

3T3-L1 지방 전구세포의 분화 및 지방 생성에 미치는 *Fragaria Orientalis* L. 물 추출물의 영향

최문열[#], 김미형, 김미려^{*}

대구한의대 한의과대학 본초약리학교실

Effects of *Fragaria Orientalis* Water extract on Adipogenesis and Cell Differentiation in 3T3-L1 Cells

Moon-Yeol Choi[#], Mi Hyung Kim, Mi Ryeo Kim^{*}

Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea

ABSTRACT

Objective : Obesity, which has recently been rapidly increasing in the obese population, is caused by an imbalance in energy intake and consumption. The reason why we need to manage obesity well is that the prevalence of complications such as diabetes, atherosclerosis, insulin resistance, and cardiovascular disease increases. In this study, the effect of FO (*Fragaria orientalis*) water extract on fat metabolism in 3T3-L1 cells was observed to develop a new anti-obesity material based on Mongolian medical books.

Methods : The effect of FO extract on adipogenesis in 3T3-L1 cells was observed using DPPH scavenging, pancreatic lipase inhibitory activity, MTT analysis and Oil-red-O staining method. And the expression of proteins related to lipid metabolism was analyzed by Western blot.

Results : The FO group significantly increased the DPPH radical scavenging activity at 5 mg/ml compared to the positive control BHA at 0,1 mg/ml. In oil red O staining at a safe concentration without cytotoxicity, lipid accumulation was significantly inhibited by less than 80% compared to the control group at all concentrations. Moreover, treatment of FO significantly increased the expression of proteins related to lipid metabolism, such as p-AMPK and p-ACC, in 3T3-L1 cells, and the expression of CPT-1 tended to increase in a dose-dependent manner. However, the expression of PPAR- γ was significantly decreased in a dose-dependent manner.

Conclusion : These results suggest that FO water extract has a potential anti-obesity effect and are expected to be utilized in the development of materials for obesity prevention and treatment.

Key words : Anti-obesity, *Fragaria Orientalis*, 3T3-L1, adipogenesis, lipid metabolism

*Corresponding author : Mi Ryeo Kim, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea.

· Tel : +82-53-770-2361

· E-mail : mrkim@dhu.ac.kr

#First author : Moon-Yeol Choi, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea.

· Tel : +82-53-770-2241

· E-mail : filesx1@naver.com

· Received : 17 April 2024

· Revised : 24 April 2024

· Accepted : 25 May 2024

I. 서론

세계보건기구(WHO)의 보고에 따르면 2022년 세계 비만 인구는 10억 명을 넘어섰고, 이는 30년 전에 비하여 두 배가 증가한 수치이다. 총비만 인구 중 8억 7900만 명은 성인, 청소년 및 어린이의 1억 6000만명이 비만인 것으로 보고되었다. 비만 인구뿐만 아니라 전 세계 성인 인구의 43%는 과체중이며 풀링 분석 데이터는 2030년에는 과체중 인구가 총 21억 6천만 명, 비만 인구가 총 11억 2천만 명이 될 것으로 예측한다¹⁾. 비만율은 저소득, 중위소득 국가에서 급증하고 있고 최근 COVID-19 대유행으로 비만인구의 증가 추세는 더 악화되고 있다. 팬데믹 기간 동안의 식품 소비 및 신체 활동 패턴의 변화, 이동과 야외 행사에 대한 엄격한 제한은 인간 건강에 영향을 미치며 비만 환자 증가의 원인이 되었다²⁾.

비만은 대사 장애와 지방 조직 기능 장애를 유발하며, 이는 당뇨병, 고혈압, 죽상동맥경화증, 인슐린 저항성 및 심혈관 질환을 포함한 다양한 질병으로 이어진다³⁾. 이러한 질환들은 장기적으로 수명을 단축시키므로 적극적인 치료와 관리가 필요하며 비만도 질병으로 정의하고 있다. 비만은 주로 고열량 음식 섭취와 신체 활동 감소로 인한 에너지 섭취와 소비 사이의 불균형으로 인해 발생하며 개인의 유전적 요인도 비만에 기여한다고 알려져 있다^{4,5)}. 백색 지방 조직 (white adipose tissue, WAT)으로 알려진 체지방의 과도한 축적은 비만을 야기시키며, 이는 지방전구세포로부터 새로운 지방세포의 형성과 성숙한 지방세포의 크기를 증가시키는 두 가지 메커니즘에 의해 매개된다. 따라서 지방세포의 크기와 수를 모두 조절하는 것은 지방 생성과 비만을 억제하는 것이 중요하다⁶⁾.

비만 판정의 기준은 몸속에 저장되어있는 지방의 직접적인 측정은 불가능하기 때문에 신체의 각 부분, 허리둘레, 엉덩이 둘레 등의 측정과 체질량 지수 등으로 체지방을 추정하고 있다. 그 중 체질량 지수는 측정이 쉽고 체지방과 연관되어 있기 때문에 체지방측정의 중요한 지수로 사용된다. 세계보건기구 아시아 태평양 기준(WHO, Asia-Pacific Perspective, 2000)은 성인 아시아인의 체질량지수 25 kg/m^2 이상을 비만, 23 kg/m^2 이상을 과체중으로 구분하였고 우리나라도 이 기준을 적용하고 있다⁷⁻⁹⁾. 체질량지수 30 kg/m^2 일 경우 당뇨병의 위험성은 10배, 압으로 인한 사망률은 20%, 담석증의 위험은 3배 이상 증가되는 것으로 알려져 있다. 또한, 비만은 건강상태에 영향을 미칠 뿐만 아니라 경제적인 부담도 가중시킨다. 세계보건기구는 전세계적으로 비만으로 인한 의료비용이 2~8%를 차지한다고 하였다.

이에 비만 치료에 대한 다각적 시도가 진행 중이며 비만의 정도에 따라 비약물요법으로 열량제한식이, 신체 활동의 증가, 행동치료 등이 우선적으로 시도되고 있다. 비만의 치료법으로 생활방식 수정을 통한 비약물요법이 바람직하나 이러한 치료에도 불구하고 체중감량에 성공하지 못하는 경우 약물치료 및 수술 치료를 고려하게 된다¹⁰⁻¹⁴⁾.

비만치료제는 크게 중추신경계에 작용하여 식욕에 영향을 주는 약제, 중추신경계 혹은 말초에 작용하는 열 생성 촉진제 및 위장관에 작용하여 흡수를 저하시키는 약제로 구분할 수 있다¹⁰⁻¹¹⁾. 이들은 다시 단기, 장기 치료제로 구분할 수 있으며, 장기적으로 많이 사용되고 있는 비만치료제로 lipase를 억제

하는 Orlistat (Xenical)와 GLP-1 (Glucagon like peptide-1) 수용체 효능제인 Liraglutide (Saxenda), Semaglutide (Wegovy) 및 복합제인 Pentermine/topiramate(Qsymia), Natrexone/bupropion (Contrave) 등이 있다. 영양분 섭취 억제 기전을 통한 비만치료제로 유일하게 FDA의 승인을 받은 Orlistat의 경우, 변질박증, 대변실금, 지방변 및 대변 횡수 증가, 지용성 비타민의 흡수 장애 등의 부작용을 유발한다. 또한 최근 주목받고 있는 GLP-1 수용체 효능제의 경우도 자살 위험 증가, 급성 담관질환 증가 등 부작용이 있다고 보고되고 있다¹⁵⁾. 따라서 최근에는 이 약물보다 부작용이 적고 안전하며 체중 조절에 효과적인 천연 소재를 활용한 연구가 많이 이루어지고 있다. 본 연구팀에서도 이전 선행 연구로 여러 한약재 투여와 한약재 정유 물질의 흡입으로 인한 비만 제어 작용을 규명한 바 있다. 우리나라에 자생되며 아직도 그 효과가 규명되지 않은 한약재 및 생약 유래 물질의 발굴 필요성이 절실하며 기능성 제품화 및 의약품 개발로 연결된다면 비만 치료에도 많은 도움을 줄 것으로 생각된다.

Fragaria orientalis Losinsk (FO)는 석류성, 다년생, 장미과 식물로 한국, 몽골, 러시아 동부 및 중국에 널리 분포한다¹⁶⁾. 야생딸기로 불리는 FO는 환경에 적응하기 위해 점차 추위와 가뭄에 강하게 진화한 품종으로¹⁷⁾, 종 또는 생태학적 특성에 대한 연구는 진행되고 있지만, 약리학적 효능에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 지방전구세포를 분화시킨 후 FO를 처리한 후 지방분화 및 대사 관련 단백질 분석하여 항비만 효능을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 제조

본 실험에 사용된 *Fragaria Orientalis*의 물 추출물은 몽골 전통 의학 학술 연구소 및 몽골 국립 의과대학 소속인 연구팀에서 공급받아 사용하였다. FO는 몽골 Uburkhangai aimag에서 7월경 채집되었으며, 채집 후 건조하였다. 전초를 건조 작업을 거쳐 건조된 원료를 적당한 크기로 분쇄하였다. 건조 원료 200 g에 10배수의 DW (distilled water)를 첨가한 뒤, heating mantle (NP33.1, Pilz, Ostfildern, Germany)을 사용하여 100℃에서 2시간 가열하였다. 추출액은 여과하여 잔류물을 버리고 진공원심분리기 (RE-301, Equipment Co, Zhengzhou, China)로 농축하였으며, 이후 freeze-dryer (7753027, Labconco, Missouri, USA)를 사용하여 동결건조한 분말 350g을 얻었다. 분말 형태로 건조된 추출물은 사용 전까지 -80℃에서 냉동보관 후 사용하였다.

2. 방법

1) DPPH 전자 공여능 측정

전자공여능 측정은 Blois¹⁸⁾의 방법을 보완하여, DPPH free radical 소거법으로 측정하였다. 5, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml로

희석한 추출물과 0.1 mg/ml 양성대조군 Butylated hydroxyl anisole (BHA, Sigma, Missouri, USA) 각각 100 μ l에 0.2 mM DPPH 시약 (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma, Missouri, USA)을 50 μ l씩 첨가한 후 vortex mixer (G-560, Scientific industries)로 혼합하고, 차광된 상태에서 30분간 실온에서 반응시켰다. 그 후, 반응액을 517 nm로 흡광도로 Micro plate reader를 이용하여 측정하였다.

2) Pancreatic lipase 활성 측정

pH 6.8 Enzyme buffer (10 mM Morpholino propane sulfanic acid (MOPS, Sigma, st. Louis, MO, USA), 1 mM Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, generay, Shanghai, China)에 porcine pancreatic lipase (Sigma, st. Louis, MO, USA)를 2.5 mg/ml 농도로 녹여 사용하였다. porcine pancreatic lipase가 혼합되어 있는 enzyme buffer 와 pH 7.0 Tris buffer (100 mM Tris-HCl (Affymetrix, California, USA), 5 mM CaCl₂ (Duksan, Ansan, Korea)) 와 FO 추출물을 각각 혼합하여, 37°C에서 15분간 배양하였다. 배양이 끝난 후, Substrate solution (4.184 mg/ml p-nitriphenyl butyrate (Sigma, st. Louis, MO, USA) in Dimethyl formamide (DMF, sigma, st. Louis, MO, USA)를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양시켜 Micro plate reader를 이용하여 흡광도 405 nm에서 측정하였다.

3) 세포 배양

3T3-L1 지방 전구세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)에서 구입하여 사용하였으며, high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher, Massachusetts, USA)에 10% bovine calf serum (BCS, Thermo Fisher, Massachusetts, USA) 및 1% penicillin-streptomycin (P/S, Thermo Fisher, Massachusetts, USA)를 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 이후, 분화유도 배지 (10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher, Massachusetts, USA), 1% P/S, 111 μ g/ml 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Thermo Fisher, Massachusetts, USA), 5 μ g/ml insulin (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) 및 2 μ M dexamethasone (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) 을 포함하는 High glucose DMEM 배지)를 사용하여 분화를 유도하였다. 48시간 후, 10% FBS, 1% P/S 및 5 μ g/ml insulin을 포함하는 배지로 교환하여 성숙한 지방세포로 배양하였다. 추출물은 0.05, 0.1 및 0.2 mg/ml 농도로 배지와 같은 조건으로 처리하였다.

4) Cell viability 측정

FO 물 추출물이 3T3-L1 세포에 미치는 독성을 알아보기 위해, MTT assay를 이용하여 측정하였다. 3T3-L1 세포를 0.2×10^6 cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 적응시켰다. 적응 후 추출물을 농도별로 24시간 처리하였다. 24시간 후, 1 mg/ml 농도의 MTT 시약 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-phenyltetra-

olium Bromide, Sigma, Missouri, USA)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. 4시간 반응 후, 상층액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, Missouri, USA)를 처리하여 MTT formazan을 녹여 570nm 흡광도로 Micro plate reader를 이용하여 측정하였다.

5) Oil-red O 염색

3T3-L1 지방 전구세포에 대한 지방 분화 및 지방 축적 억제에 대한 FO 물 추출물의 영향을 확인하기 위해, Oil red O 염색을 시행하였다. 세포 분화가 진행되는 동안, 2일 주기로 배지를 교환하였으며 배지 교체기간 동안 각 추출물을 0.05, 0.1 및 0.2 mg/ml 농도로 함께 처리하였다. 분화 8일 후, 세포 배양액을 제거하고 증류수로 3회 세척 한 후 pH 7.2 cacodylate buffer (100 mM cacodylate, 2.5% glutaraldehyde (Sigma, Missouri, USA), 2% formaldehyde (Junsei, Tokyo, Japan), 5% sucrose 및 0.025% CaCl₂ (Duksan, Ansan, Korea)로 4°C에서 2시간 동안 세포를 고정하였다. 고정이 완료된 세포는 증류수로 세척 하였으며, Oil-red O 시약 (Sigma, Missouri, USA)으로 염색한 뒤 건조하였다. 염색된 3T3-L1 세포의 지방함량을 측정하기 위해 100% isopropyl alcohol (Junsei, Tokyo, Japan)로 지방을 추출하여 520nm 흡광도로 Micro plate reader를 이용하여 측정하였다.

6) 지질대사 관련 단백질 발현 측정

3T3-L1 지방 전구세포에서 지질대사 관련 단백질 발현에 대한 FO 물 추출물의 효과를 확인하기 위해, western blot을 진행하였다. 세포 분화가 진행되는 동안, 2일 주기로 배지를 교환하였으며 각 추출물을 농도별로 0.05, 0.1 및 0.2 mg/ml 함께 처리하였다. 분화 8일 후, 세포 배양액을 제거하고 DPBS로 3회 세척 한 후 Halt™ Protease 및 Phosphatase inhibitor cocktail (Thermo fisher, Massachusetts, USA)가 포함된 Ratio immunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer, Thermo fisher, Massachusetts, USA)으로 처리된 세포를 얼음 위에서 긁어낸 후 30분간 lysis하였다. 이후, 13,000rpm 및 4°C 조건에서 30분간 원심분리 후 상층액을 채취하여 Bradford 시약을 이용하여 단백질 정량을 시행하였다. 30 μ g의 단백질을 β -actin (1:3000; dilution, Cell Signaling, USA), AMPK (Adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase), phospho-AMPK, ACC (Acetyl-CoA), phospho-ACC, PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ , 1:1000; dilution, Cell Signaling, USA) 및 CPT-1 (Carnitine palmitoyl transferase I, 1:1000; dilution, abcam, USA)를 이용하여 Western blot을 시행하였다. 이후, ECL reagent (Amersham Biosciences, USA)을 멤브레인하고 반응시켜 웨스턴 밴드를 검출한 후, image analyzer (Uvitec Cambridge, Alliance, England, United Kingdom)를 이용하여 각 인자의 발현 정도를 분석하였다.

7) 통계 분석

모든 데이터의 통계처리는 SPSS statistics (v. 27.0, USA)을 이용하여 평균차이에 대한 유의성 검정은 one-way analysis

of variance (ANOVA)을 이용하여 분석하였다. Duncan's multiple range test를 사용하여 각 군의 통계적 유의성을 $p < 0.05$ 이상의 수준에서 검증하였다. 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다.

III. 결 과

1. DPPH 전자공여능 측정

FO 추출물을 0.1, 0.5, 1, 5 mg/ml 농도로 처리하여 DPPH 소거활성을 측정한 결과, FO 추출물은 각 $80.63 \pm 1.2\%$, $81.41 \pm 0.46\%$, $80.76 \pm 0.55\%$ 및 $103.4 \pm 5.05\%$ 로 양성 대조군인 BHA에 비해 고농도 군에서 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 1).

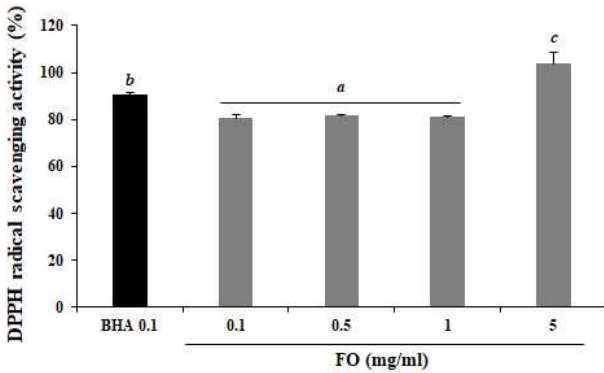


Fig. 1. Effects of *Fragaria Orientalis* water extract on DPPH radical scavenging activities. Data represent mean \pm S.E. Non-overlapping or different letters above bars indicate significant differences between bars according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$, $n=3$). BHA ; Butylated hydroxyl anisole (mg/ml).

2. Pancreatic lipase 활성 억제에 미치는 영향

FO 추출물의 pancreatic lipase 활성 억제 효능을 평가하기 위해 pancreatic lipase를 반응시킨 뒤, 억제율(%)을 계산하였다. 실험 결과, 추출물 1 mg/ml에서 pancreatic lipase 활성 억제율을 Table 1과 같이 나타냈다. FO 시료 1 mg/ml에서의 pancreatic lipase 활성 억제효과는 대조군 대비 49.2%의 억제율을 보였다(Table 1).

Table 1. Effects of FO on pancreatic lipase inhibition

Mongolia medicine	Pancreatic lipase inhibition (%)
<i>Fragaria orientalis</i>	$49.25 \pm 0.16\%$

Data are mean \pm S.E. Pancreatic lipase inhibitory activity of the FO at 1 mg/ml

3. Cell viability에 미치는 영향

FO 추출물의 3T3-L1 지방전구세포에서의 세포독성을 알아보기 위해 각각 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1 mg/ml 농도로 처리하여 본 결과, 세포 생존율은 각각 $118.02 \pm 1.66\%$, $114.44 \pm 0.91\%$, $115.42 \pm 2.14\%$, $106.5 \pm 2.7\%$, $63.77 \pm 2.08\%$ 및 $31.15 \pm 5.01\%$ 로 나타났다. 또한, 0.8 및 1 mg/ml 농도에서 FO 처리군을 제외한 모든 군에서 세포 생존율이 80% 이상이었다 (Fig.2).

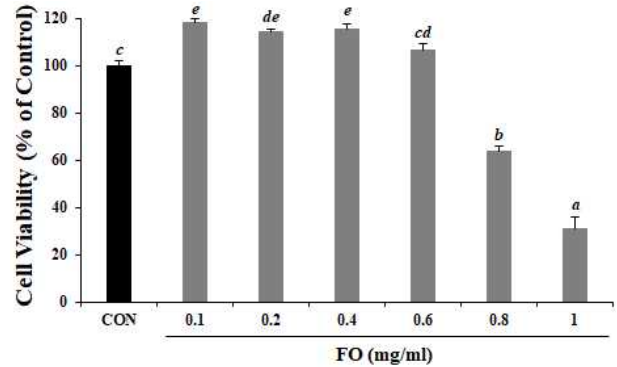


Fig 2. Effect of *Fragaria Orientalis* water extract on cell viability (% of control) in 3T3-L1 cells. Data represent mean \pm S.E. Non-overlapping or different letters above bars indicate significant differences between bars according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$, $n=3$).

4. 지방축적에 미치는 영향

3T3-L1 지방 전구세포에서 FO 추출물이 지질 축적에 미치는 영향을 알아보기 위해 0.05, 0.1 및 0.2 mg/ml 농도로 처리한 후 세포 내 지방축적에 대한 효과를 Oil red O 염색을 통해 비교 분석하였다. 그 결과, $72.85 \pm 2.08\%$, $40.76 \pm 4.84\%$ 및 $21.66 \pm 0.3\%$ 로 모든 농도에서 대조군에 비해 80% 미만으로 나타났으며 지방세포 분화 및 지질 축적 억제농도 농도의존적으로 나타났다. 특히 0.2 mg/ml의 농도에서 가장 효과적인 지방 억제 효과를 나타내었다.(Fig. 3).

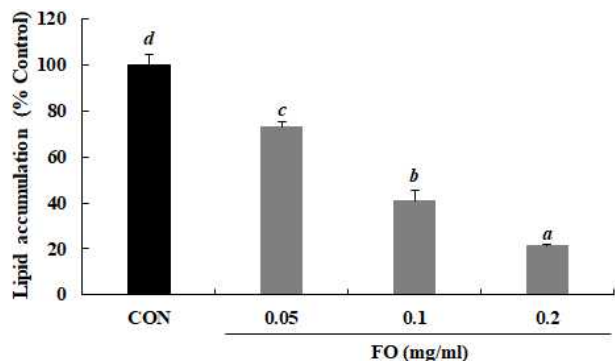


Fig 3. Effect of *Fragaria Orientalis* water extract on lipid accumulation (% of control) in 3T3-L1 cells. Data represent mean \pm S.E. Non-overlapping or different letters above bars indicate significant differences between bars according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$, $n=3$).

5. 지질대사 관련 단백질 발현에 미치는 영향

FO 추출물의 효과를 확인하기 위해 지질대사 관련 인자인 p-AMPK, p-ACC, PPAR- γ 및 CPT-1의 단백질 발현을 비교 분석하였다(Fig 4a-d). 세포 내의 에너지 항상성 유지에 센서 역할을 하는 효소인 AMPK(phosphoAMP-activated protein kinase)의 인산화는 대조군에 비해 모든 군에서 증가하는 것으로 관찰되었다. 특히, 0.1 및 0.2 mg/ml의 농도에서 1.58 ± 0.4 및 1.92 ± 0.21 로 유의한 증가가 관찰되었다(Fig 4a). 지방생성에 관여하는 효소인 ACC(phospho acetyl CoA carboxylase)의 인산화 역시 FO를 0.05, 0.1 및 0.2 mg/ml의

농도로 처리한 군에서 각각 0.79 ± 0.05 , 0.88 ± 0.007 및 0.78 ± 0.05 으로 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig 4b). 지질대사와 지방세포 분화의 주된 조절자인 PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ)의 단백질 발현은 모든 농도 그룹에서 0.43 ± 0.05 , 0.39 ± 0.05 및 0.45 ± 0.05 로 유의한 감소를 보였다(Fig 4c). 지방산 산화에 관여하는 CPT-1(Carnitine palmitoyltransferase-1)의 단백질 발현은 농도 의존적으로 0.36 ± 0.03 , 0.41 ± 0.07 및 0.42 ± 0.06 로 증가하였다(Fig 4d).

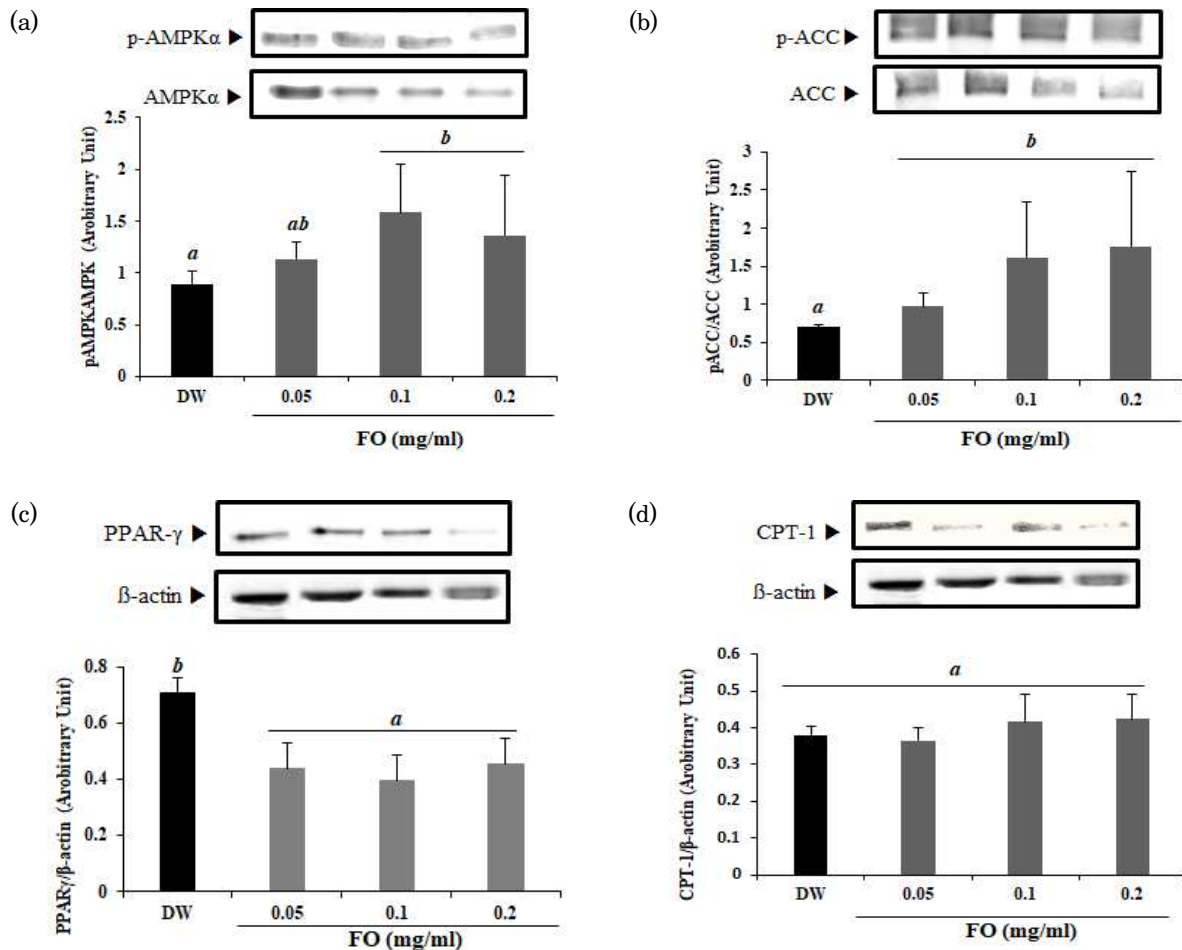


Fig.4. Effect of *Fragaria Orientalis* water extract on AMPK and ACC phosphorylation, PPAR- γ and CPT-1 protein expressions in 3T3-L1 cells.

Data represent mean \pm S.E. Non-overlapping or different letters above bars indicate significant differences between bars according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$, $n=3$).

IV. 고 찰

비만은 비정상적인 체내 지방축적으로 유도되는 질병으로 지난 45년 동안 3배 증가한 유병률을 가진 주요 공중 보건 문제이다¹⁹⁾. 또한, 2015년 글로벌 질병 부담 연구 분석에서 높은 BMI지수는 전 세계적으로 400만 명의 사망을 야기하고 1억

2천만 명의 장애 유도를 일으키는 것으로 보고되었다²⁰⁾. 비만은 환자의 삶의 질에 심각한 영향을 미치는 제2형 당뇨병, 심혈관 질환 및 비알코올성 지방간 질환을 포함한 다양한 만성 대사 질환의 발달과 밀접한 관련이 있다²¹⁾. 항비만 약물에는 지방을 분해하는 췌장 리파아제 억제제 orlistat 및 식욕억제제인 여러 약물 등이 있으나, 식욕을 억제하는 많은 약물들이 환자에게

심혈관계 질환, 우울감, 불안, 자살 및 암 위험의 증가 등 심각한 부작용의 위험성이 있어서 시장에서 퇴출되었다²²⁾. 따라서, 안전하고 효과적인 치료법, 특히 항비만 활성을 갖는 천연물에 많은 관심이 쏠리고 있다²³⁾. 이에, 본 연구에서는 FO (*Fragaria orientalis*)의 항비만 효능을 입증하기 위해 3T3-L1 세포에 FO 물 추출물을 처리하여 지방 축적 억제 효과를 분석하였다.

산화 스트레스는 지방 조직 내 지방 축적 및 지방 세포의 분화를 자극한다²⁴⁾. Lim 등은 기능성 물질 개발 연구의 일환으로 아사이베리, 블루베리, Corni 및 오디의 에탄올 추출물을 사용하여 DPPH의 라디칼 소거능을 측정했다. 그 결과, 0.5 mg/ml 기준으로 50% 이상의 전자 공여 효과를 나타냈다²⁵⁾. 또한 같은 베리류로 항산화능이 뛰어난 것으로 알려진 복분자 추출액의 DPPH의 라디칼 소거능이 93.60%, 블랙커런트 추출액이 79.38%를 나타내었고 아사이베리, 자색당근, 블루베리 순으로 높은 라디칼 소거능을 나타내었다.²⁶⁾ 이는 본 연구에서 나타난 FO의 항산화 활성 또한 80% 이상으로 우수한 효과를 나타냈음을 시사한다(Fig.1). FO의 세포 독성과 독성을 나타내지 않는 범위 내에서 지방 생성 및 지방 세포 분화 억제 효과를 관찰하였다. 항비만 효과는 농도 의존적으로 나타났으며, 0.05 mg/ml의 낮은 농도에서도 80% 이하로 대조군에 비해 지방 생성 및 지방 세포 분화를 유의하게 억제하였다(Fig.3).

AMP 활성화와 단백질 키나제(AMPK)는 중요한 세포 에너지 센서이다²⁷⁾. AMP 활성화와 단백질 키나제(AMPK)를 활성화하는 것은 동화 경로를 억제하고 이화 경로를 향상시킴으로써 비만 및 대사 장애를 치료할 수 있는 잠재적인 전략으로 항상 고려되어 왔다²⁸⁾. AMPK의 다운스트림으로도 알려진 ACC는 지방세포에서 지방산 합성 및 산화에 관여하는 효소를 조절하는 다중 소단위 효소로 말로닐-CoA를 생성한다²⁹⁾. 즉, AMPK의 인산화가 활성화되면 지질을 합성시키는 ACC의 인산화시키고 불활성화 시키며, 그 결과로 CPT1의 활성을 증가시키고 지방산 산화를 증가시킨다. FO를 처리한 군의 AMPK의 인산화를 확인한 결과, 모든 군에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며, 특히 0.1 및 0.2 mg/ml의 농도에서 유의한 증가를 보였다. ACC의 인산화 또한 고농도군에서 유의한 증가를 보였다(Fig. 4a-b). 이는 ACC가 AMPK 인산화에 의한 ACC의 인산화로 인해 비활성화되었음을 시사한다. 카르니틴 팔미토일 전이효소 I(CPT-1)는 말로닐-CoA를 억제하여 지방생성을 감소시키고, 장사슬 지방산의 미토콘드리아로의 β -산화 과정을 조절한다³¹⁾. 본 연구에서는 대조군에 비해 유의한 증가를 보이지는 않았으나, 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내고 있으며 이는 고농도 군일수록 지방생성을 억제하는 것을 나타내었다. 피옥시즘 증식자 활성화 수용체(PPAR)은 3T3-L1 지방세포의 분화에 중요한 전사 인자로 PPAR- γ 는 PPAR 서브패밀리의 구성체이다. PPAR- γ 는 지방세포 지방산 결합 단백질 2(aP2) 유전자의 지방세포 특이적 인핸서인 지방세포 조절 인자 6의 구성 요소이며, 지방생성에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 활성화시킨다³⁰⁾. 본 연구에서 PPAR- γ 발현 수준이 모든 군에서 유의하게 감소하여 지방세포의 분화가 모든 농도에서 유의하게 억제된 결과는 지방생성에 관여하는 유전자의 발현이 억제될 수 있음을 시사한다(Fig. 4c).

위의 모든 결과를 종합해 보면, FO 물추출물은 높은 항산화능을 가지며, 3T3-L1 세포에서 지질 축적이 유의하게 억제

되었고, ACC와 AMPK 인산화가 유의하게 증가되었다. 또한, FO 처리 역시 PPAR- γ 를 유의하게 감소시켜 항비만 효능에 유의한 결과를 보였다. 이러한 결과를 통해, FO 추출물은 지방생성에 관여하는 유전자의 발현, 지방전구세포의 분화 및 지방산 산화를 억제할 수 있을 것으로 추측된다. 따라서 FO 추출물은 기존 비만치료제의 부작용을 최소화하는 천연 소재로서, 비만 치료 및 예방 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 한편 FO 추출물의 지방세포 분화 및 지방 대사 억제에 관한 효능은 추후 동물실험 및 기전 연구를 통해 뒷받침되어야 할 것이다.

V. 결 론

FO 추출물이 지방 전구세포의 분화 및 지방 축적에 대한 효과를 실험한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH 라디칼 소거능 분석을 통해 FO 추출물의 고농도군에서 유의한 항산화 효과를 나타냈다.
2. Oil red O staining 결과, FO 추출물은 모든 농도군에서 유의하게 지질 축적을 억제하였다.
3. FO 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 지질대사와 관련된 p-AMPK, p-ACC와 같은 지질 대사 관련 단백질의 발현을 유의적으로 증가시켰고 CPT-1의 단백질 발현은 농도의존적으로 증가시키는 경향을 나타냈다. 또한 FO 추출물은 PPAR- γ 의 발현은 유의하게 감소시켰다.

따라서, FO 추출물은 지방전구세포의 분화 및 지방 축적을 억제시켰으며, 이는 지질대사 관련 단백질을 통해 일어나는 것으로 사료된다. 그러므로 FO은 비만 치료 및 예방을 위한 천연 기능성 소재로 활용될 수 있을 것으로 보인다.

References

1. Abbas MA, Boby N, Lee EB, Hong JH, Park SC. Anti-obesity effects of Ecklonia cava extract in high-fat diet-induced obese rats. *Antioxidant*, 11:310, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11020310>
2. Clemmensen C, Petersen MB, Sorensen TIA. Will the COVID-19 pandemic worsen the obesity epidemic?. *Nat Rev Endocrinol*, 16:469-470, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0387-z>
3. Kai Y, Gao JT, Liu H, Wang YB, Tian CR, Guo S, He L, Li M, Tian ZW, Song XF. Effects of IL-33 on

- 3T3-L1 cells and obese mice models induced by a high-fat diet. *Int Immunopharmacol*. 101:108209, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108209>
4. Blakemore AIF, Froguel P. Is obesity our genetic legacy?. *J. Clin Endocrinol Metab*. 93(11):51-56, 2008. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1676>
 5. Thaker VV. Genetic and epigenetic causes of obesity. *Adolesc Med State Art Rev*. 28(2):379-405, 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116>
 6. Han HS, Chung KS, Shin YK, Lee SH, Lee KT. Standardized *Hydrangea serrata* (Thunb.) Ser. extract ameliorates obesity in db/db Mice. *Nutrients*. 13:3624, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13103624>
 7. World Health Organization; International Obesity Task Force. *The Asian-Pacific Perspective: Redefining Obesity and Its Treatment*. Geneva: WHO Western Pacific Region, 2000.
 8. Korean Endocrine Society; Korean Society for the Study of Obesity. *Management of obesity, 2010 recommendation*. *Endocrinol Metab* 2010;25:301-304.
 9. Oh SW, Shin SA, Yun YH, Yoo T, Huh BY. Cut-off point of BMI and obesity-related comorbidities and mortality in middle-aged Koreans. *Obes Res* 12:2031-2040, 2004.
 10. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity: Long-term pharmacotherapy in the management of obesity. *JAMA* 276:1907-1915, 1996
 11. Clinical practice guidelines committee. *Clinical practice guidelines for obesity 2022*. Korean Society for the study of obesity. 2022.
 12. WHO Western Pacific Region, International Association for the Study of Obesity, International Obesity Task Force: *The Asia-Pacific Perspective: Redefining Obesity and Its Treatment*. pp. 15-21, Sydney, Australia, Health Communications Australia, 2000.
 13. Hensrud DD: Pharmacotherapy for obesity. *Med Clin North Am* 84:463-476, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03453>
 14. Padwal RS, Majumdar SR: Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet* 369:71-77, 2007 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60033-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60033-6)
 15. Ozge TC, Mustafa C, Dimitri PM, Manfredi R. Novel Anti-obesity Therapies and their Different Effects and Safety Profiles: A Critical Overview. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 16:1767-1774, 2023.
 16. Zhang Y, Zhang Q, Sammul M. Physiological integration ameliorates negative effects of drought stress in the clonal herb *Fragaria orientalis*. *PLOS ONE*. 7(9), 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044221>
 17. Han Y, Wu HB, Liu Y. The complete chloroplast genome sequence of *Fragaria orientalis* (Rosales: Rosaceae). *Mitochondrial DNA Part B : Resources*. 3(1):127-128, 2018. <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1424578>
 18. Blois MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*. 1958 ; 191 : 1199-1200.
 19. Ahmad NN, Robison S, Martin TK, Poon JL, Kan H. Clinical outcomes associated with anti-obesity medications in real-world practice: a systematic literature review. *Obesity Rev*. 22: 2021. <https://doi.org/10.1111/obr.13326>
 20. GBD 2015 obesity collaborators. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N Eng J Med*. 377:13-27, 2017. <https://DOI:10.1056/NEJMoa1614362>
 21. Wu Y, Tan F, Zhang TY, Xie BL, Ran LX, Zhao X. The anti-obesity effects of lotus leaves on high-fat-diet-induced obesity by modulating lipid metabolism in C57BL/6J mice. *Appl Biol Chem*. 63:61, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00541-x>
 22. Papamargaritis D, Carel WR, Jens JH, Melanie JD. New therapies for obesity. *Cardiovas Res*. 119: 2825-2842, 2023. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac176>
 23. Zhang J, Wang D, Wu Y, Li W, Hu Y, Zhao G, Fu C, Fu S, Zou L. Lipid-polymer hybrid nanoparticles for oral delivery of Tartary buck-wheat flavonoids. *J Agric Food Chem*. 66(19):4923-4932, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00714>
 24. Utami S, Endrini S, Nafik S, Lestari IMT, Anindya D, Bakar EA, Rozy F, Said FF, Afifah E, Arumwardana S, Nufus H, Rihibiha DD, Kusuma HSW, Wibowo SHB, Widowati W. In vivo antioxidant and anti-obesity activities of freeze-dried *Canarium* sp. *Averrhoa bilimbi* L. and *Malus domestica*. *Indones Biomed. J*. 11(3):320-326, 2019. <https://doi.org/10.18585/inabj.v11i3.728>
 25. Lim HJ, Lee HJ, Lim MH. Antioxidant activity of acaiberry, blueberry, corni, and mulberry. *Kor J Aesthet Cosmetol*. 13(3):445-452, 2015.
 26. Kang SN, Lee SH, Shim YN, Oh MJ, Lee NR, Park SM. Antioxidant capacity of anthocyanin-rich fruits and vegetables and changes of quality characteristics of black carrot added pudding according to storage. *J Appl Biol Chem*. 59(4), 273-280, 2016. <http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2016.047>
 27. Liu H, Wang J, Liu M, Zhao H, Yaqoob S, Zheng M, Cai D, Liu J. Antiobesity effects of ginsenoside Rg1 on 3T3-L1 preadipocytes and high fat diet-induced obese mice mediated by AMPK. *Nutrients*. 10:830, 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10070830>
 28. Li Q, Lai X, Sun L, Cao J, Ling C, Zhang W, Xiang

- L, Chen R, Li D, Sun S. Antiobesity and anti-inflammation effects of hakka stir-fried tea of different storage years on high-fat diet-induced obese mice model via activating the AMPK/ACC/CPT1 pathway. *J Food Nutr Res.* 64:1681, 2020. <https://doi:10.29219/fnr.v64.1681>
29. Li S, He N, Wang L. Efficiently anti-obesity effects of unsaturated alginate oligosaccharides (UAOS) in high-fat diet (HFD)-fed mice. *Mar Drugs.* 17:540, 2019. <https://doi.org/10.3390/md17090540>
30. Yang SH, Ahn EK, Lee JA, Shin TS, Tsukamoto C, Suh JW, Mei I, Chung G. Soyasaponins Aa and Ab exert an anti-obesity effects in 3T3-L1 adipocytes through downregulation of PPAR γ . *Phytother Res.* 29:281-287, 2015. <https://doi.org/10.1002/ptr.5252>
31. Tsai SC, Huang YW, Wu CC, Wang JJ, Chen YT, Singhanian RR, Chen CW, Dong CD, Hsieh SL. Anti-obesity effects of *Nostoc commune* ethanol extract In Vitro and In Vivo. *Nutrients.* 14:968, 2022. <https://doi.org/10.3390/nu14050968>