

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2021.13.1.001>

ISSN 2383-5400 (Online)

3T3-L1 및 B16F10 세포에서 청각 메탄올 추출물에 의한 지방 세포 분화 및 멜라닌 생성의 억제 효과

Inhibition of adipogenesis and melanogenesis by methanol extract of *Codium fragile* (Suringar) Hariot in 3T3-L1 adipocytes and B16F10 melanocytes

최은옥¹, 최영현^{2,*}, 황혜진^{3,*}Eun-Ok Choi¹, Yung Hyun Choi^{2,*} and Hye-Jin Hwang^{3,*}¹박사후연구원, 동의대학교 항노화연구소, 부산 47340, 대한민국²교수, 동의대학교 한의과대학 생화학교실, 부산 47227, 대한민국³교수, 동의대학교 의료·보건·생활대학 식품영양학과, 부산 47340, 대한민국¹Anti-Aging Research Center, Dongeui University, Busan 47340, Korea²Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University, Busan 47227, Korea³Department of Food and Nutrition, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

(Received 10 May 2021, Revised 17 May 2021, Accepted 17 May 2021)

Abstract *Codium fragile* (Suringar) Hariot, a green alga of the Codiales family, has been reported to have several bioactive properties, including antioxidant and anti-inflammatory properties. However, its antiobesity and whitening effects and their underlying mechanisms are unclear. This study aimed to evaluate the antiobesity and melanogenesis inhibitory effects of *C. fragile* using methanol extracts of *C. fragile* (MECF). The results of this study revealed that MECF inhibited the accumulation of lipid droplets and triacylglycerol in differentiated 3T3-L1 adipocytes, which was associated with the inhibition of the expression of adipogenesis-related transcription factors, such as peroxisome proliferator-activated receptor γ , CCAAT/enhancer-binding protein- α (C/EBP α), and C/EBP β , which function as the key regulators of adipogenesis. Also, MECF reduced tyrosinase activity and melanin content in B16F10 cells as well as the expression of tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), TRP-2, and microphthalmia-related transcription factor in the presence of α -melanocyte-stimulating hormone. Taken together, our findings suggest that the extract of *C. fragile* could be considered a promising functional ingredient for the prevention and treatment of obesity and skin pigmentation in the food and cosmetic industry.

Keywords : *Codium fragile*, 3T3-L1 adipocytes, anti-obesity, B16F10 melanocytes, anti-melanogenesis

서 론

비만은 에너지 섭취와 소비 사이의 불균형으로 인한 비정상적이거나 과도한 지방의 축적이 발병의 원

인이다[1,2]. 비만은 대사 증후군, 제2형 당뇨병, 고콜레스테롤 혈증, 다양한 혈관성 질환 등 여러 장기에 합병증을 유발할 수 있는 위험 인자이며, 전 세계적으로 비만의 유병률이 높아지고 있는 추세이다

* Corresponding author

Phone: +82-51-890-3319 (Y.H.Choi), +82-51-890-1594 (H.J.Hwang)

E-mail: choiyh@deu.ac.kr (Y.H.Choi), hj2001@deu.ac.kr (H.J.Hwang)

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

[3,4]. 현재 비만의 치료에 널리 처방되고 있는 대표적인 항비만제가 orlistat와 sibutramine이다[5,6]. Orlistat는 췌장이나 다른 소화계에서 생성되는 lipase의 억제제로서 장에서의 지질 흡수를 차단하여 지질 대사를 억제하고 지질 축적을 감소시킨다[7]. 반면 sibutramine은 serotonin과 norepinephrine 흡수를 억제하여 식욕을 저하시켜 지질 저장 및 합성을 억제함으로써 체중의 감소를 유도한다[8,9]. 그러나 이들 항비만제는 지방변을 포함한 불쾌감과 간 기능의 저해를 포함한 다양한 부작용을 동반한다[6,9]. 특히 sibutramine은 장기간 사용 시 심근 경색 및 뇌졸중을 포함한 심각한 심혈관 질환을 유발할 수 있다[10]. 따라서 부작용을 유발하지 않고 효율적인 비만의 예방과 치료를 위한 새로운 식의약 자원의 발굴이 요구된다.

한편, 인간의 피부색은 멜라닌(melanin)의 양과 이들이 피부에 분산되는 정도에 따라 다르며 햇빛 노출 정도와 환경의 영향도 받는다[11,12]. 멜라닌은 동물과 식물에서 발견되는 고분자량 화합물이며 인간의 눈, 피부 및 머리 색깔을 결정하는 중요한 색소이다. 멜라닌은 유해한 자외선으로부터 피부를 보호할 수도 있지만, 과도한 멜라닌 생성은 색소 침착을 포함한 미용 및 건강상의 문제를 유발할 수 있다[13,14]. 최근, 과도한 멜라닌 생성으로 인한 문제를 해결하기 위해 많은 의료 및 화장품 산업에서 tyrosinase 활성 억제제에 초점을 맞추고 있다[15,16]. 그러나 현재 사용되고 있는 arbutin, kojic acid, hydroquinone, ascorbic acid를 포함한 다양한 피부 미백제는 피부에 잘 침투하지 못하며 장기간 사용시 피부 자극, 염증, 가려움, 색소 침착과 같은 부작용이 발생할 수 있다[17,18]. 따라서 인체 피부의 과도한 색소 침착을 부작용없이 안전하게 예방하고 치료할 수 있는 효과적인 미백제 발굴이 요구되고 있다.

최근 다양한 생리 활성 성분이 포함된 해조류는 잠재적인 식의약 소재의 주요 공급원으로 많은 주목을 받고 있다. 그동안 축적된 연구들에 의하면 해조류는 항산화, 항염증, 항암, 항비만 및 미백 효능과 같은 유익한 생물학적 활성을 가지고 있음을 알 수 있다[19-22]. 해조류 중, 청각(*Codium fragile* (Suringar) Hariot)은 식용 녹조류의 일종(Codiales family)으로 아시아, 유럽 및 오세아니아의 해안 지

역에 널리 분포하며, 우리나라에서는 전통적으로 장염, 수종, 배뇨 장애 등의 치료 등을 위해서도 사용되어 왔다[23]. 최근 연구에 의하면 청각 추출물 또는 대사산물은 항산화, 항염증, 면역 조절 등을 포함한 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 밝혀지고 있다[24-28]. 비록 Kolsi et al. [29]에 의하여 청각 유래 황화 다당류가 항산화 활성과 연계된 지질 생성 저하 효과를 가진다는 보고는 있었지만, 지방 세포의 분화를 억제할 수 있는지에 대한 연구와 미백 효능에 관한 구체적인 기전 연구는 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 대표적인 *in vitro* 항비만 및 미백 효능 평가 모델을 이용하여 청각 추출물의 비만세포 분화 억제 및 멜라닌 생성 억제 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 시료 준비

본 연구에 사용된 청각 메탄올 추출물(methanol extracts of *C. fragile*, MECF)은 제주테크노파크(Jeju Technopark) 내 제주생물자원지원센터의 유용생물자원추출물은행(Jeju Bio-Resource Extract Bank, Jeju, Korea)에서 제공받았다[28]. MECF를 세포에 처리하기 위하여 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA)에 녹여 1 mg/ml의 stock solution으로 제조 후, 세포 배양 배지에 적정 농도로 처리하였다.

2. 세포 배양

본 연구에서 사용된 3T3-L1 (mouse preadipocytes) 및 B16F10 (mouse melanoma) 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 분양받았다. 3T3-L1 및 B16F10 세포는 10% bovine calf serum 및 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 각각 배양하였으며, 세포 배양에 필요한 재료들은 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

3. 세포 생존율 측정

MECF가 3T3-L1 및 B16F10 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 24 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 후, 적정 농도의 MECF를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 처리 후, 배지를 제거하고 0.5 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma - Aldrich Chemical Co.) 용액을 각 well 첨가하여 암 하에서 반응시켰다. 3시간 후, MTT 시약을 제거하고 DMSO를 첨가하여 well에 형성된 formazan 침전물을 용해시키고 96 well plate에 옮긴 후 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (VERSA Max, Molecular Device Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 3T3-L1 세포의 분화 유도 및 세포 형태 관찰

전 지방 세포인 3T3-L1 세포를 지방 세포로 분화를 유도하기 위하여 confluence 상태까지 배양한 후, 10% FBS 및 1%의 antibiotics가 포함된 분화 배지를 사용하여 2일간 더 배양한 후 10 μ g/ml insulin, 0.1 μ M dexamethasone 및 0.5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma - Aldrich Chemical Co.)가 포함된 분화 배지 (MDI 분화 배지)로 교환하여 2일간 배양하였으며, 그 후 2일 마다 insulin이 포함된 분화 배지로 교환하였다. 3T3-L1 세포의 분화 유도에 미치는 MECF의 영향을 조사하기 위하여 MDI 및 insulin이 포함된 배지로 교환할 때 적정 농도의 MECF를 처리하였으며, 지방 세포로의 분화 정도를 도립현미경 (inverted microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다.

5. Oil Red O 염색 및 지질 함량 측정

3T3-L1 세포 내 지질 형성의 정도를 평가하기 위하여 Oil Red O 염색을 실시하였다. 이를 위하여 다양한 조건에서 배양된 3T3-L1 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척 후, 10% formalin (Sigma - Aldrich Chemical Co.)으로 15분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 60% isopropanol (Sigma - Aldrich Chemical Co.)을 이용하여 세척한 후, Oil Red O 용액(Sigma - Aldrich Chemical Co.)을 처리하여 실온에서 20분 동안 염색하였다. 염색 후 Oil Red O

용액을 제거하고 증류수로 세척한 후 지질 방울 (lipid droplet) 형성의 정도를 도립현미경을 이용하여 관찰하였다. Oil Red O 염색된 3T3-L1 세포에서 세포 내 형성된 지질(triglyceride)을 정량적으로 비교하기 위해 염색된 지질 방울을 isopropanol로 30분 동안 용해시키고 추출된 염료를 96 well plate로 옮겼다. ELISA reader로 500 nm에서 흡광도를 측정 후, 분화된 지방 세포의 흡광도를 100% 상대 지질 함량으로 설정하여 실험군에 따른 지질 함량 정도를 비교하였다.

6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA 발현 분석

3T3-L1 세포에서 지방 세포 분화에 관여하는 유전자들의 발현 변화를 전사 수준에서 조사하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 이를 위하여 다양한 조건에서 배양된 3T3-L1 세포에서 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. RNA를 정량 후, 대상 유전자의 primer를 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Seoul, Korea)와 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들의 양적 차이를 조사하기 위하여 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동으로 분리 후 ethidium bromide (Sigma-Aldrich Chemical Co.)로 염색 후 ultra violet 하에서 관찰하였다. RT-PCR에 대한 internal control로는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였다. 본 연구에 사용된 primer 염기서열은 Table 1에 제시하였다(PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor; C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein).

Table 1. The primer sequence is used for RT-PCR

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
PPAR γ	TTTTCAAGGGTGC CAGTTTC	AATCCTTGCCCT CTGAGAT
C/EBP α	TTACAACAGGCC AGGTTTCC	GGCTGGCGACAT ACAGTACA
C/EBP β	CCTTTAAATCCAT GGAAGTGG	GGGCTGAAGTCG ATGGC
GAPDH	CATGAGAAGTAT GACAACAGCCT	AGTCCTTCCACGA TACCAAAGT

7. Western blot 분석에 의한 단백질 발현 분석

3T3-L1 세포와 B16F10 세포에서 지방 세포 분화 및 멜라닌 생성억제에 관여하는 유전자들의 발현 변화를 번역 수준에서 조사하기 위하여 Western blot 분석을 실시하였다. 이를 위하여 다양한 조건에서 배양된 세포에 적당량의 lysis buffer (25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1% nonidet p-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 및 5 mM dithiothreitol)를 첨가하여 1시간 동안 4°C에서 반응시킨 후, 총 단백질을 분리하였다. 분리된 상층액의 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 정량한 다음 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하고 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane에 분석 대상 1차 항체를 처리하여 12시간 이상 4°C에서 반응시킨 다음 1차 항체에 대한 2차 항체를 처리하여 1시간 이상 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Thermo Fisher Scientific)을 적용시킨 다음 Fusion FX Image system (Vilber Lourmat, Torcy, France)을 이용하여 해당 단백질의 발현 정도를 비교하였다. Western blot 분석에 대한 internal control로는 β -actin을 사용하였다. 본 연구에 사용된 PPAR γ (2430s; 1:1,000), C/EBP α (2295s; 1:1,000) 및 C/EBP β (3087s; 1:1,000)에 대한 1차 항체는 Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, tyrosinase (sc-20035; 1:1,000), tyrosinase-related protein (TRP)-1 (sc-133076; 1:1,000), TRP-2 (sc-74439; 1:1,000), microphthalmia-associated transcription factor (MITF, sc-52938; 1:500) 및 β -actin에 대한 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG, sc-2004; 1:1,000), anti-mouse IgG (sc-2005; 1:1,500) 및 anti-goat IgG (sc-2350; 1:1,500)는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.에서 구입하였다.

8. B16F10 세포에서 멜라닌 생성량 측정

B16F10 세포 내에 생성된 멜라닌의 함량 측정을 위하여 B16F10 세포에 100 nM의 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH, Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 처리하여 멜라닌의 생합성을 유도하였다. 24 시간 후, 세포를 PBS로 세척하고 다양한 농도의 MECF가 함유된 배지로 교환하여 72시간 동안 배양하였다. 10% DMSO가 함유된 1 N의 NaOH 용액을 well에 첨가하고 1시간 동안 80°C의 water bath에서 1시간 반응시켜 세포 내의 멜라닌을 용해시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 함량을 평가하였다.

9. B16F10 세포에서 tyrosinase 활성 측정

상기와 동일 조건에서 배양된 B16F10 세포를 PBS로 수세 후, Thermo Fisher Scientific에서 구입한 RIPA Lysis and Extraction Buffer를 이용하여 제조사의 지침에 따라 세포를 용해시켰다. 20 μ l의 세포 용해물에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 2 mg/ml의 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 80 μ l를 혼합한 후 37°C에서 2시간 동안 반응시키고 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 활성을 평가하였다.

10. 통계 분석

실험 결과의 유의성 분석을 위하여 GraphPad Prism 5.03 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하였다. 모든 실험은 3번의 독립적인 실험을 통한 평균 \pm 표준 편차(standard errors, SD)로 표시하였고, one-way analysis of variance에 이어 Tukey's post hoc 테스트로 분석하여 0.05 미만의 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

1. 3T3-L1 세포의 증식에 미치는 MECF의 영향

MECF에 의한 지방 세포의 분화억제 효능 검증을 위한 실험 조건의 설정을 위하여 3T3-L1 세포의 증식에 미치는 MECF의 영향을 먼저 조사하였다. Figure 1에 나타난 MTT 분석의 결과에 의하면, 400 μ g/ml 처리군까지는 대조군과 유사한 세포 생존력을 보였으며, 600 μ g/ml 이상 처리군부터 처리 농도

증가에 따른 세포 생존율의 저하가 관찰되었다. 이 결과를 바탕으로 400 µg/ml의 MECF 처리군까지는 3T3-L1 세포에 유의적인 세포 독성이 없는 것으로 판단되어 이후 실험부터는 MECF의 처리 농도를 400 µg/ml 이하로 설정하였다.

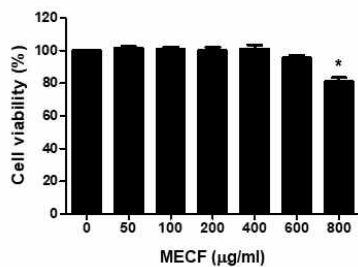


Figure 1. Effect of MECF on cell viability of 3T3-L1 preadipocytes. Cells were seeded in 24-well plates at a density of 2×10^4 cells/well and incubated with the indicated concentrations of MECF. After 72 h, cell viability was analyzed by an MTT assay. Values are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments (* $p < 0.05$ indicates a significant difference compared to the control group).

2. 3T3-L1 세포에서 지질 방울 및 지질의 형성에 미치는 MECF의 영향

전 지방 세포가 지방 세포로의 분화되었다는 가장 확실한 증거는 세포 내 지질 방울의 형성이며, 이들은 지방세포의 분화되는 과정에서 생성되는 지질 (triglyceride)과 콜레스테롤 에스테르(cholesterol ester)가 인지질층(phospholipid monolayer)에 둘러싸여 형성된다[30,31]. 분화된 지방 세포에서 지질 방울의 형성은 lipoprotein lipase에 의한 지질의 유입과 adipose triglyceride lipase와 hormone sensitive lipase에 의한 지질의 유출에 의하여 조절되며, 과도한 지질 방울은 비만 유발뿐만 아니라 제2형 당뇨병, 동맥경화 및 암 등과 같은 질환의 개시와 진행에도 관여한다[31,32]. 따라서 지질 방울 형성의 억제는 비만 억제제의 가장 유의적인 지표로 활용될 수 있기 때문에, MECF가 지방 생성과정에 미치는 영향을 조사하였다. Figure 2A에 나타난 3T3-L1 세포의 형태학적인 변화 관찰에서 MDI 처리에 의해 분화가 유도된 세포에서는 분화를 유도하지 않은 대조군에 비하여 지질 방울의 형성이 매우 증가되어 분화가 적절히 유도되었음을 알 수 있다. 이를 Oil red O의 염색으로 재확인하였으며(Figure 2B), MECF가 존재하는 조건에서는 지질 방울의 형성이 MECF의 처리 농도 의존

적으로 현저하게 감소되었다. 아울러 지질의 함량 변화를 정량적으로 비교한 결과에서도 MDI 처리로 분화된 지방 세포에서 증가한 지질의 함량이 MECF가 전처리된 조건에서 처리 농도의 증가에 따라 유의적으로 감소되었다(Figure 2C). 이는 지질 방울 형성의 억제에 의한 결과이며, MECF가 강력한 지방 세포 분화 억제력을 지니고 있음을 보여주는 결과이다.

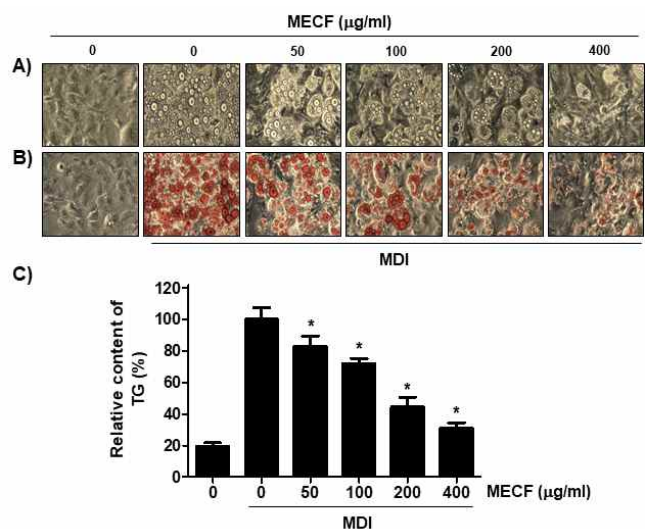


Figure 2. Effect of MECF on adipogenesis in differentiating 3T3-L1 cells. The cells were induced to differentiate with induction medium in the presence or absence of MECF for 8 days. (A and B) The morphology of cells before (A) or after staining with Oil Red O (B) was photographed with an optical microscope and representative images were presented. (C) The content of intracellular triglyceride (TG) was quantified in 3T3-L1 cells. Values are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments (* $p < 0.05$ indicates a significant difference compared to differentiated cells).

3. 3T3-L1 세포에서 지방 생성 유도 유전자의 발현에 미치는 MECF의 영향

지방 세포의 분화에 따른 지방 생성은 지방 세포에서 지방 축적에 중요한 역할을 하는 특정 지방 생성 유전자의 발현에 의해 엄격하게 조절된다[33,34]. 그중에서 PPAR γ 와 C/EBP은 지방 세포 분화와 지방산 합성의 핵심 조절자 역할을 한다. 이들의 발현이 증가되면, fatty-acid synthase, adiponectin, leptin 및 adipocyte protein 2와 같은 지방 세포 특이 마커의 발현이 향상되어 지방 생성이 촉진된다[35,36]. Figure 3에 나타난 RT-PCR 및 Western blot 분석의 결과에 의하면, MDI 처리에 의해 분화가 유도된

3T3-L1 세포에서는 PPAR γ , C/EBP α 및 C/EBP β 의 발현이 전사 및 번역 수준에서 모두 현저하게 증가하였음을 알 수 있다. 따라서 MECF에 의한 지방 세포 분화 억제제가 이들 유전자의 발현 감소와 연관성이 있는지를 조사하였으며, 증가된 이들 유전자의 발현은 MECF가 존재하는 조건에서는 모두 MECF 처리 농도 의존적으로 감소되었다. 따라서 MECF는 지방 세포 분화와 지방 합성 조절에 관여하는 유전자들의 발현을 억제함으로써 지방 세포로의 분화를 억제하고 지질의 형성을 차단하였음을 알 수 있다.

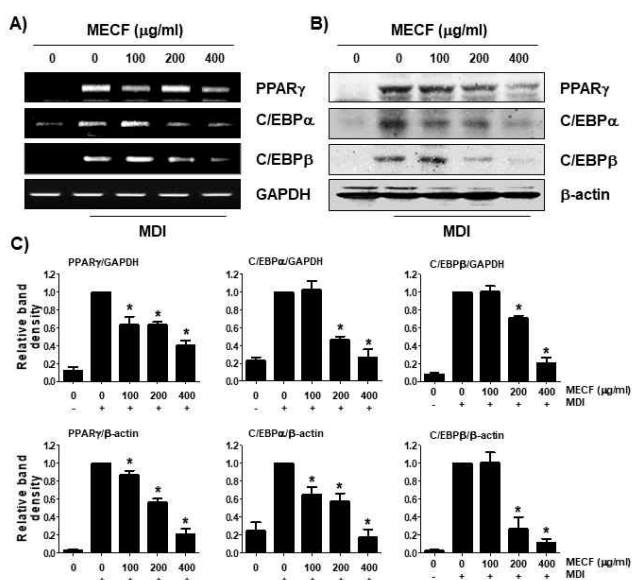


Figure 3. Effect of MECF on the expression of transcription factors involved in adipogenesis in 3T3-L1 cells. The cells were treated with the indicated concentrations of MECF along with differentiation induction medium and allowed to differentiate for 8 days. (A) The cellular RNA was isolated on the day 9, and RT-PCR was performed after measurement and reverse transcription. (B) Whole cell lysate was isolated and analyzed by Western blot analysis with respective antibodies. GAPDH and β -actin levels are shown as loading controls. (C) Bands were quantified using ImageJ and normalized to GAPDH and β -actin, and the ratio was determined. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments (* p < 0.05 indicates a significant difference compared to the control group).

4. B16F10 세포의 증식에 미치는 MECF의 영향

다음은 MECF의 멜라닌 생성 억제 효능 평가를 위한 실험 조건의 설정을 위하여 3T3-L1 세포에서와 같이 MTT 분석에 의한 세포 생존력에 미치는 MECF의 영향을 조사하였다. 동일한 조건에서 배양된 B16F10 세포에서도 3T3-L1 세포에서처럼 400 μ

g/ml 처리군까지는 세포 생존력에 변화가 없었지만, 600 μ g/ml 이상 처리군에서는 유의적인 세포 생존율의 저하가 관찰되었다(Figure 4). 따라서 B16F10 세포에서도 MECF의 효능 평가를 위한 처리 농도를 세포 독성이 없는 400 μ g/ml 이하로 설정하였다.

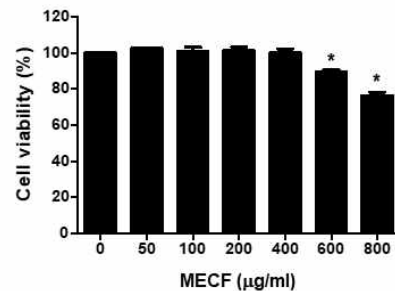


Figure 4. Effect of MECF on cell viability of B16F10 cells. The cells were seeded in 24-well plates at a density of 2×10^4 cells/well and incubated with the indicated concentrations of MECF. After 72 h, cell viability was analyzed by an MTT assay. Values are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments (* p < 0.05 indicates a significant difference compared to the control group).

5. B16F10 세포의 멜라닌 합성에 미치는 MECF의 영향

생체 내에서 멜라닌의 합성은 tyrosine으로부터 멜라닌 생성 효소에 의해 촉매되는 일련의 반응을 통하여 이루어진다[37,38]. MECF의 미백 효과를 조사하기 위하여 B16F10 세포에서 α -MSH의 처리에 의한 멜라닌의 합성에 미치는 MECF의 억제 효과를 조사하였다. Figure 5의 결과에서 알 수 있듯이, MECF가 전처리된 조건에서는 α -MSH 단독 처리된 세포에 비하여 MECF의 처리 농도가 증가할수록 세포 내 멜라닌의 함량이 유의적으로 억제되었다. 특히 400 μ g/ml의 MECF가 전처리된 경우, α -MSH에 의한 멜라닌의 생성을 40% 정도 억제시켰다. Tyrosinase는 포유류에서 멜라닌 합성의 핵심 효소 중 하나로서 tyrosine을 quinone과 indolquinone 화합물 등과 같은 중간체를 거쳐 멜라닌이 생성되게 한다[16,17,39]. 따라서 MECF에 의한 멜라닌 생성 억제가 tyrosinase 활성 저해와 연관성이 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 동일 조건에서 배양된 B16F10 세포의 tyrosinase 활성을 비교한 결과, MECF 처리 농도가 증가할수록 α -MSH에 의해 유도된 tyrosinase의 활성이 유의적으로 억제되었다(Figure 6A). 이러한 결과는 MECF가 tyrosinase 활성을 억제하여 멜라

닌 합성을 감소시킬 수 있음을 시사한다.

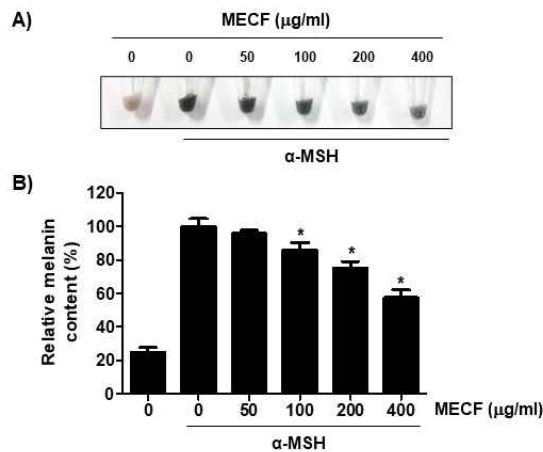


Figure 5. Anti-melanogenesis effect of MECF on B16-F10 melanoma cells. The cells were exposed to various concentrations of MECF for 72 h in the presence of 100 nM α-MSH. At the end of the treatment, the melanin contents were measured. (A) Images of pellets of B16F10 cells after harvest. (B) Determination of relative melanin contents. Data are reported as the means ± SD of three independent experiments carried out in triplicate (**p* < 0.05 indicates a significant difference compared to α-MSH-treated cells).

6. B16F10 세포에서 멜라닌 합성 관련 유전자의 발현에 미치는 MECF의 영향

멜라닌 합성에 중요하게 관여하는 유전자는 TRP-1 및 TRP-2를 포함하는 tyrosinase 계열 단백질 (family protein)이며, MITF는 이들의 발현을 조절하는 핵심 전사조절인자이다[39,40]. α-MSH는 MITF 발현을 강력하게 유도하여 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 발현을 전사적으로 자극하여 멜라닌 생성을 증가시킨다[17,41]. 따라서 이상에서 확인된 MECF의 멜라닌 생성 억제 기전을 밝히기 α-MSH에 의하여 유도된 이들 유전자의 발현에 미치는 MECF의 영향을 조사하였다. Figure 6B에 나타난 바와 같이, α-MSH로 자극된 B16F10 세포에서 tyrosinase의 단백질 수준은 α-MSH 단독 처리된 세포에 비해 MECF의 처리 농도 의존적으로 감소되어 MECF의 tyrosinase 활성 억제 효과는 이 효소의 발현 감소에 의한 것임을 알 수 있다. 이와 함께 TRP-1 및 TRP-2의 발현 또한 억제되었으며, 이는 MITF 발현 감소와 연관성이 있음을 보여주었다. 이러한 결과는 MECF에 의한 멜라닌 생성 억제가 MITF의 발현 억제를 통한 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 발현 차단에 의한 결과임을 시사한다.

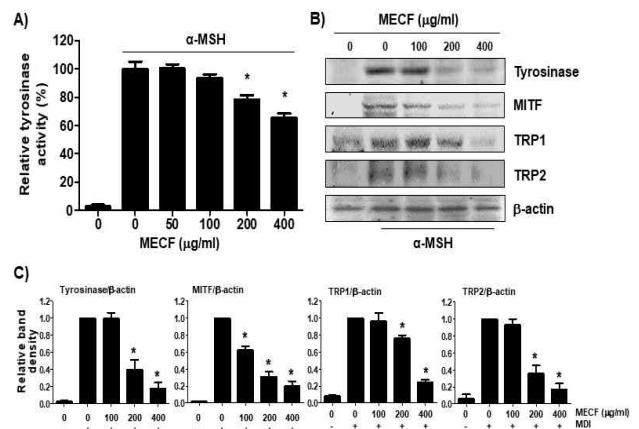


Figure 6. Effect of MECF on the activity of tyrosinase and expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 100 nM α-MSH in presence or absence of MECF at the indicated concentrations for 72 h. (A) Tyrosinase activity was measured by absorbance at 490 nm. Data are reported as the means ± SD of three independent experiments carried out in triplicate (**p* < 0.05 indicates a significant difference compared to α-MSH-treated cells). (B) Whole cell lysate was isolated and analyzed by Western blot analysis with respective antibodies. β-actin levels are shown as a loading control. (C) Bands were quantified using ImageJ and normalized to β-actin, and the ratio was determined. Data are expressed as the mean ± SD of three independent experiments (**p* < 0.05 indicates a significant difference compared to the control group).

본 연구에서는 청각의 기능성 평가를 위하여 MECF이 지질 및 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 MECF는 3T3-L1 세포에서 MDI의 자극에 의한 지질의 형성을 유의적으로 억제하였으며, 이는 PPARγ, C/EBPα 및 C/EBPβ와 같은 지방 세포의 분화에 관여하는 핵심 유전자들의 발현 억제와 연관성이 있었다. 아울러 MECF는 B16F10 세포에서 α-MSH 자극에 의한 멜라닌의 생성을 유의적으로 감소시켰으며, 이는 MITF의 전사 활성 감소에 의한 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 발현 차단에 의한 것임을 유추할 수 있었다. 비록 본 연구의 결과가 청각의 항비만 및 미백 효과에 대한 기초 자료로 활용이 될 수는 있겠지만, 본 연구의 결과를 바탕으로 이러한 효능과 연계된 세포 내 신호 전달계의 역할과 비만 및 미백 조절 관련 유전자들의 역할에 대한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

결론

본 연구에서는 녹조류인 청각 메탄올 추출물 (MECF)의 항비만 및 멜라닌 생성 억제 효과를 평가하였다. 본 연구의 결과에 의하면 MECF는 3T3-L1 지방 세포에서 TG의 축적을 억제하였으며, 지방 세포로의 분화 억제는 PPAR γ , C/EBP α 및 C/EBP β 와 같은 지방 형성 관련 전사 인자의 발현 억제와 관련이 있었다. 또한 MECF는 α -MSH 존재하에서 B16F10 세포의 tyrosinase 활성 및 melanin 함량을 감소시켰을 뿐만 아니라 색소침착에 핵심적인 역할을 하는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 MITF의 발현을 감소시켰다. 따라서 청각 추출물은 비만과 피부 색소침착의 예방 및 치료를 위한 유망한 기능성 소재로 활용될 수 있음을 알 수 있다.

References

- Hodson, L., Rosqvist, F., Parry, S. A. 2020. The influence of dietary fatty acids on liver fat content and metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 79, 30-41.
- Westerterp, K. R. 2018. Exercise, energy balance and body composition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 72, 1246-1250.
- Peyton, K. J., Liu, X. M., Shebib, A. R., Johnson, F. K., Johnson, R. A., Durante, W. 2018. Arginase inhibition prevents the development of hypertension and improves insulin resistance in obese rats. *Amino Acids* 50, 747 - 754.
- Koenen, M., Hill, M. A., Cohen, P., Sowers, J. R. 2021. Obesity, adipose tissue and vascular dysfunction. *Circ. Res.* 128, 951-968.
- Dias, S., Paredes, S., Ribeiro, L. 2018. Drugs Involved in dyslipidemia and obesity treatment: Focus on adipose tissue. *Int. J. Endocrinol.* 2018, 2637418.
- Rajjo, T., Mohammed, K., Alsawas, M., Ahmed, A. T., Farah, W., Asi, N., Almasri, J., Prokop, L. J., Murad, M. H. 2017. Treatment of pediatric obesity: An umbrella systematic review. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102, 763-775.
- Kumar, A., Chauhan, S. 2021. Pancreatic lipase inhibitors: The road voyaged and successes. *Life Sci.* 271, 119115.
- Narayanawami, V., Dwoskin, L. P. 2017. Obesity: Current and potential pharmacotherapeutics and targets. *Pharmacol. Ther.* 170, 116-147.
- Siebenhofer, A., Jeitler, K., Horvath, K., Berghold, A., Posch, N., Meschik, J., Semlitsch, T. 2016. Long-term effects of weight-reducing drugs in people with hypertension. *Cochrane. Database Syst. Rev.* 3, CD007654.
- Krentz, A. J., Fujioka, K., Hompesch, M. 2016. Evolution of pharmacological obesity treatments: focus on adverse side-effect profiles. *Diabetes Obes. Metab.* 18, 558-570.
- Desmedt, B., Courselle, P., De Beer, J. O., Rogiers, V., Grosber, M., Deconinck, E., De Paepe, K. 2016. Overview of skin whitening agents with an insight into the illegal cosmetic market in Europe. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 30, 943 - 950.
- Qian, W., Liu, W., Zhu, D., Cao, Y., Tang, A., Gong, G., Su, H. 2020. Natural skin-whitening compounds for the treatment of melanogenesis (Review). *Exp. Ther. Med.* 20, 173-185.
- Costin, G. E., Hearing, V. J. 2007. Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 21, 976 - 994.
- Ohbayashi, N., Fukuda, M. 2020. Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes. *F1000Res* 9 F1000.
- Pillaiyar, T., Manickam, M., Jung, S. H. 2017. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cell. Signal.* 40, 99-115.
- Pillaiyar, T., Namasivayam, V., Manickam, M., Jung, S. H. 2018. Inhibitors of melanogenesis: An updated review. *J. Med. Chem.* 61, 7395-7418.
- Smit, N., Vicanova, J., Pavel, S. 2009. The hunt for natural skin whitening agents. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 5326 - 5349.
- Draeos, Z. D. 2007. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. *Dermatol. Ther.* 20, 308 - 313.
- Ramos-Romero, S., Torrella, J. R., Pagès, T., Viscor, G., Torres, J. L. 2021. Edible microalgae and their bioactive compounds in the prevention and treatment of metabolic alterations. *Nutrients* 13, 563.
- Thiyagarasaiyar, K., Goh, B. H., Jeon, Y. J., Yow, Y. Y. 2020. Algae metabolites in cosmeceutical: An overview of current applications and challenges. *Mar. Drugs* 18, 323.
- Muhamad, I. I., Zulkifli, N., Selvakumaran, S. A., Lazim, N. A. M. 2019. Bioactive algal-derived polysaccharides: Multi-functionalization, therapeutic potential and bio-

- medical applications. *Curr. Pharm. Des.* 25, 1147-1162.
22. Wan-Loy, C., Siew-Moi, P. 2016. Marine algae as a potential source for anti-obesity agents. *Mar. Drugs* 14, 222.
 23. Sanjeeva, K. K. A., Lee, W., Jeon, Y.-J. 2018. Nutrients and bioactive potentials of edible green and red seaweed in Korea. *Fish. Aquat. Sci.* 21, 19.
 24. Kim, E., Cui, J., Kang, I., Zhang, G., Lee, Y. 2021. Potential antidiabetic effects of seaweed extracts by up-regulating glucose utilization and alleviating inflammation in C2C12 myotubes. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 1367.
 25. Monmai, C., Rod-In, W., Jang, A. Y., Lee, S. M., Jung, S. K., You, S., Park, W. J. 2020. Immune-enhancing effects of anionic macromolecules extracted from *Codium fragile* coupled with arachidonic acid in RAW264.7 cells. *PLoS One* 15, e0239422.
 26. Lee, C., Park, G. H., Ahn, E. M., Kim, B. A., Park, C. I., Jang, J. H. 2013. Protective effect of *Codium fragile* against UVB-induced pro-inflammatory and oxidative damages in HaCaT cells and BALB/c mice. *Fitoterapia* 86, 54-63.
 27. Lee, S. A., Moon, S. M., Choi, Y. H., Han, S. H., Park, B. R., Choi, M. S., Kim, J. S., Kim, Y. H., Kim, D. K., Kim, C. S. 2017. Aqueous extract of *Codium fragile* suppressed inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells and carrageenan-induced rats. *Biomed. Pharmacother.* 93, 1055-1064.
 28. Kang, C. H., Choi, Y. H., Park, S. Y., Kim, G. Y. 2012. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Codium fragile* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Med. Food.* 15, 44-50.
 29. Kolsi, R. B. A., Jardak, N., Hajkacem, F., Chaaben, R., Jribi, I., Feki, A. E., Rebai, T., Jamoussi, K., Fki, L., Belghith, H., Belghith, K. 2017. Anti-obesity effect and protection of liver-kidney functions by *Codium fragile* sulphated polysaccharide on high fat diet induced obese rats. *Int. J. Biol. Macromol.* 102, 119-129.
 30. Le Lay, S., Dugail, I. 2009. Connecting lipid droplet biology and the metabolic syndrome. *Prog. Lipid Res.* 48, 191-195.
 31. Padilla-Benavides, T., Velez-delValle, C., Marsch-Moreno, M., Castro-Muñozledo, F., Kuri-Harcuch, W. 2016. Lipogenic enzymes complexes and cytoplasmic lipid droplet formation during adipogenesis. *J. Cell Biochem.* 117, 2315-2326.
 32. Yang, X., Heckmann, B. L., Zhang, X., Smas, C. M., Liu, J. 2013. Distinct mechanisms regulate ATGL-mediated adipocyte lipolysis by lipid droplet coat proteins. *Mol. Endocrinol.* 27, 116-126.
 33. Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., Pepper, M. S. 2013. Adipocyte and adipogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 229-236.
 34. Spiegelman, B. M., Flier, J. S. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531 - 543.
 35. Muruganandan, S., Ionescu, A. M., Sinal, C. J. 2020. At the crossroads of the adipocyte and osteoclast differentiation programs: Future therapeutic perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2277.
 36. Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., Spiegelman, B.M. 2020. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14, 1293 - 1307.
 37. Serre, C., Busuttill, V., Botto, J. M. 2018. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. *Int. J. Cosmet. Sci.* 40, 328-347.
 38. Rzepka, Z., Buszman, E., Beberok, A., Wrześniok, D. 2016. From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis. *Postepy Hig. Med. Dosw (Online).* 70, 695-708.
 39. D'Mello, S. A., Finlay, G. J., Baguley, B. C., Askarian-Amiri, M. E. 2016. Signaling pathways in melanogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1144.
 40. Wan, P., Hu, Y., He, L. 2011. Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors. *Mol. Cell. Biochem.* 354, 241-246.
 41. Schallreuter, K. U. 2007. Advances in melanocyte basic science research. *Dermatol. Clin.* 25, 283-291,