, Lee JB, Lee HY, JB Kim, Lee HD. 2018. Effects for the New Formulation of Daesiho-tang on adipocyte development and differentiation in 3T3-L1. Kor J Herbol, 33(2): 69-77.
  16. Ryu HJ, Um MY, Ahn JY, Jung CH, Dam H, Kim TW, Ha TY. 2011. Anti-obesity Effect of *Hypsizigus marmoreus* in High Fat-fed Mice. J Korean Soc Food Sci Nutr, 40(12): 1708-1714.
  17. Yan JG, Pan WW, Sheng BL, Zhong FS, Ying XL, Ling H. 2020. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE, 19: 1997-2007.
  18. Marie C, Philippe PR. 2011. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, 50-83.
  19. Paul D, Adly Y, Paul BF, Michael PH, Steven G. 2003. MAPK pathways in radiation responses. Oncogene, 22: 5885-5896.
  20. Maria MM, Reuben JS. 2011. The AMPK signalling pathway coordinates

- cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology*, 13: 1016–1023.
21. Daniel G, Reuben JS. 2017. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular Cell Review*, Volume 66(6): 789–800.
  22. Grahame H, Fiona AR, Simon AH. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13: 251–262.
  23. Kang JG, Park CY. 2012. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes & Metabolism Journal*, 36(1): 13–25.
  24. Son JW, Kim SG. 2020. Comprehensive Review of Current and Upcoming Anti-Obesity Drugs. *Diabetes & Metabolism Journal* 44(6): 802–818.
  25. CHRISTINE RT, MICHELE A, CLAIRE D, NADINE G, PETER K, MAFFRAND JP, PHILIPPE S. 2002. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284: 345–353.
  26. Soon JY. 2008. Pharmacological Treatment of Obesity. *Journal of Korean Endocrine Society*, 23(4): 223–233.
  27. Ha JH, Yu J, Lee JY, Kim HS. 2022. The effects and side effects of liraglutide as a treatment for obesity. *Cardiovasc Prev Pharmacother*, 4(4):142–148.
  28. Kim JH. 2022. Microbiome and Diabetes. *J Korean Diabetes*, 23(1):7–11.
  29. Lee JH, Yim MJ, Lee DS, Lee MS, Park YG, Jeon JH, Choi G. 2018. Comparison of Biological Activities of Korean Halophytes. *Natural Product Sciences*, 24(4): 247–252.
  30. Lee JM, Yim MJ, Choi G, Lee MS, Park YG, Lee DS. 2018. Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Six Halophytes in Korea. *Natural Product Sciences*, 24(1):40–46.
  31. Um YR, Lee JI, Lee JY, Kim HJ, Yea SS. 2010. Chemical Constituents of

- the Halophyte *Glehnia littoralis*. Journal of the Korean Chemical Society, 54(6): 701–706.
32. Kim SH. 2019. Distribution Patterns of Halophytes in the Coastal Area in Korea. Ocean Science Journal, 24(1): 139–159.
  33. Song UR, Hong JE, An JH, Chung JS, Moon JW, Lim JH, Lee EJ. 2011. Heavy Metal Accumulation in Halophyte *Salicornia europaea* and Salt Marsh in West-coast of Korea. Journal of the Environmental Sciences, 20(4): 483–491.
  34. Lee JI, Kong CS, Jung ME, Hong JW, Noh I, Seo YW. 2011. Peroxynitrite-scavenging Activity of the Halophyte *Limonium tetragonum*. Ocean and Polar Research, 33(2): 185–191.
  35. Ki MG, Lee HR, Cho AH, Unno T, Lee JH. 2017. Isolation of salt-tolerant bacteria from rhizosphere and rhizoplane of halophyte plant *Suaeda japonica* in Gochang·Buan tidal flat. Journal of Applied Biological Chemistry, 60(2): 125–131.
  36. Jo HS, Hong SM. 2023. Enhancement of the Antibacterial and Antioxidative Capacities of *Glehnia littoralis* Extracts through Lactic Acid Bacteria Fermentation. Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society 24(2): 83–91.
  37. Kim JY, Lee YJ, Kim WS, Moon SK, Kim YT. 2022. Antioxidant and Physiological Activities of Different Solvent Extracts of *Cnidium japonicum*. Fisheries and Aquatic Sciences, 55(3): 310–318.
  38. Park SM, Lee KY, Hong CH. 2022. Anti-inflammatory Effects of *Cistanche deserticola* Water Extracts in LPS-stimulated RAW 264.7 Macrophages. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 35(1): 11–23.
  39. Michael KU, Satoshi TB, Martin PC, Jens SD. 2005. *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. Trends in Plant Science, 10(5): 222–228.
  40. RANDAL RE. 1977. The past and present status and distribution of Sea

- Pea, *Lathyrus japonicus* Willd., in the British Isles. *Watsonia*, 11: 247-251.
41. Kang SS, Ahn BT, Kim JS, Bae KH. 1998. Lathyrus Saponin, a New Trisaccharide Glycoside from *Lathyrus japonicus*. *J. Nat. Prod*, 61(2): 299-300.
42. Brightmore D, White PHF. 1963. *Lathyrus Japonicus* Willd. *Journal of Ecology* 51(3): 795-801.
43. Tatsuo O, Yuko K, Hiroaki S. 2011. Isolated history of the coastal plant *Lathyrus japonicus* (Leguminosae) in Lake Biwa, an ancient freshwater lake. *AoB PLANTS*.
44. Christodoulides C. Vidal PA. 2010. PPARs and adipocyte function. *Mol. Cell. Endocrinol*, 318: 61-68.
45. Park JC, Park MS, Kim YN. 2017. Effects of Different Sizes of Blood Flow Restriction Areas on Changes in Muscle Thickness. *J Kor Phys Ther*, 29(2): 80-84.

## Abstract

# Effect of *Lathyrus japonicus* on adipogenesis differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes

by Lee, Hyun-Jung

Department of Food Nutrition  
Graduate School, Silla University

Halophytes has been reported to possess a variety of bioactivity such as anti-diabetic, anti-cancer, anti-virus, anti-inflammatory, anti-oxidants and anti-obesity. The halophyte, *Lathyrus japonicus* has effects such as diabetes, inflammation, toxin removal, and has been used to treat digestive functions in particular. In this study, the crude extract and solvent fractions (H<sub>2</sub>O, *n*-butanol, 85% aq. methanol, *n*-hexane) from *L. japonicus* were tested for its ability to suppress adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. Anti-adipogenic effect was tested via intracellular lipid accumulation and adipogenic gene expression which were analyzed by Oil Red O staining, RT-PCR and Western blotting, respectively. As a result, treatment of crude extract and solvent fractions from *L. japonicus* inhibited the formation of lipid droplets in 3T3-L1 preadipocyte cells. In particular, 85% aq. methanol fraction effectively suppressed the levels of adipogenic markers: PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  and SREBP1c. In conclusion, it was suggested that *L. japonicus* could be used as potential plant with anti-adipogenic properties and further purification of 85% aq. methanol fraction could yield potential therapeutic agents with

anti-adipogenesis effects. Therefore, *L. jaonicus* maybe a potential source of natural product against obesity.

**Keyword:** adipocyte, Halophytes, *Lathyrus jaonicus*, Obesity, 3T3-L1



## 감사의 글

항상 게으르고 타의적으로 살았던 저에게 있어 석사학위 취득은 새로운 시작점이었으며 2년 동안 많은 것을 배우고 성장할 수 있었습니다. 석사학위 취득에 도움을 주신 분들에게 감사 인사를 전하고자 합니다.

배움이 부족했던 저에게 아낌없이 지원해주신 공창숙 교수님께 감사의 말씀 전해드립니다. 학부 때부터 지도 교수님으로 인연이 닿아 대학원 진학에서 학위 취득까지 저에게 많은 관심을 가져주시고 지도해주신 덕분에 제가 성장할 수 있었던 것 같습니다. 정말 감사드립니다. 또한, 낯선 실험실에서 거리감 없이 늘 함께 지내주시고 격려해주신 오정환 교수님, 아무것도 몰랐던 저에게 많은 가르침을 주신 파티 교수님께 감사드립니다.

말 안 듣는 후배들 사이에서 고생한 착한 현진이, 세심하지 못한 나를 잘 챙겨주고 항상 먼저 배려해줬던 지호, 내가 힘들었던 시기에 말없이 큰 힘이 되어준 미나, 늘 밝은 웃음으로 나를 반겨주는 귀여운 성은, 바쁘게도 성실하게 해내며 묵묵히 나를 도와준 효은, 힘들어도 껏끗하게 버텨주고 잘 따라줘서 고마운 미건! 너네가 있어서 힘든 시간 버틸 수 있었어. 말로 전하기에는 부족하지만 진심으로 고마워.

바쁘다는 핑계로 만나지도 않고 잘 챙겨주지 않았음에도 불구하고 늘 나를 배려해주고 응원해줬던 소중한 친구들! 이름을 하나하나 언급하지는 못했지만 다들 너무 고마워.

마지막으로 내가 가장 사랑하는 우리 가족. 7년 넘게 학교 다니는 동안 매번 데려다준다고 너무 수고 많았어. 그동안 걱정시키고 고생시켜서 미안하고 고마워. 내가 많이 사랑해!