pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 6, pp. 528~536 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.6.528

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

비스페놀 A (Bisphenol-A)로 유도된 지방세포 분화에 미치는 갓 추출물의 항오비소겐 효과

이세정[1] · 나윤주[2] · 최선일[1] · 한웅호[1] · 문효[1] · 이윤환[3] · 김현덕[3] · 김윤정[3] · 이옥환[1,2]*

[1]강원대학교 식품환경융합학과
[2]강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학전공
[3](주)찬누리라이프

Anti-obesogenic Effect of *Brassica juncea* Extract on Bisphenol-A Induced Adipogenesis of 3T3-L1 Cells

Se-jeong Lee[1], Uoon-Joo Na[2], Sun-Il Choi[1], Xionggao Han[1], Xiao Men[1], Youn Hwan Lee[3], Hyun Duk Kim[3], Yoon Jung Kim[3], Ok-Hwan Lee[1,2]*

[1]*Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[2]*Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[3]*Channnri Life Co. Ltd., Chuncheon, Korea*

(Received October 21, 2021/Revised November 12, 2021/Accepted November 12, 2021)

ABSTRACT - The purpose of the study was to investigate the content of sinigrin, an index component, in *Brassica juncea* extract and to evaluate the differentiation of lipocytes, inhibition of production of reactive oxygen species (ROS) and reduction of protein production by lipogenic factors (PPARγ, C/EBPα, aP2) in the processing of *Brassica juncea* extract and sinigrin in 3T3-L1 preadipocytes which induces Bisphenol A (BPA), an endocrine disrupting environmental hormone. From the investigation, the content of sinigrin in *Brassica juncea* extract, measured by HPLC, is found to be 21.27±0.2 mg/g. The XTT assay result on BPA-derived 3T3-L1 adipocytes shows there is no cytotoxicity found from 180 μM of sinigrin and 300 μg/mL of *Brassica juncea* extract. Moreover, both intracellular lipid accumulation and ROS production during differentiation of lipocyte are significantly reduced in cells processed with *Brassica juncea* extract and sinigrin. Lastly, it was also found that the production of transcription factors of lipocyte differentiation, PPARγ, C/EBPα and aP2, were found to be suppressed by the application of *Brassica juncea* extract and sinigrin. Such results reveals that *Brassica juncea* is effective in not only suppressing lipid accumulation in the environmental hormone bisphenol A-derived lipocyte, but also in reducing the ROS. The sinigrin-containing *Brassica juncea* is highly expected to be used in natural functional supplements that prevents the lipid metabolism disorders caused by BPA. There are necessities for additional clinical research and follow-up studies on the in vivo model to verify the relevant mechanisms.

Key words: *Brassica juncea*, Sinigrin, Bisphenol A (BPA), Lipid accumulation, Adipogenesis

비만(obesity)은 에너지 섭취 및 소비의 불균형으로 인한 체지방의 과잉 축적으로 발생되며, 체내 지방세포에서 호르몬(adipokine)이 분비되어 지방세포의 비대(hypertrophy)와 과잉 형성(hyperplasia)이 일어나 체내에 지방이 축적되면서 야기된다고 알려져 있다[1]. 비만에 의해 발병되는 대사증후군은 일부 암을 비롯해 고혈압, 심혈관 기능 장애, 인슐린 저항성, 제2형 당뇨병에 이르기까지 매우 다양하며, 비만에 따른 2차적인 문제에 집중된 연구가 활발하다[2]. 이러한 비만 연구에서 지방세포는 전구지방세포인 3T3-L1이 분화에 핵심으로 작용하는 전사인자인 PPARγ, C/EBPα, aP2가 발현되어 분화 후기에 다양한 adipogenic 유전자의 발현을 유도한다[3-5]. 따라서 전구지방세포(preadipocyte)가

*Correspondence to: Dr. Ok-Hwan Lee, Professor, Dept. of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: +82-33-250-6454, Fax: +82-33-259-5561
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

Table 1. HPLC conditions of sinigrin analysis for *Brassica juncea*

Parameters	Analytical condition
Column temp.	30°C
Detector	PDA Detector (228 nm)
Column	Shiseido C18 (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm)
Mobile phase (isocratic)	Isocratic HPLC water containing 0.1M ammonium sulfate
Injection vol.	10 μL
Flow rate	1 mL/min
Run time	15 min

증식과 분화를 통해 성숙한 지방세포(adipocyte)로 되는 과정인 adipogenesis의 억제를 연구하는 것은 항비만 연구에 있어 중요한 부분으로 연구되고 있다.

세포내 대사과정이 일어나는 동안 체내에서 생성된 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)는 세포의 분화와 DNA 발현과 같은 다양한 생물학적 과정에 관여하며, 증가된 활성산소종으로 인한 ROS의 불균형은 DNA 변이, 단백질 변성, 지질과산화물 생성 등을 일으켜 노화와 암, 심혈관 질환, 고혈압, 당뇨병 등을 유발시킨다[6]. 따라서 세포의 성장과 생존을 위해 ROS의 항상성을 유지하는 것은 매우 중요하다.

Baillie-Hamilton[7]은 비만 유행과 합성 화학 생산 증가 사이의 상관 관계를 제안했다. 또한 같은 기간 당뇨병의 유행과 함께 합성수지의 생산과 사용이 급격히 증가하였으며, 이러한 상관관계는 특정 환경 물질이 지방 생성 및 체중 증가를 유도한다는 것을 입증하는 실험적 자료에 근거하여 비만의 발병 기전에서 합성 화학물질의 원인으로 환경호르몬이 지목되었고, 이에 따라 대사 기능 장애를 유발하고 지방 생성 및 지질 축적을 촉진하는 화학 물질로 정의되어 비만에 영향을 미치는 비만 유발 환경 호르몬을 의미하는 “obesogen”이라는 새로운 개념이 등장했다[8]. 환경적 비만 유발 물질로 잘 알려진 비스페놀 A (bisphenol-A, BPA)는 전 세계적으로 가장 많이 생산되는 화학물질 중 하나이며, 폴리카보네이트(polycarbonate) 플라스틱을 제조하기 위한 중합 반응 단계에서 사용되는 물질로, 폴리카보네이트는 식품 및 물병의 용기, 젖병, 의료용 튜브, 에폭시 수지, 치과용 충전재 및 가전제품 등의 제조에 사용되어 가열되면 폴리머에서 음식이나 물로 이동할 수 있다[9]. BPA에 일반적으로 노출되는 주요 경로는 오염된 음식과 물을 섭취하거나 피부 노출에서 기인되고, 호르몬 교란물질로 작용하여 아디포넥틴(adiponectin) 및 렙틴(leptin)과 같은 호르몬을 교란시켜 에너지 불균형을 초래하여 지방 생성 및 지질 축적을 촉진한다[10]. BPA의 노출은 배아 및 태아 발달 동안 정상적인 분화 및 성숙 과정에 영향을 주어 평생 동안 비만과 같은 만성 질환에 걸리기 쉽게 한다[11]. 또한, 모든 생애 단계에서 BPA 노출은 체중과 체질량지수(Body Mass Index, BMI)의 증가와 상관관계가 있으며, 태아기, 유아기, 어린 시절은 BPA 효과에 대한 민감도가 크게 증가하는 시기로 알려져 있다[12]. 따라서 BPA로 인해 유발되는 비만을 저감화하려는 연구가 활발하다[13]. 최근 환경적으로도 수많은 논란의 여지가 있는 BPA의 이러한 문제를 시사하여 안전성이 확보된 천연물 소재 연구의 중요성이 대두되었다[14].

갓(leaf mustard, *Brassica juncea*)은 십자화과 채소 중 하나이며, 한국과 일본 등에서 널리 재배되고, 한국에서는 갓김치의 주재료로써 오래 전부터 많이 사용되어 왔다[15]. 갓은 영양성분으로 각종 유리당, 지방산, 아미노산, 비타민, 무기질 등이 풍부하며 세포기반 항산화 활성이 우수하다고 보고된 바 있다[16]. 또한 갓의 독특한 매운 맛은 ally isothiocyanate와 sinigrin과 같은 glucosinolates에 의해 나타나며, 이러한 glucosinolates 화합물 및 isothiocyanate 화합물은 항암과 같은 다양한 건강 기능적 효과를 가지는 것으로 알려져 있다[17-19]. 이에 따라 많은 연구에서 sinigrin을 갓의 지표성분으로 설정하여 다양한 연구가 수행되었으며, 특히 sinigrin은 항암, 항염, 항균, 항진균, 항산화, 항비만 등에 탁월한 효능이 있는 것으로 보고되었다[20-22]. 최근 천연물을 이용한 항비만 연구로 지방세포의 분화 억제 및 ROS의 저감에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있지만 갓을 이용한 항비만 연구는 초기단계에 불과하며, 환경호르몬에 의해 유도된 지방세포 분화 억제에 대한 항오비소겐 연구는 전무하다[23,24]. 따라서 본 연구는 갓 추출물에 함유된 sinigrin 함량을 분석하였고, BPA에 의해 유도된 지방세포에서의 지방 축적 및 ROS 생성 억제 효과에 대한 주요 전사인자(C/EBPα, PPARγ, aP2)들의 발현정도를 조사하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 갓은 ㈜찬누리라이프(Chuncheon, Korea)로부터 제공받아 사용하였다. 지방세포의 분화 억제 연구에 사용된 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei (Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)로부터 구입하여 사용하였고, fetal bovine serum (FBS), bovine serum (BS), penicillinstreptomycin (P/S), Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM)과 trypsin - ethylenediaminetetraacetic acid (Trypsin-EDTA)는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였으며, BPA (≥99%; CAS No. 80-05-7), dexamethasone (DEX), isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), insulin, N-acetyl-l-cysteine (NAC) 및 갓의 sinigrin 함량 분석 연구에 지표성분으로 사용된 표준물질 sinigrin (≥99.0%)과 이동상으로 사용한 ammonium sulfate는 Sigma (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)

로부터 구입하여 사용하였다. 지방 생성 전사 인자로써 peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ), CCAAT/enhancer-binding protein-α (C/EBP-α), FABP4 Antibody (aP2) 시약은 Cell Signaling (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

갓 추출물의 제조 및 sinigrin 함량 분석

갓 추출물의 제조는 Kwon 등[25]에 의해 보고된 방법을 이용하였으며, 갓 분말 5 g에 200 mL의 60% EtOH을 첨가하여 70°C에서 3시간 동안 환류추출한 후, 추출물을 0.2 μm 여과지(Whatman, Maidstone, England)를 통해 여과하였다. 여과된 추출물을 감압 농축하고, 동결건조하여 분말을 얻은 후 용매 DMSO로 300 μg/mL의 농도로 시료를 제조하여 sinigrin의 함량 분석 및 지방세포의 분화 억제 효능 평가 연구를 수행하였다. Sinigrin 함량 분석을 위해 DMSO 용매로 제조된 300 μg/mL 농도의 시료를 이동상 0.1 M ammonium sulfate을 이용해 희석하여 HPLC 분석에 사용하였다. 갓 추출물의 sinigrin 함량 분석은 Kwon 등[26]의 분석방법을 변형하여 진행하였다. 분석에 사용된 기기는 Waters 2695 Separation Module HPLC system과 Waters 966 Photodiode Array Detector (Waters, Milford, MA, USA)이고, 분석 조건은 Table 1과 같으며 분석에 이용된 column은 Shiseido capcell Pak C_{18} UG120 (Shiseido, 4.6 mm×250 mm, 5.0 μm, Tokyo, Japan)이다. 추출에 사용된 시료는 0.45 μm membrane filter를 이용해 여과하여 10 μL로 HPLC에 주입하였다.

3T3-L1 세포 배양 및 분화

American Type Culture Collection (ATCC, CL-173, Manassas, VA, USA)로부터 3T3-L1 세포를 분양받아 사용하였다. 3T3-L1 전지방세포를 24-well plate에 well 당 1×10^5 cells을 seeding한 후, P/S (1%)와 BS (10%) 및 sodium bicarbonate 3.7 g/L를 함유한 high glucose DMEM (89%)에서 37°C, CO_2 (5%)의 조건으로 배양하고, 100% confluence 상태가 된 후 2일간 더 배양하여 post-confluent 세포로 배양하였으며 BPA를 위한 실험군은 post-confluent 상태가 되기 전 6일 동안 BPA 30 μM를 처리하였다. Post-confluent 상태의 전지방세포(day 0)를 지방세포로 분화를 유도하기 위하여 모든 실험군은 insulin 1.0 μg/mL, IBMX 0.5 mM 및 FBS (10%)를 포함한 BPA 실험군(MI+BPA, MI+BPA+양성대조군, MI+BPA+갓 추출물, MI+BPA+sinigrin)과 DEX 실험군(MI+DEX)으로 나누어 BPA 30 μM, DEX 1 μM 및 시료(양성대조군 5 mM, 갓 추출물 300 μg/mL, sinigrin 180 μM)를 처리하였다. 모든 결과는 MDI (MI+1 μM DEX) 처리군에 대한 평균 백분율로 표시하였다. 2일 후 DEX를 제외한 insulin 및 FBS 새로운 배지로 교체하고 분화 10일이 경과할 때까지 2일마다 동일한 배지로 교체하여 실험에 사용하였다. 갓 추출물 및 sinigrin 처리 농도는 Kwon 등[25]의 연구에 따라 항비만 활성을 갖는 적정 유효 농도로 설정하였으며, 양성 대조군(positive control)은 항산화제인 5mM N-acetyl-L-cysteine (NAC)를 처리하여 비교하였다.

XTT assay를 이용한 세포 독성 평가

갓 추출물의 세포독성 평가는 XTT {2,3 – bis (2 – methoxy – 4 – nitro – 5 – sulfophenyl) - 2H – tetrazolium – 5 - carboxanilide innersalt} assay kit를 사용하여 측정하였다. 3T3-L1 세포는 1×10^6 cells을 96-well plate에 seeding한 후, P/S (1%)와 BS (10%)를 함유한 DMEM (89%)에서 100% confluence 상태로 될 때까지 배양하였다. 분화 10 일차가 되었을 때 XTT reagent 1 mL와 PMS reagent (N-Methylphenazinium methyl sulfate) 20 μL를 혼합하여 working solution을 제조한 후, 각각의 well에 제조한 solution을 96-well medium 부피 중 20% 만큼의 양을 첨가하여 가볍게 흔들어 혼합하였다. 4시간 동안 37°C인 CO_2 incubator에서 배양 후, microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 를 통해 450 nm의 흡광도 값에서 690 nm의 값을 뺀 결과로 세포독성을 계산하였다.

Oil Red O staining을 이용한 지방축적량 관찰

3T3-L1 세포의 분화 과정에 따른 세포 내 지방축적량을 측정하고자 24-well plate에 각각의 시료를 처리하여 10일간 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거하고, 500 μL의 10% formalin 용액을 첨가하여 실온에서 5분간 방치한 뒤 제거하였다. 그 후 같은 양의 formalin 용액으로 분화된 3T3-L1 세포를 실온에서 1시간 이상 방치한 뒤, formalin 용액을 제거한 후 500 μL의 60% isopropyl alcohol 용액으로 세척하여 세포를 24시간 동안 완전히 건조하였다. 이후 건조된 세포들은 미리 제조한 Oil red O working solution (Oil red O:DDW=6:4)으로 세포 내에 축적된 지방성분을 충분히 염색하고, 증류수를 이용하여 세포를 3-4회 세척한 뒤 완전히 건조하였다. 세포 내 축적된 지방 성분과 결합된 Oil red O는 100% isopropanol을 이용하여 모두 용출시킨 뒤, microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NBT assay를 이용한 ROS 함량 측정

전구지방세포의 분화 과정에 따른 지방세포 내 ROS의 생성량을 측정하기 위하여 24-well plate에서 배양 및 분화된 3T3-L1 세포 배양액을 제거한 뒤 멸균된 PBS (pH 7.4)로 이용하여 2회 세척한 뒤, 0.2 mL의 0.2% NBT용액을 첨가하여 37°C의 CO_2 incubator 안에서 90분간 반응시킨 후 DMSO와 1 N KOH를 7:3 혼합한 용액을 이용하여

dark blue formazan을 모두 용출시킨 후, microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis

3T3-L1 세포를 PRO-PREP protein extraction solution를 이용하여 균질화한 뒤 12,000 xg, 4°C에서 30분간 원심분리하고 상등액을 얻어 BCA protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량한 후 실험에 사용하였다. 단백질을 sample buffer (5×)와 혼합한 후 95°C에서 5분간 열을 가하고, size 별로 분리하기 위해 10% SDS-PAGE를 이용하여 90분 동안 100 V로 처리하였다. semi-dry transfer system을 이용하여 120 V로 60분 동안 PVDF membrane (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)에 이동시키고, 5% skim milk와 BSA를 포함한 blocking buffer (0.5% skim milk, 0.5% BSA, TBST)를 1시간 동안 처리한 뒤, 4°C에서 primary antibody를 overnight 반응시키고, TBST로 10분 간격으로 3-4번 washing, secondary antibody를 실온에서 2시간동안 반응시킨 후 TBST로 10분 간격으로 3-4번 washing 하였다. 이후 ECL reagent를 이용해 발색하고 Chemi Doc imaging system (Bio-Rad) 및 X-ray 필름에 감광시켰다. Image J를 이용하여 밴드의 강도를 정량화한 뒤 수치화하였다.

통계처리

통계처리 분석은 SAS version 9.4 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하였고, 유의성 분석을 위하여 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test), one-way ANOVA 검정을 이용하였으며, 유의성은 $P<0.05$ 수준에서 검정하였다.

Results and Discussion

갓의 sinigrin 함량

Sinigrin은 myrosicase에 의해 가수분해되어 자극적인 방향과 강하게 쏘는 맛을 가지는 ally isothiocyanate 및 glucose, potassium hydrogen sulfate를 생성하는데, 특히 이들 중 isothiocyanate는 수종의 세균과 곰팡이들에 대해 항균활성 및 항산화효과 등 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 보고되어 왔다[27,28]. 따라서 본 연구는 동결건조 갓 추출물의 sinigrin 함량을 분석하였다. 정량분석을 위한 표준시약으로 sinigrin을 이용하였으며, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 제조하여 표준곡선을 작성하였다. HPLC chromatogram peak area에 따라 작성한 표준곡선에서 y=10566x+1991.7 (R^2 =1.000)를 나타내었다. sinigrin 표준물질은 7.4분에 검출되었고, 갓 추출물 중 sinigrin 성분의 확인을 위해 PDA detector를 이용하여 UV spectrum을 비교하였다(Fig. 1). Sinigrin 표준물질과 갓 추출물 모두 226.7 nm의 최대 흡수 파장을 보이며, 이에 따라 HPLC의 peak area를 기준으로 갓 추출물 내 sinigrin 함량을 계산한 결과 21.27±0.2 mg/g이 함유되어 있었다. Kwon 등[25]의 연구에 따르면 최적 추출 조건에 대한 갓 추출물의 sinigrin 함량은 25.44±0.07 mg/g으로 비슷한 수준의 값을 보였다.

XTT assay를 이용한 갓 추출물과 sinigrin의 세포독성 평가

3T3-L1 지방세포에서 갓 추출물의 세포독성을 평가하기 위하여 XTT assay 방법을 이용하여 측정하였다(Fig. 2). 3T3-L1에 MI를 기반으로 하여 BPA를 20 μM, BPA 20 μM와 sinigrin 180 μM, BPA 20 μM와 갓 추출물 300 μg/mL를 처리한 세포 모두 세포 내 독성을 보이지 않았고, 또

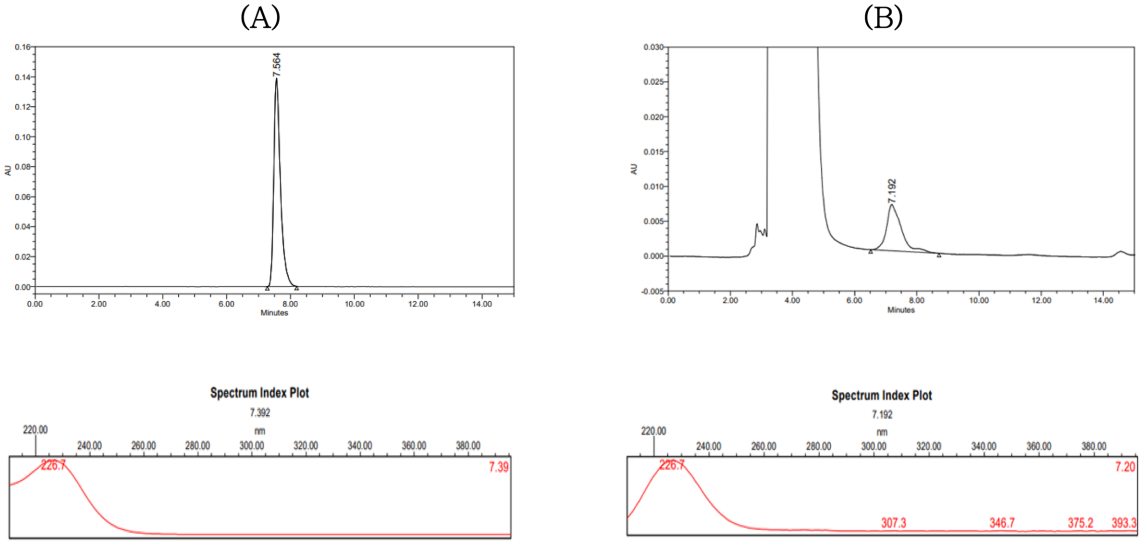

Fig. 1. HPLC chromatograms and PDA spectrums of (A) sinigrin and (B) *Brassica juncea* extract (B).

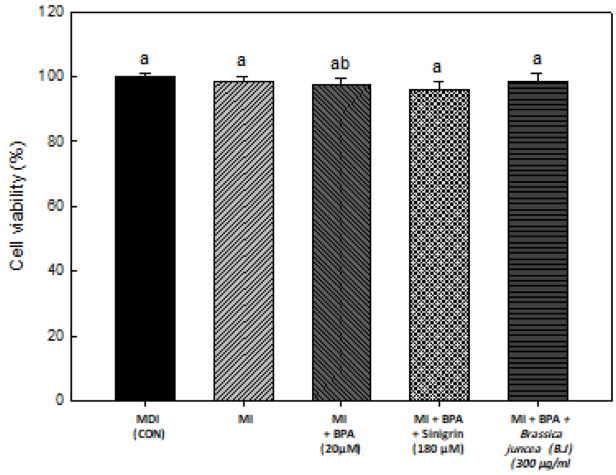

Fig. 2. Effect of BJ extract and sinigrin on cell viability on 3T3-L1 preadipocytes. Each value is expressed the mean±SD of the results from five different plates (n=5). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA (P<0.05).

한 대조군과 갓 추출물, sinigrin 처리군에서의 세포 생존율은 유의적인 차이가 없는 것이 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 지방세포 분화 억제와 ROS 생성 저감 효능 등을 평가하기 위하여 BPA 20 μM와 sinigrin 180 μM, 갓 추출물 300 μg/mL의 농도로 3T3-L1 세포에 처리하였다.

Oil Red O staining을 이용한 지방 축적 억제 효과 관찰

지방 세포 분화 억제 효능을 확인하기 위하여 붉은색으로 중성지방만을 염색하는 Oil Red O 방법을 통해 3T3-L1 세포 내 중성지방이 생성된 양을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. 대조군(MDI)과 음성대조군(MI)을 비교하였을 때 DEX를 처리하지 않은 음성대조군(MI)은 대조군(MDI)에 비해 지방세포의 분화가 낮은 수준이며, DEX는 지방세포 분화에 중요한 역할을 하는 것을 보였다. DEX 대신 MI에 BPA를 처리한 군에서는 음성대조군(MI)에 비해 지방세포의 분화가 49.74% 증가된 78.41±1.55%의 지방세포 분화능을 보이며, BPA는 지방세포의 분화에 큰 영향을 미치는 인자임을 알 수 있다. MI+BPA군에 sinigrin과 갓 추출물을 처리한 군에서는 각각 66.98±2.05%, 72.29±2.85%로 세포 내 지질 축적량이 감소한 것을 확인하였으며, MI+BPA만 처리한 군에 비해 11.43%, 6.12%의 지방세포 분화 억제 효능을 보였다. 각 실험군은 모두 지방세포 분화 과정에서의 지질축적이 MI+BPA군보다 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 갓 추출물을 지방세포 분화 유도 물질 중 DEX를 세포에 처리한 후 지방세포의 분화억제를 측정한 Kwon 등[25]의 연구에서 갓 추출물이 전구지방세포의 분화를 억제한 결과와 일치한다.

BPA로 유도된 3T3-L1 분화과정 중 갓 추출물의 ROS 생성 억제 효과

NBT assay는 지방세포 내 축적된 ROS와 NBT 용액이 반응하여 dark blue formazan을 생성하게 되어, 이를 용출해 세포 내 생성된 ROS의 양을 알 수 있다. BPA로 유도된 3T3-L1 분화과정 중 갓 추출물과 sinigrin의 ROS 생성

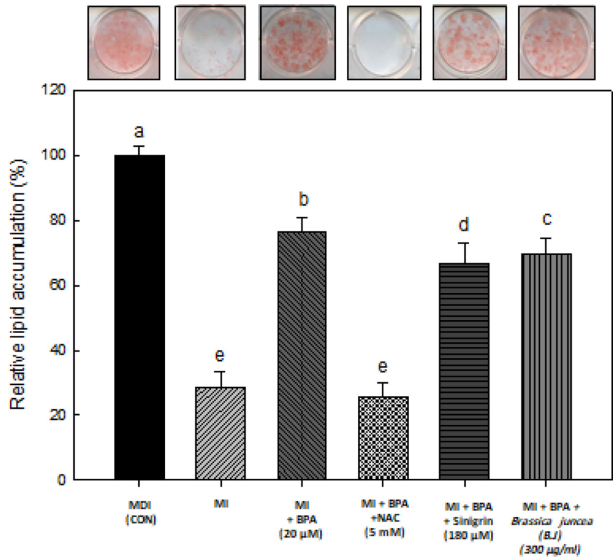

Fig. 3. Effect of BJ extract and sinigrin on lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. Oil red O staining at day 10. Lipid accumulation determined by optical density at 490 nm. The result is presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Bars with different letters indicate significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

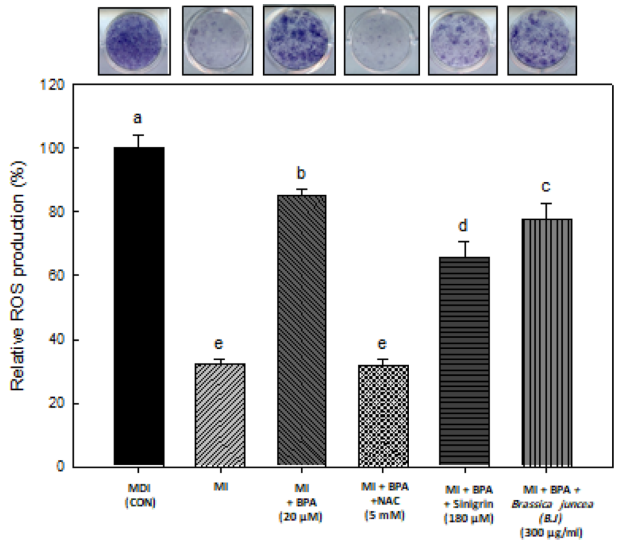

Fig. 4. Effect of BJ extract and sinigrin on lipid accumulation during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. Dark-blue formazan was dissolved and the optical density was determined at 570 nm. The result is presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Bars with different letters indicate significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

억제 효과를 NBT assay를 이용하여 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군(MDI)에 비하여 BPA로 유도된 3T3-L1 전지방세포에 갓 추출물과 sinigrin을 처리한 군에서 지방세포 분화 억제 효능과 마찬가지로 ROS의 생성량도 유의적으로 감소하여, ROS 저감 효과도 우수한 것으로 나타났다. Kwon 등[16]의 연구에서 갓에는 비타민 B_1, B_2, B_6, C, E와 같은 항산화 효능이 있는 비타민이 다량 함유되어 있으며, Kwon 등[26]의 연구에서 갓은 페놀과 플라보노이드 등과 같이 ROS를 소거하며 생리활성에 기여할 수 있는 bioactive compound의 함량이 높아 지방세포 분화 시 생성되는 ROS를 유의적으로 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

갓 추출물이 BPA로 유도된 지방 생성 전사인자의 발현에 미치는 영향

갓 추출물이 BPA로 유도된 3T3-L1 전구지방세포에서 지방 생성 전사 인자(PPARγ C/EBPα, aP2) 단백질의 발현을 감소시키는지 여부를 확인하기 위해 Western blot 분석을 수행했다. 지방세포의 분화과정은 인슐린 등과 같은 호

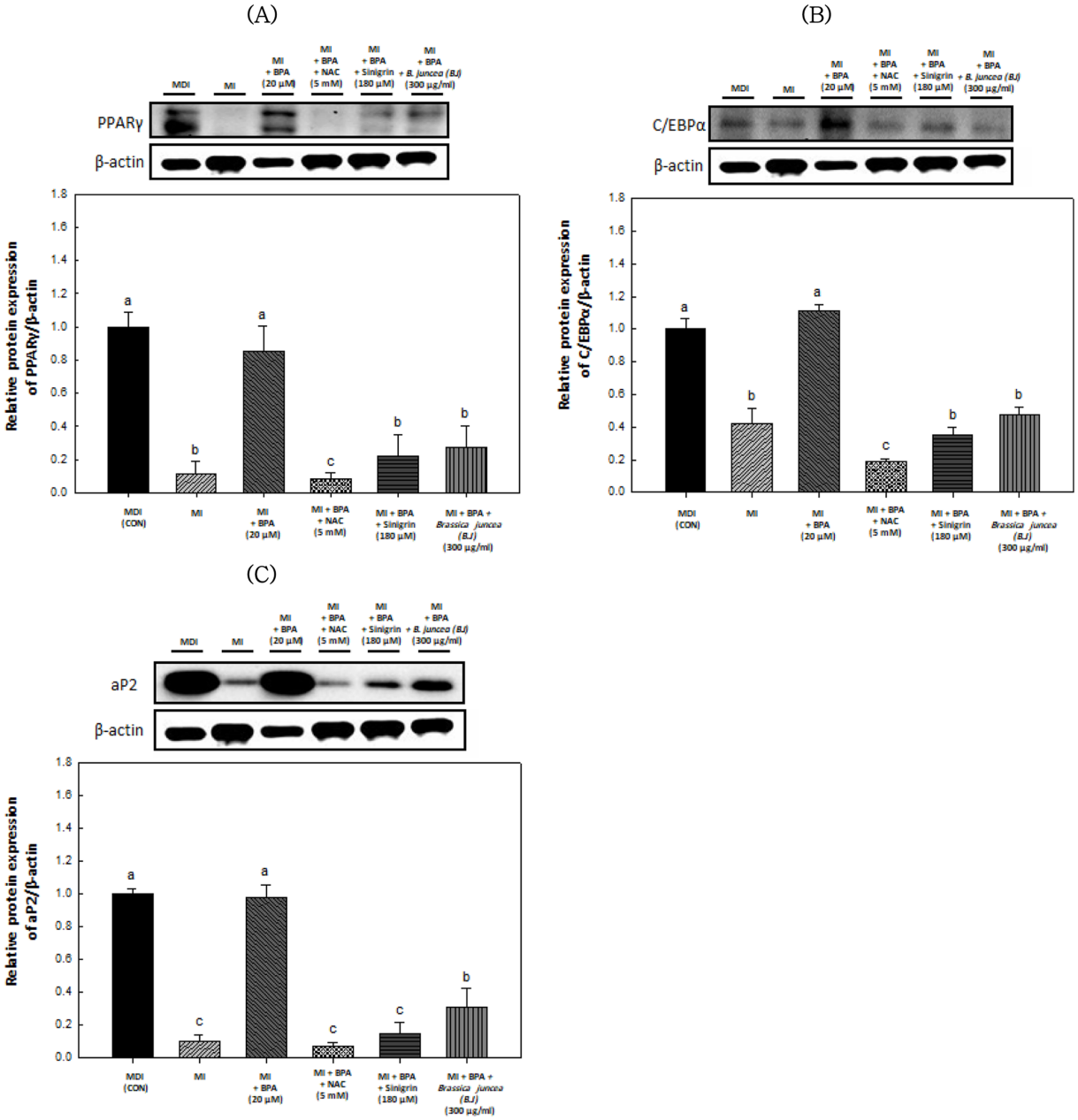

Fig. 5. Effect of BJ extract and sinigrin on adipogenesis related protein expressions. (A) PPAR-γ protein expressions, (B) C/EBP-α protein expressions, (C) aP2 protein expressions. All results are presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Bars with different letters indicate significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

르몬의 자극뿐만 아니라, 지방세포 분화 조절에 관여하는 지방생성 전사인자(adipogenic transcription factor)의 활성화가 필요하다[29-31]. 지방세포 분화에 필요한 전사인자는 peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPARγ)와 CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPα) 등이 알려져 있다[32]. Adipogenesis 전체 과정을 총괄적으로 조절하는 전사인자인 PPARγ는 nuclear receptor superfamily에 속하며 지방세포에 특이적으로 발현하는 adipoocyte protein 2 (aP2) 등과 같은 분화 관련 유전자의 발현을 조절하고, 지방세포 분화 조절에 관여하는 다른 주요 전사인자인 C/EBPα를 활성화시킨다. C/EBPα는 PPARγ의 지속적인 유지와 활성화를 통해 성숙한 지방세포를 생성하기 위한 인슐린 감수성에 중요한 역할을 한다[33]. Wang 등[34]의 연구에 따르면 지방세포를 갖는 동물모델의 C/EBPα를 제거하였을 때 지방이 축적되지 않는 것으로 보고되었다. 따라서 비만을 억제하거나 비만과 관련된 대사성 질환의 예방을 위해서는 지방세포 분화에 관여하는 전사인자들의 활성을 억제하여, 지방세포 분화 초기의 세포 증식 억제 및 후기의 분화와 지방 축적을 조절하는 전사인자 발현을 조절하는 것이 중요한 부분으로 인식된다. 따라서 본 연구에서 갓 추출물이 지방생성 전사인자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 보기 위해 단백질 수준에서 확인하였다. BPA로 분화를 유도한 preadipocyte에서 지방생성 전사 인자(PPARγ, C/EBPα, aP2)의 발현을 확인한 결과는 각각 Fig. 5a, Fig. 5b, Fig. 5c에 나타내었다. 분화 유도군 중 시료를 처리하지 않은 군에서는 PPARγ 및 C/EBPα, aP2의 발현이 현저하게 증가하는 것을 보였으며, sinigrin 180 μM 및 갓 추출물 300 μg/mL 농도로 처리한 실험군에서는 지방생성 전사 인자 세 가지 모두 발현이 증가되었으며, 양성대조군인 NAC (N-acetyl-L-cysteine)와 마찬가지로 sinigrin, 갓 추출물에서도 지방 생성 전사 인자의 발현이 유의하게 억제되는 것을 관찰하였다.

국문요약

본 연구는 십자화과 채소인 갓(*Brassica juncea*) 추출물을 이용하여 지표성분인 sinigrin의 함량을 분석하고, 내분비계 교란물질 환경호르몬인 비스페놀 A (BPA)로 분화를 유도한 3T3-L1 전구지방세포에서 갓 추출물과 sinigrin 처리에 대한 지방세포 분화 및 활성산소종(ROS) 생성 억제, 지방 생성 전사인자(PPARγ, C/EBPα, aP2)의 단백질 발현 감소 효능을 평가하였다. 연구 결과에 따르면 HPLC를 이용하여 측정한 갓 추출물 중 sinigrin의 함량은 21.27±0.2 mg/g 인 것으로 나타났다. BPA로 유도된 3T3-L1 전구지방세포에서 XTT assay 결과 sinigrin 180 μM 및 갓 추출물 300 μg/mL 농도에서 세포 독성을 보이지 않았으며, 지방세포 분화과정 중 세포 내 지방 축적량과 ROS 생성량을 비교하였을 때 갓과 sinigrin을 처리한 지방세포의 경우 지방축적량 및 ROS 생성량 모두 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, 갓 추출물 및 sinigrin을 처리하였을 때 지방세포 분화를 조절하는 전사인자 PPARγ, C/EBPα 및 aP2의 발현이 억제됨을 확인하였다. 이 결과를 통해 갓은 환경호르몬 비스페놀 A로 유도된 지방세포 내 지방 축적 억제와 더불어 ROS 저감에 효과적으로 작용함을 확인하였다. 향후 sinigrin을 함유한 갓은 BPA로 인한 지질 대사 장애를 예방하는 천연물 유래 기능성 식품 소재로 활용할 가능성이 높은 것으로 기대되며, 추가로 임상 연구 및 작용기전 입증을 위한 in vivo 모델에서의 후속 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Acknowledgments

본 논문은 2020년도 중소벤처기업부의 중소기업기술개발사업 지원(S2958838)과 한국연구재단의 지원(NRF-2017R1D1A3B06028469)을 받아 수행된 연구로 이에 감사드립니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Se-Jeong Lee https://orcid.org/0000-0001-8738-7559
Uoon-Joo Na https://orcid.org/0000-0002-7652-2193
Sun-Il Choi https://orcid.org/0000-0001-7400-6286
Xionggao Han https://orcid.org/0000-0002-5057-7401
Xiao Men https://orcid.org/0000-0003-1101-5796
Youn Hwan Lee https://orcid.org/0000-0001-8421-4273
Hyun Duk Kim https://orcid.org/0000-0001-8985-0607
Yoon Jung Kim https://orcid.org/0000-0002-3851-2867
Ok-Hwan Lee https://orcid.org/0000-0001-6855-3136

References

1. Spiegelman, B.M., Flier, J.S., Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, **104**, 531-543 (2001).
2. Kim, M.K., Park, J.H., Metabolic syndrome. *J. Korean Med. Assoc*., **55**, 1005-1013 (2012).
3. Liu, F., Kim, J.K., Li, Y., Liu, X.Q., Li, J., Chen, X., An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake–stimulatory and adipocyte differentiation–inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *J. Nutr.*, **131**, 2242-2247 (2001).
4. Rosen, E.D., Hsu, C.H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J., Spiegelman, B.M., C/EBPα induces adipogenesis through PPARγ: a unified pathway. *Genes*

Dev., **16**, 22-26 (2002).
5. Kim, K.H., Perspective in regulation of adipogenesis by bioactive food components. *Food Sci. Ind.*, **42**, 51-57 (2009).
6. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 44-84 (2007).
7. Baillie-Hamilton, P.F., Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J. Altern. Complement. Med.,* **8**, 185-192 (2002).
8. Nappi, F., Barrea, L., Di Somma, C., Savanelli, M.C., Muscogiuri, G., Orio, F., Savastano, S., Endocrine aspects of environmental "Obesogen" pollutants. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **13**, 765 (2016).
9. Metwally, F.M., Mohamed, M.M., Sharaf, N.E., Ghazy, M.A., El Mishad, A.M., Elfiky, A., The Impact of bisphenol A (BPA) as environmental obesogen on lipids and lipids metabolism. *Int. J. Pharm. Clin. Res.*, **8**, 1323-1330 (2016).
10. De Filippis, E., Li, T., Rosen, E.D., Exposure of adipocytes to bisphenol-A in vitro interferes with insulin action without enhancing adipogenesis. *PLoS One*, **13**, e0201122 (2018).
11. Jirtle, R.L., Skinner, M.K., Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 253-262 (2007).
12. Legeay, S., Faure, S., Is bisphenol A an environmental obesogen?. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **31**, 594-609 (2017).
13. Choi, S.I., Lee, J.S., Lee, S., Sim, W.S., Kim, Y.C., Lee, O.H., Potentilla rugulosa Nakai extract attenuates Bisphenol A-, S- and F-Induced ROS production and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in the absence of dexamethasone. *Antioxidants*, **9**, 113 (2020).
14. Karri, S., Sharma, S., Hatware, K., Patil, K., Natural anti-obesity agents and their therapeutic role in management of obesity: A future trend perspective. *Biomed Pharmacother*, **110**, 224-238 (2019).
15. Park, H.J., Han, Y.S., Effect of mustard leaf on quality and sensory characteristics of Kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.*, **23**, 618-624 (1994).
16. Kwon, H.Y., Choi, S.I., Cho, B.Y., Choi, S.H., Sim, W.S., Han, X., Jang, G.W., Choi, Y.E., Yeo, J.H., Cho, J.H., Lee, O.H., Analysis of nutritional components and cell-based antioxidant activity on *Brassica juncea* cultivated in Jeongseon, South Korea. *Korean J. Food Nutr.*, **32**, 462-472 (2019).
17. Popova, I.E., Morra, M.J., Simultaneous quantification of sinigrin, sinalbin, and anionic glucosinolate hydrolysis products in *Brassica juncea* and sinapis alba seed extracts using ion chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 10687-10693 (2014).
18. Talalay, P., Fahey, J.W., Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J. Nutr.*, **131**, 3027S-3033S (2001).
19. Blažević, I., Radonić, A., Mastelić, J., Marina, Z., Skočibušić, M., Maravić, A., Glucosinolates, glycosidically bound volatiles and antimicrobial activity of *Aurinia sinuata* (Brassicaceae). *Food Chem.*, **121**, 1020-1028 (2010).
20. Oh, S.K., Kim, K.W., Bea, S.O., Choi, M.R., Sinigrin content of different parts of Dolsan leaf mustard. *Korean J. Food Preserv.*, **22**, 553-558 (2015).
21. Wang, T., Liang, H., Yuan, Q., Optimization of ultrasonic-stimulated solvent extraction of sinigrin from Indian mustard seed (*Brassica Juncea L.*) using response surface methodology. *Phytochem Anal*, **22**, 205-213 (2011).
22. Lee, H.W., Rhee, D.K., Kim, B.O., Pyo, S., Inhibitory effect of sinigrin on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells: Involvement of AMPK and MAPK pathways. *Biomed. Pharmacother.*, **102**, 670-680 (2018).
23. Lee, Y.J., Yoon, B.R., Choi, H.S., Lee, B.Y., Lee, O.H., Effect of *Sargassum micracanthum* extract on lipid accumulation and reactive oxygen species (ROS) production during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J. Food Preserv.*, **19**, 455-461 (2012).
24. Oh, J.W., Lee, J.H., Lee, O.H., Kim, K.H., Kim, H.R., Lee, H.K., Effect of hot water and ethanol extracts from *Nelumbo nucifera* Gaertner flower on lipid accumulation and reactive oxygen species (ROS) production in adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Korean J. Food Preserv.*, **22**, 744-750 (2015).
25. Kwon, H.Y., Choi, S.I., Han, X., Men, X., Jang, G.W., Choi, Y.E., Lee, O.H., Antiobesity effect of *Brassica juncea* cultivated in Jeongseon with optimized sinigrin content using 3T3-L1 adipocytes. *J. Food Biochem.*, **45**, e13650 (2021).
26. Kwon, H.Y., Choi, S.I., Park, H.I., Choi, S.H., Sim, W.S., Yeo, J.H., Cho, J.H., Lee, O.H., Comparative analysis of the nutritional components and antioxidant activities of different *Brassica juncea* cultivars. *Foods*, **9**, 840 (2020).
27. Seo, K.I., Park, S.K., Park, J.R., Kim, H.C., Choi, J.S., Shim, K.H., Changes in antimicrobial activity of hydrolyzate from mustard seed (*Brassica juncea*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **25**, 129-134 (1996).
28. Choi, M.R., Yoo, E.J., Song, S.H., Kang, D.S., Park, J.C., Lim, H.S., Comparison of physiological activity in different parts of Dolsan leaf mustard. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **30**, 721-725 (2001).
29. Blumberg, J.M., Tzameli, I., Astapova, I., Lam, F.S., Flier, J.S., Hollenberg, A.N., Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.*, **281**, 11205-11213 (2006).
30. Galic, S., Oakhill, J.S., Steinberg, G.R., Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **316**, 129-139 (2010).
31. Vázquez-Vela, M.E.F., Torres, N., Tovar, A.R., White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch. Med. Res.*, **39**, 715-728 (2008).
32. Wu, Z., Puigserver, P., Spiegelman, B.M., Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 689-694 (1999).
33. Fox, K.E., Fankell, D.M., Erickson, P.F., Majka, S.M., Crossno, J.T., Klemm, D.J., Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) α, C/EBP β, or PPARγ2.

Journal of Biological Chemistry, **281**, 40341-40353 (2006).
34. Wang, N.D., Finegold, M.J., Bradley, A., Ou, C.N., Abdelsayed, S.V., Wilde, M.D., Taylor, L.R., Wilson, D.R., Darlington, G.J., Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science*, **269**, 1108-1112 (1995).