



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](#)

2024년 2월
석사학위 논문

토란과 와사비 주정 추출물이
C2C12 근육세포와 3T3-L1 지방세포
분화에 미치는 영향

조선대학교 대학원

식품영양학과

이 수 민

토란과 와사비 주정 추출물이
C2C12 근육세포와 3T3-L1
지방세포 분화에 미치는 영향

The Effects of Ethanol Extracts from *Colocasia
esculenta* and *Eutrema japonicum* on the
Differentiation of C2C12 Myotubes and 3T3-L1
Adipocytes

2024년 2월 23일

조선대학교 대학원

식품영양학과

이 수 민

토란과 와사비 주정 추출물이
C2C12 근육세포와 3T3-L1
지방세포 분화에 미치는 영향

지도교수 최 지 영

이 논문을 이학석사학위신청 논문으로 제출함

2023년 10월

조선대학교 대학원

식품영양학과

이 수 민

이수민의 석사학위논문을 인준함

위원장 이 주 민 (인)

위 원 판 정 훈 (인)

위 원 최 지 영 (인)

2023년 12월

조선대학교 대학원

목 차

LIST OF TABLES	IV
LIST OF FIGURES	V
ABSTRACT	VIII
제1장 서론	1
제1절 연구배경	1
1. 토란	1
2. 와사비	1
3. 근감소증	2
2. 비만	3
제2절 연구목적	5
제2장 실험 재료 및 방법	6
제1절 실험 재료	6
1. 실험 재료	6
2. 추출물 시료 제조	7
제2절 세포배양	9
1. C2C12 근육세포	9
2. 3T3-L1 지방세포	11
3. 세포 생존 및 독성 검사	13
제3절 형태학적 분석	14

1. Measurement of myotube diameter	14
2. Oil Red O staining	15
제4절 분자 생물학적 분석	16
1. Real-Time qPCR	16
2. Western blot	19
제5절 통계 분석	22
1. 통계 분석	22
제3장 실험 결과	23
제1절 C2C12 근육세포에 토란, 와사비 추출물이 미치는 영향	23
1. C2C12 근육세포에서 토란, 와사비 추출물의 세포 독성 평가	23
2. C2C12 근육세포에서 토란, 와사비 추출물이 근육분화에 미치는 영향	25
3. 토란, 와사비 추출물 처리 시 C2C12 근육세포에서 mRNA 발현에 미치는 영향	27
4. 토란, 와사비 추출물 처리 시 C2C12 근육세포에서 단백질 발현에 미치는 영향	33
제2절 3T3-L1 지방세포에서 토란, 와사비 추출물이 미치는 영향	43
1. 3T3-L1 지방세포에서 토란, 와사비 추출물의 세포독성 평가	43
2. 토란, 와사비 추출물 처리 시 3T3-L1 지방세포에서	

지방생성 억제에 미치는 영향.....	45
3. 토란, 와사비 추출물 처리 시 3T3-L1 지방세포에서 mRNA 발현에 미치는 영향.....	47
4. 토란, 와사비 추출물 처리 시 3T3-L1 지방세포에서 단백질 발현에 미치는 영향.....	56
제4장 고찰 및 결론	60
제5장 참고문헌	65

LIST OF TABLES

Table 1. List of ethanol extracted powder from CRE, CLE, ELE.....	8
Table 2. Sequences of primers used in real-time qPCR for C2C12 cells.....	17
Table 3. Sequences of primers used in real-time qPCR for 3T3-L1 cells.....	18
Table 4. Primary-antibodies used in western blotting for C2C12 cells.....	20
Table 5. Primary-antibodies used in western blotting for 3T3-L1 cells.....	21

LIST OF FIGURES

Figure 1. Process of C2C12 myoblasts differentiation.....	10
Figure 2. Process of 3T3-L1 preadipocytes differentiation.....	12
Figure 3. Cell viability of C2C12 cells treated CRE, CLE, ELE.....	24
Figure 4. Effect of CRE, CLE, ELE treatment on the morphology and diameter of C2C12 myotubes.....	26
Figure 5. Effect of CRE on mRNA expression of myogenic regulatory factors in C2C12 cells.....	28
Figure 6. Effect of CRE on mRNA expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells.....	28
Figure 7. Effect of CLE on mRNA expression of myogenic regulatory factors in C2C12 cells.....	30
Figure 8. Effect of CLE on mRNA expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells.....	30
Figure 9. Effect of ELE on mRNA expression of myogenic regulatory factors in C2C12 cells.....	32
Figure 10. Effect of ELE on mRNA expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells.....	32

Figure 11. Effect of CRE on protein expression of myogenic regulatory factors in C2C12 cells.....	34
Figure 12. Effect of CRE on protein expression of protein synthesis regulatory factors in C2C12 cells.....	35
Figure 13. Effect of CRE on protein expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells.....	36
Figure 14. Effect of CLE on protein expression of myogenic and protein synthesis regulatory factors in C2C12 cells.....	38
Figure 15. Effect of CLE on protein expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells.....	39
Figure 16. Effect of ELE on protein expression of myogenic and protein synthesis regulatory factors in C2C12 cells.....	41
Figure 17. Effect of ELE on protein expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells.....	42
Figure 18. Cell viability of 3T3-L1 cells treated CRE, CLE, ELE.....	44
Figure 19. Effect of CRE, CLE, ELE on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.....	46
Figure 20. Effect of CRE on mRNA expression of adipogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells.....	48
Figure 21. Effect of CRE on mRNA expression of adiponectin and fat breakdown	

regulatory factors in 3T3-L1 cells.....	48
Figure 22. Effect of CRE on mRNA expression of thermogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells.....	49
Figure 23. Effect of CLE on mRNA expression of adipogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells.....	51
Figure 24. Effect of CLE on mRNA expression of adiponectin and fat breakdown regulatory factors in 3T3-L1 cells.....	51
Figure 25. Effect of CLE on mRNA expression of thermogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells.....	52
Figure 26. Effect of ELE on mRNA expression of adipogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells.....	54
Figure 27. Effect of ELE on mRNA expression of adiponectin and fat breakdown regulatory factors in 3T3-L1 cells.....	54
Figure 28. Effect of ELE on mRNA expression of thermogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells.....	55
Figure 29. Effect of CRE on protein expression in 3T3-L1 cells.....	57
Figure 30. Effect of CLE on protein expression in 3T3-L1 cells.....	58
Figure 31. Effect of ELE on protein expression in 3T3-L1 cells.....	59

ABSTRACT

The Effects of Ethanol Extracts from *Colocasia esculenta* and *Eutrema japonicum* on the Differentiation of C2C12 Myotubes and 3T3-L1 Adipocytes

Lee Sumin

Advisor : Prof. Choi Ji-Young, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

Recently, the increase in chronic diseases has led to a rise in medical expenses and income loss, resulting in a decrease in the quality of life. Among these, muscle atrophy is gaining attention as its prevalence rate is increasing. Muscles constitute a substantial proportion of the body's tissues and play a crucial role in protein storage. An imbalance between protein synthesis and breakdown in muscles, precipitated by pathological or physiological factors, can lead to muscle atrophy. Another chronic disease, obesity has been a significant public health issue worldwide, with a steadily increasing prevalence rate. Obesity is a state defined by the overabundance of fat stored within the body, which is primarily attributed to energy intake exceeding energy expenditure. This condition is a major risk factor for dyslipidemia, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases, which can cause premature death and disability.

Colocasia esculenta(Taro) is a tropical tuber crop cultivated in various regions, India, China, Korea, Japan, and other countries. The roots of *Colocasia esculenta* have small starch granules, making them easy to digest, and they are rich in minerals. Also the leaves of *Colocasia esculenta* are rich in minerals and dietary fiber. *Eutrema japonicum*(Wasabi), originating from Japan, is presently cultivated in diverse locations such as Taiwan, Korea, New Zealand, and other

countries. The roots of *Eutrema japonicum* are particularly abundant in allyl isothiocyanate, which is mainly responsible for its spicy taste and is used as a spice. Additionally, allyl isothiocyanate has been studied for its potential anticancer and antibacterial properties. However, it is noteworthy that the leaves of *Eutrema japonicum* contain approximately half the amount of this compound compared to the roots. *Eutrema japonicum* leaves have been studied for their anti-inflammatory, antioxidant, and anti-obesity effects.

In this study, we investigated the preventive effects of taro and wasabi leaves on dexamethasone (DEX)-induced muscle atrophy in C2C12 cells, as well as their inhibitory effects on adipogenesis in 3T3-L1 cells. In this study, C2C12 cells were subjected to different treatment conditions: a control group (CON) with no treatment, a DEX group treated with 10 μ M of dexamethasone (DEX), and groups treated with DEX along with extracts from *Colocasia esculenta* roots (CRE), *Colocasia esculenta* leaves (CLE), or *Eutrema japonicum* leaves (ELE) at varying concentrations (50, 100, 200 μ g/mL). The results presented that the groups treated with CRE, CLE, and ELE exhibited significantly larger muscle fiber diameters compared with DEX group. Moreover, specific concentrations of CRE, CLE, and ELE downregulated protein degradation factors such as Atrogin-1 and MuRF1 by regulating Foxo3. Additionally, the treatment with these extracts increased the phosphorylation of 4E-BP1 and P70S6K1, promoting protein synthesis.

We treated 3T3-L1 cells into a non-differentiated group (Non-diff) without inducing differentiation, a CON treated with a differentiation cocktail to induce differentiation, and groups treated with the differentiation cocktail and CRE, CLE, or ELE to examine the mechanisms regulating adipocyte differentiation. The results showed that CRE, CLE, and ELE all activated AMPK. As a result, the treatment with CRE, CLE, and ELE upregulated the phosphorylation of HSL, leading to increased lipolysis, and CLE and ELE downregulated FAS, inhibiting adipogenesis.

In conclusion, this study demonstrated that CRE, CLE, and ELE modulate both muscle protein synthesis and breakdown, with potential implications for

enhancing muscle function. Additionally, these extracts activate the AMPK pathway, influencing adipogenesis and promoting lipolysis, thereby suggesting potential anti-obesity effects. This research could serve as a basis data for subsequent preclinical and clinical trials.

제1장 서론

제1절 연구배경

1. 토란

토란(*Colocasia esculenta*)은 동남아시아가 원산지인 열대 덩이줄기 작물로 천남성과(Araceae) 식물군 콜로카시아속(*Colocasia*)에 속하며 전 세계적으로 100속이 있다. 토란은 인도에서 시작되어 중국, 인도네시아를 넘어 한국, 일본, 하와이로 퍼져 재배되고 있다[1]. 한의학 문헌인 동의보감에 따르면 토란은 관절염 및 통풍, 고혈압, 항암 등에 좋은 효능을 가진다고 보고되었다[2]. 토란은 다른 덩이줄기 작물과 유사하게 단백질과 지방이 적고 탄수화물과 섬유질이 많다. 토란 구근은 70~80%가 전분으로 구성되어 있으며, 전분 알갱이가 작아 소화하기 쉽고 티아민, 리보플라빈, 카로틴, 철(Fe), 인(P), 아연(Zn), 비타민 B6, 비타민C 같은 영양소가 풍부하다[3]. 또한, 수분 함량이 높고 100 g 당 112 kcal로 에너지가 낮다. 한편 토란 잎은 구근에 비해 탄수화물 함량이 낮고 수분 함량이 높다. 또한, 단백질 함량 23%로 높고 칼슘(Ca), 인(P), 철(Fe)과 같은 미네랄이 풍부하다. 토란잎의 높은 함량을 차지하는 식이섬유는 장 활동을 활발히 하는데 유리하다[1]. 토란의 영양학적 특성을 활용하여 현재까지 항염증[2], 과킨슨병[4], 항비만[5]과 관련된 연구가 보고되고 있으나 아직 연구가 미비하며, 특히 근육 조절과 관련된 토란의 효능검증 연구는 부족한 상황이다.

2. 와사비

와사비(*Eutrema japonicum*)는 일본이 원산지인 십자화과(Brassicaceae)에 속하는 식물로 주로 식용으로 뿌리가 사용된다. 와사비는 현재 대만, 한국, 이스라엘, 뉴질랜드, 브라질, 태국 등 여러 나라에서 재배되고 있다[6]. 대부분의 와사비는 알릴 이소티오시아네이트(allyl isothiocyanates)와 같은 이소티오시아네이트(isothiocyanates)를 포함하는 매운 성분을 함유하고 있어 주로 향신료나 조미료로 활용된다. 이소티오시아네이트는 기존에 항암, 항균에 관하여 연구되었다[7, 8]. 와사비의 구근에서 이러한

알릴 이소티오시아네이트의 함량이 높으며, 구근은 항암[9], 항염증[10], 혈소판 응집 억제[11]에 관해 연구된 바 있다. 와사비의 잎은 구근에 비해 알릴 이소티오시아네이트의 함량이 절반 정도이며 소비가 적어 버려지는 경우가 많다[12]. 와사비의 잎에 대한 생체 활성 효과에 대해 항염증[13], 항산화 및 항비만[14]을 포함한 연구가 일부 보고되었지만 와사비 구근에 비해 와사비의 잎에 관한 효능검증 연구는 미비하다.

3. 근감소증

근육은 인체에서 탄수화물 대사를 조절하고 에너지 균형을 유지하는 중요한 조직으로 체중의 40%를 차지한다. 근육은 단백질을 저장하는 중요한 역할을 하며 암, 화상, 심부전 등과 같은 이화 작용이 일어나는 기간 동안 다른 기관에서 에너지 생산에 사용될 수 있는 아미노산 공급원 역할을 한다[15]. 단백질 분해와 단백질 합성의 균형이 정상적으로 이루어지지 않는다면 근위축증 또는 근감소증이 유발된다. 이러한 근감소증은 암, 패혈증, 당뇨병 등 수많은 병리 또는 질병이 없더라도 기아나 노화, 장기간 근육 활동이 감소한다면 발생할 수 있다[16]. 근감소증 환자는 근육이 감소함에 따라 근력, 유산소 능력, 에너지 대사 이상이 생기면서 이는 삶의 질을 저하한다[17]. 그러므로 근육을 건강하게 유지하는 것은 대사 장애를 예방하고 건강한 삶을 유지할 수 있으며 필요하면 필수기관에 에너지를 공급하는 데 중요하다. 한편 2017년 WHO(World Health Organization)에서는 근위축 관련 근감소증에 대한 질병 코드를 제정하였고, 이에 따라 여러 임상시험이 이루어지고 있다. 하지만 현재까지 정식 승인된 치료제가 없는 실정이기 때문에 치료제 혹은 예방법이 필요하다.

근감소증은 단백질 분해가 증가하거나 단백질 합성이 억제되어 발생한다. 먼저 근육 단백질 분해에 관여하는 유비퀴틴 프로테아좀 시스템(ubiquitin-proteasome system)은 대부분의 이화 과정에서 근육위축을 유발한다. Ubiquitin-activating enzyme(E1)과 Ubiquitin(Ub)이 결합하여 복합체를 만들고 ubiquitin-conjugating enzyme(E2)과 결합하여 유비퀴틴화 단계에서 Ub-E2 복합체를 형성하고 단백질이 E3로 이동한다. 유비퀴틴화 된 단백질이 생성되어 proteasome에서 분해되어 poly peptide로 분해 혹은 재활용된다. 이 과정에서 특정 기질의 유비퀴틴화를 결합하는

단백질인 ubiquitin-E3 ligase를 암호화하는 주요 유전자가 ubiquitin-E3 ligase muscle ring finger-1(MuRF1)와 F-box only protein 32(Atrogin-1)이다. MuRF1과 Atrogin-1의 활성화는 단백질의 분해를 촉진한다[18-20].

Insulin-like growth factor-1(IGF-1)/phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)/protein kinase B(AKT)/mammalian target of rapamycin(mTOR) pathway는 단백질의 합성을 조절하여 근육을 유지하는 기전 중 하나이다. IGF-1은 근육 성장과 재생에 주된 요소로 IGF-1이 IGF-1 receptor에 결합하여 PI3K를 활성화하고 이는 AKT의 인산화를 활성화한다. 인산화된 AKT는 mTOR을 활성화하여 ribosomal protein s6 kinase b1(P70S6K1)과 eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1(4E-BP1)을 인산화시켜 결과적으로 단백질 합성을 촉진한다[21, 22].

4. 비만

전 세계적으로 비만의 유병률은 지난 50년 동안 꾸준히 증가하여 약 3배 증가했다. 이는 비만이 세계적으로 심각한 공중보건의 문제임을 나타낸다. 비만은 에너지 소비보다 에너지 섭취가 과잉되었을 때 발생하며, 이는 체내 저장 지방량을 증가시킨다[23]. 비만은 서구화된 식습관과 앉아서 생활하는 행동이 증가에 의한 에너지 불균형 혹은 유전적 원인에 의해 유발된다[24]. 비만은 심혈관 질환, 당뇨병, 근골격계 질환, 일부 암을 포함한 비전염성 질환과 밀접하게 관련되어 있으며 이는 사망과 조기 장애의 주요 원인이다[23]. 비만과 관련하여 과거와 현재에도 많은 연구가 되었지만 여전히 세계적으로 중요한 보건 문제로써 지속적인 연구가 필요하다.

지방 조직은 백색 지방 조직(white adipose tissue), 갈색 지방 조직(brown adipose tissue) 두 가지로 분류된다. 백색 지방 조직에는 주로 에너지 생산을 하는 지방산이 지질 방울에서 tricylglycerol(TG) 형태로 저장되어 있으며, 에너지 항상성, 인슐린 신호 전달 및 내분비 작용에 중요한 부위이다. 갈색 지방 조직은 미토콘드리아의 작용을 통해 열을 발생시킨다[25]. 지방생성 혹은 지방분해는 여러 전사인자 혹은 호르몬에 의해 조절된다.

지방생성(adipogenesis)은 지방 전구세포에서 activating protein-1(AP-1) 그룹이 활성화되고, 이후 peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ)의 유도 및 발현으로 이어지며 작용한다. Sterol regulatory element-binding protein 1(SREBP1),

CCAAT/enhancer-binding proteins(C/EBP) 그룹을 포함한 전사인자들이 지방세포의 분화를 촉진하며 위의 주요인자들이 지방생성을 조절한다[25, 26].

지방분해는 단식이나 에너지 수요가 증가하면 저장되어 있는 TG가 대사되며 다른 조직들로 운반되어 사용된다. TG의 대사는 호르몬에 의해 조절되며 지방분해 효소가 활성화되어야 한다. TG을 diglycerol(DG) 및 free fatty acid(FFA)로 가수분해하는데 adipose triglyceride lipase(ATGL)가 이 과정을 촉매하며, hormone-sensitive lipase(HSL)는 분해된 DG을 효율적으로 가수분해시킨다. 생성된 monoglycerol(MG)은 monoglyceride lipase(MGL)에 의해 가수분해되며 지방의 분해가 이루어진다[27-29].

한편 지방은 갈색 지방에서 열을 내어 에너지를 소비하기도 하는데 이는 미토콘드리아 내막의 단백질인 uncoupling protein-1(UCP1)에 의해 이루어진다. UCP1은 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC1 α), PR domain containing 16(PRDM16), PPAR γ , C/EBP β ,와 같은 전사인자와 상호작용하며 thermogenesis를 유도한다[30].

제2절 연구 목적

근감소증은 여러 질병의 합병증으로서 삶의 질 저하 등 심각한 문제를 야기한다. 하지만 예방법이나 치료제가 명확하지 않기 때문에 근감소증을 억제하기 위한 기전 규명이 절실하다. 본 연구에서는 C2C12 근육세포를 dexamethasone(DEX)으로 근육위축을 유도하였다. DEX는 글루코코르티코이드계의 약물로서 글루코코르티코이드는 ubiquitin-proteasome system를 활성화해 근육 단백질 분해를 가속하여 근위축 및 근감소 연구에서 주로 사용된다[31]. C2C12 근육세포를 분화시켜 근육위축을 유발한 세포에 토란 구근 추출물(CRE), 토란잎 추출물(CLE), 와사비잎 추출물(ELE)을 농도별로 처리하여 근육세포분화, 단백질 합성과 단백질 분해에 관련된 메커니즘을 확인하고자 한다.

비만의 유병률은 1975년부터 약 4배 이상 증가하였으며 심각한 사회문제가 되었다[32]. 비만의 연구는 활발히 진행되고 있으나 급속히 증가하는 유병률을 감소시키지 못하고 있다[33]. 비만으로 인해 당뇨병, 담낭 질환, 고혈압, 심혈관 질환, 일부 암과의 관련이 밀접하다는 것이 연구된 바 있기 때문에 항비만의 연구가 계속되어야 한다[34]. 본 연구에서는 3T3-L1 지방 전구세포를 분화시키기 위해 사용하는 DEX, 1-isobutyl-3-methylxanthine(IBMX), insulin을 포함한 호르몬 카테일을 사용하였다. 3T3-L1 지방 전구세포를 분화시켜 CRE, CLE 혹은 ELE를 처리하여 지방세포의 분화와 합성에 관련된 메커니즘을 확인하고자 한다.

따라서 본 연구에서는 토란과 와사비의 근감소 예방 효능 및 지방분화 억제 효능을 세포 수준에서 검증하여 활성화해 동물실험 및 인체 적용 시험의 기초자료를 확보하고자 한다. 또한, 이를 통해 최종적으로는 국내에서 재배하는 천연물인 토란과 와사비 추출물을 활용하여 천연물을 이용한 근감소 및 비만 개선용 기능성 소재를 발굴하여 개별인정형 건강기능식품을 개발하고자 한다.

제2장 실험 재료 및 방법

제1절 실험 재료

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 토란과 와사비는 전라남도 곡성군에서 제공받아 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 C2C12 myoblasts 3T3-L1 preadipocytes는 American type culture collection에서 분양받았다. Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), 10% Fetal Bovine Serum(FBS), 10% Bovine Serum(BCS)는 Gibco(Grand Island, NY, USA)에서, 1% Penicillin/Streptomycin(P/S)은 Solbio(Suwon, Gyeonggi-do, South Korea)에서 구매하였다. DEX, IBMX, insulin은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

2. 추출물 시료 제조

본 연구에 사용된 토란 구근 추출물(*Colocasia esculenta* roots extract, CRE), 토란잎 추출물(*Colocasia esculenta* leaves extract, CLE)과 와사비잎 추출물(*Eutrema japonicum* leaves extract, ELE)은 곡성군농업기술센터에서 제공받았다. 시료의 제조 과정은 다음과 같다. 토란 구근과 토란잎을 세척하여 절단하고 -80℃, 48시간 동결건조하였다. 동결건조된 시료를 분쇄기에서 분말화하여 분말 20 g에 50% 에탄올을 20배수로 첨가한 후 초음파추출기로 추출하였다. 추출액은 3,000 rpm, 10분 원심분리 후 여과하였다. 추출액을 감압 농축 및 동결건조하여 시료를 제조하였다(Table 1). 시료는 dimethyl sulfoxide(DMSO)(Sigma Chemical Co, USA)에 희석하여 본 연구에 사용하였다.

Table 1. List of ethanol extracted powder from CRE, CLE, ELE

Name	Part	Extraction Solvent(g)	Powder Weight(g)	Powder Yield(%)
CRE	Roots	20.00	3.33	16.67
CLE	Leaves	20.00	3.98	19.93
ELE	Leaves	20.00	2.03	10.16

CRE, *Colocasia esculenta* roots extract; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract.

제2절 세포배양

1. C2C12 근육세포

C2C12 근육세포를 10% FBS(Gibco, USA), 1% P/S이 첨가된 DMEM(Gibco, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 분화를 위해 6 well plate에 2×10^5 cells/well의 밀도로 접종(seeding) 하였다. 48시간 배양 후(0일 차) C2C12 세포를 2% HS(Gibco, USA), 1% P/S(Solbio, South Korea)이 첨가된 DMEM(Gibco, USA)으로 교체하여 분화를 유도하였다. 매 2일마다 분화 배지를 교체해 주었고 분화 6일 차, 10 μ M DEX(Sigma, USA)와 함께 추출물을 다양한 농도(0, 50, 100, 200 μ g/mL)로 12시간 동안 처리하였다(Figure 1).

그룹은 아무것도 처리하지 않고 분화시킨 CON 그룹, 분화시킨 세포에 10 μ M DEX을 처리한 DEX 그룹으로 설정하였다. 토란 구근 추출물 처리 그룹은 50 μ g/mL 처리 그룹(CRE50), 100 μ g/mL 처리 그룹(CRE100), 200 μ g/mL 처리 그룹(CRE200)으로 나누었다. 토란잎 추출물 처리 그룹은 50 μ g/mL 처리 그룹(CLE50), 100 μ g/mL 처리 그룹(CLE100), 200 μ g/mL 처리 그룹(CLE200)으로 나누었다. 와사비잎 추출물 처리 그룹은 50 μ g/mL 처리 그룹(ELE50), 100 μ g/mL 처리 그룹(ELE100), 200 μ g/mL 처리 그룹(ELE200)으로 나누었다.

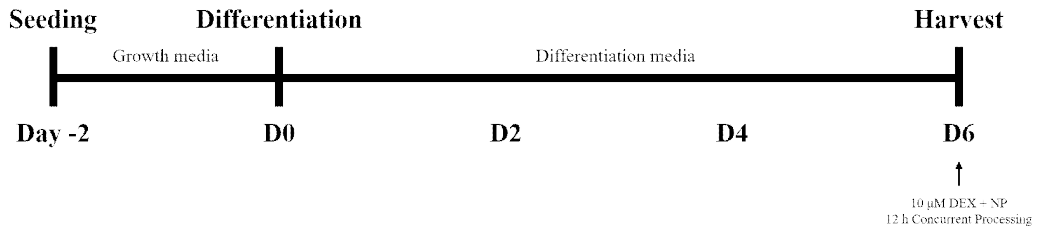


Figure 1. Process of C2C12 myoblasts differentiation

DEX, Dexamethasone; NP, Natural product

2. 3T3-L1 지방세포

3T3-L1 지방세포 10% BCS(Gibco, USA), 1% P/S이 첨가된 DMEM(Gibco, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 분화를 위해 6 well plate에 8×10^4 cells/well 밀도로 접종(seeding) 하였다. 60시간 배양 후(0일 차), 10% FBS(Gibco, USA), 1% P/S(Solbio, South Korea)가 첨가된 DMEM(Gibco, USA)에 1 µM DEX(Sigma, USA), 0.5 µM IBMX(Sigma, USA), 10 µL/mL insulin(Sigma, USA) 분화 카테일을 함유하는 배지로 교체하여 분화를 유도하였다. 48시간 배양 후, 10 µL/mL insulin(Sigma, USA)을 포함하는 배지로 교체하여 8일 동안 분화시켰다. 매 2일 배지를 교체하였다. 지방세포 분화에 대한 추출물의 효과를 조사하기 위해, 0일 차에 추출물을 다양한 농도(0, 50, 100, 200 µg/mL)를 추가하여 배지와 함께 교체하였다(Figure 2).

그룹은 분화시키지 않은 Non-diff. 그룹, 추출물을 처리하지 않고 분화시킨 CON 그룹으로 설정하였다. 토란 구근 추출물 처리 그룹은 50 µg/mL 처리 그룹(CRE50), 100 µg/mL 처리 그룹(CRE100), 200 µg/mL 처리 그룹(CRE200)으로 나누었다. 토란잎 추출물 처리 그룹은 50 µg/mL 처리 그룹(CLE50), 100 µg/mL 처리 그룹(CLE100), 200 µg/mL 처리 그룹(CLE200)으로 나누었다. 와사비잎 추출물 처리 그룹은 50 µg/mL 처리 그룹(ELE50), 100 µg/mL 처리 그룹(ELE100), 200 µg/mL 처리 그룹(ELE200)으로 나누었다.

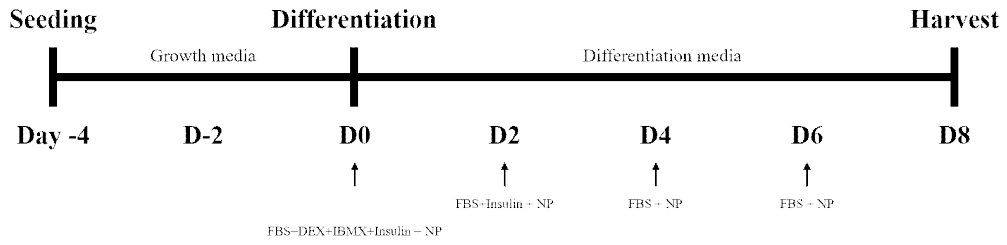


Figure 2. Process of 3T3-L1 preadipocytes differentiation

FBS, Fetal Bovine Serum; DEX, Dexamethasone; IBMX, 1-isobutyl-3-methylxanthine; NP, Natural product

3. 세포 생존 및 독성 검사

추출물의 독성을 검증하기 위해 WST-8 cell viability assay(Biomax, Seoul, South Korea)를 실시하였다. C2C12 근육세포와 3T3-L1 지방세포를 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

배양 24시간 후 추출물을 다양한 농도(0, 25, 50, 100, 200 µg/mL)로 처리한 뒤 각 plate를 24, 48시간 배양하여 WST-8 시약을 각 well에 10 µL 첨가하여 2시간 배양 후 흡광도 450 nm에서 측정하였다.

제3절 형태학적 분석

1. Measurement of myotube diameter

C2C12 근육세포를 6 well plate에 동일한 방법으로 분화시킨 후 각 well에 토란 구근 추출물 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 토란잎 추출물 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 와사비잎 추출물 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 DEX를 12시간 동안 동시처리하였다. 근육세포의 근관은 현미경(Optika, Ponteranica BG, Italy)을 사용하여 200배 확대하여 검사하고 분석하였다. 근관의 직경은 Image J software를 사용하여 하나의 근관을 3회 측정하고 well 당 5개의 사진에서 50개 이상의 근관을 측정하였다[35].

2. Oil Red O staining

토란과 와사비 추출물이 3T3-L1 지방세포의 분화의 미치는 영향을 확인하기 위해 Oil Red O staining을 통해 총 지질량을 조사하였다. 6 well plate에 8×10^4 cells/well 밀도로 접종(seeding)하여 배양 후 분화 8일 후에 수확하였다.

세포를 DPBS(Solbio, South Korea)로 세척 후 10% formalin(Sigma, USA)을 분주하여 실온에서 1시간 동안 고정하였다. formalin(Sigma, USA) 제거 후 60% isopropanol(Sigma, USA)로 세척 후 Oil Red O 시약으로 실온에서 10분 염색 후 증류수로 4번 세척하였다. 3T3-L1 지방세포의 lipid droplets를 현미경으로 촬영하고 증류수 제거 후 건조하였다. 100% isopropanol(Sigma, USA)으로 세포에 염색된 Oil Red O 염료를 용해시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

제4절 분자 생물학적 분석

1. Real-Time qPCR

분화된 세포에 QIAzol Lysis Reagent(QIAZEN, Hilden, Germany)을 첨가하여 제조사의 protocol에 따라 총 RNA를 분리하였다. Real-time qPCR을 위해 TOPscript RT DryMIX(dT18)(Enzynomics, Daejeon, South Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사하였다.

mRNA 발현을 확인하기 위해 TOPreal SYBR Green qPCR PreMIX(Enzynomics, South Korea)와 CFX Connect Real time system을 이용하여 정량분석하였다. mRNA 수준은 *Gapdh*을 사용하여 정규화하고 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method를 사용하여 계산하였다. 유전자의 primer 염기서열은 Table 2, 3에 나타내었다.

Table 2. Sequences of primers used in real-time qPCR for C2C12 cells

Gene name	Sequence(5'-3')
<i>Fbxo32</i>	Forward: ATG CAC ACT GGT GCA GAG AG Reverse: TGT AAG CAC ACA GGC AGG TC
<i>Trim63</i>	Forward: ACC TGC TGG TGG AAA ACA TC Reverse: CTT CGT GTT CCT TGC ACA TC
<i>Mhc</i>	Forward: CAC CTC CAC AGC ACA GAC AG Reverse: ACC TTG GCC ATG TGA TTC TT
<i>Myod</i>	Forward: TGG GAT ATG GAG CTT CTA TCG C Reverse: GGT GAG TCG AAA CAC GGA TCA T
<i>Myog</i>	Forward: CAA CCA GGA GGA GCG AGA CCT CCG Reverse: AGG CGC TGT GGG ATA TGC ATT CAC T
<i>Gapdh</i>	Forward: TCC CAC TCT TCC ACC TTC GA Reverse: CAG GAA ATG AGC TTG ACA AAG TTG

Fbxo32, F-Box Protein 32; *Gapdh*, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *Trim63*, Tripartite motif-containing 63; *Mhc*, Myosin heavy chain; *Myod*, Myoblast determination protein 1; *Myog*, Myogenin.

Table 3. Sequences of primers used in real-time qPCR for 3T3-L1 cells

Gene name	Sequence(5'-3')
<i>Acc</i>	Forward: GGA CAG ACT GAT CGC AGA GAA AG Reverse: TGG AGA GCC CCA CAC ACA
<i>Adipoq</i>	Forward: GGT CTT CTT GGT CCT AAG GGT GAG Reverse: GCG GCT TCT CCA GGC TCT C
<i>Cebpa</i>	Forward: TCG GTG CGT CTA AGAA TGA GG Reverse: TCA AGG CAC ATT TTT GCT CC
<i>Cpt1</i>	Forward: ATC TGG ATG GCT ATG GTC AAG GTC Reverse: GTG CTG TCA TGC GTT GGA ATG C
<i>Fas</i>	Forward: CGC TCC TCG CTT GTC GTC TG Reverse: AGC CTT CCA TCT CCT GTC ATC ATC
<i>Lipe</i>	Forward: GGC TCA CAG TTA CCA TCT CAC C Reverse: GAG TAC CTT GCT GTC CTG TCC
<i>Pgc1a</i>	Forward: AAC CAC ACC CAC AGG ATC AGA Reverse: TCT TCG CTT TAT TGC TCC ATC A
<i>Pnpla2</i>	Forward: TCT ACT AAA GAC CCT GCC TG Reverse: CAG ACA TTG GCC TGG ATG AG
<i>Pparγ</i>	Forward: CCT GAA CAT CGA GTG TCG AAT AT Reverse: GGT CTT CTT CTG AAT CTT GCA GCT
<i>Ucp1</i>	Forward: GAG GTG TGG CAG TTC ATT G Reverse: GGC TTG CAT TCT GAC CTT CA
<i>Ucp3</i>	Forward: TTT CTG CCA CTG GGA GCT T Reverse: GGC CCT CTT CAG TTG CTC AT
<i>Gapdh</i>	Forward: CAC TCT TCC ACC TTC GAT GC Reverse: CAC CAC CCT GTT GCT GTA G

Acc, Acetyl-CoA carboxylase; *Adipoq*, Adiponectin; *Cebpa*, CCAAT enhancer binding protein alpha; *Cpt1*, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Fas*, Fatty acid synthase; *Gapdh*, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Lipe*, Hormone sensitive lipase; *Pgc1a*, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; *Pnpla2*, Patatin like phospholipase domain containing 2; *Pparγ*, Peroxisome proliferator activated receptor gamma; *Ucp1*, Uncoupling protein 1; *Ucp3*, Uncoupling protein 3.

2. Western blot

분화된 세포에 Cell Lysis Buffer(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)에 PhosSTOP EASY pack(Roche, Mannheim, Germany), c0mplete Tablets Mini(Roche, Germany), phenyl methane sulfonyl fluoride(PMSF)(Sigma, USA) 첨가하여 세포를 용해한 후, 4°C, 12,000 rpm, 20분 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 단백질의 농도는 Bradford Protein Assay를 사용하여 정량하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)을 전기영동 하여 단백질을 크기별로 분리하였다. 분리된 단백질을 PVDF membrane에 옮기고 실온에서 1시간 동안 5% skim milk(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)가 함유된 TBS with Tween-20(TBST)(Biosolution, Suwon, South Korea) blocking 하였다. 이후 primary-antibody를 4°C, overnight incubation 한 뒤 TBST로 3번 세척하고 실온에서 secondary-antibody를 1시간 부착하였다. TBST로 4번 세척한 뒤 membrane을 촬영하였다. 촬영된 이미지는 Image J program Software로 측정, 분석하였다. 단백질 발현 수준은 α -tubulin 혹은 β -actin 통해 표준화되었다. 실험에 사용된 antibody는 Table 4, 5에 나타내었다.

Table 4. Primary-antibodies used in western blotting for C2C12 cells

Antibody	Dilution	Source	Cat.
MHC	1:1000	R&D system	MAB4470
Myo D	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-377460
Myogenin	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-12732
p-4E-BP1	1:1000	Cell Signaling Technology	2855
4E-BP1	1:1000	Cell Signaling Technology	9644
p-P70S6K1	1:1000	Cell Signaling Technology	9205
P70S6K1	1:1000	Cell Signaling Technology	2708
p-FoxO3	1:500	Cell Signaling Technology	9465
FoxO3	1:500	Cell Signaling Technology	12829
Atrogin-1	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-166806
MuRF1	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-398608
alpha-tubulin	1:10000	Cell Signaling Technology	3873

MHC, Myosin heavy chain; Myo D, Myoblast determination; p-4E-BP1, Phospho-Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1; 4E-BP1, Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1; p-P70S6K1, Phospho-Ribosomal Protein S6 Kinase B1; P70S6K1, Ribosomal Protein S6 Kinase B; p-FoxO3a, Phospho-Forkhead Box O3; FoxO3a, Forkhead Box O3; Atrogin-1, F-box only protein 32; MuRF1, Muscle RING-finger protein-1.

Table 5. Primary-antibodies used in western blotting for 3T3-L1 cells

Antibody	Dilution	Source	Cat.
p-AMPK	1:1000	Cell Signaling Technology	2535
AMPK	1:1000	Cell Signaling Technology	5832
p-HSL	1:1000	Cell Signaling Technology	4139
HSL	1:1000	Cell Signaling Technology	4107
FAS	1:1000	Cell Signaling Technology	3180
beta-actin	1:1000	Cell Signaling Technology	3700

p-AMPK, Phospho 5' AMP-activated protein kinase; AMPK, 5' AMP-activated protein kinase; p-HSL, Phospho hormone-sensitive lipase; HSL, Hormone-sensitive lipase; FAS, Fatty acid synthase.

제5절 통계 분석

1. 통계 분석

모든 실험 결과의 분석은 GraphPad Prism(Version 9.0, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)를 사용하였으며, Mean \pm S.E.M(standard error of mean)으로 표시하였다. 그룹 간 비교는 Student's *t*-test와 one-way analysis of variance(ANOVA)를 통해 상호간의 평균치를 검증하고, 모든 분석에서 $P < 0.05$ 를 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다.

제3장 실험 결과

제1절 C2C12 근육세포에서 토란, 와사비 추출물이 미치는 영향

1. C2C12 근육세포에서 토란, 와사비 추출물의 세포독성 평가

본 실험에 사용한 토란 구근 추출물(CRE), 토란잎 추출물(CLE), 와사비잎 추출물(ELE)이 C2C12 근육세포에 대한 세포독성을 확인하기 위해 WST-8 assay를 진행하였다. C2C12 근육세포에 CRE, CLE, ELE를 농도별(0, 25, 50, 100, 200 μ g/mL)로 24, 48시간을 처리하였다. CRE, CLE, ELE를 처리하지 않은 대조군(Control)을 기준으로 비교하여 CRE, CLE, ELE 모두 200 μ g/mL 농도까지 C2C12 세포 생존율에 유의적인 감소를 보이지 않았다(Figure 3). 따라서 이후 진행된 실험에서는 독성이 없는 50, 100, 200 μ g/mL 농도를 사용하였다.

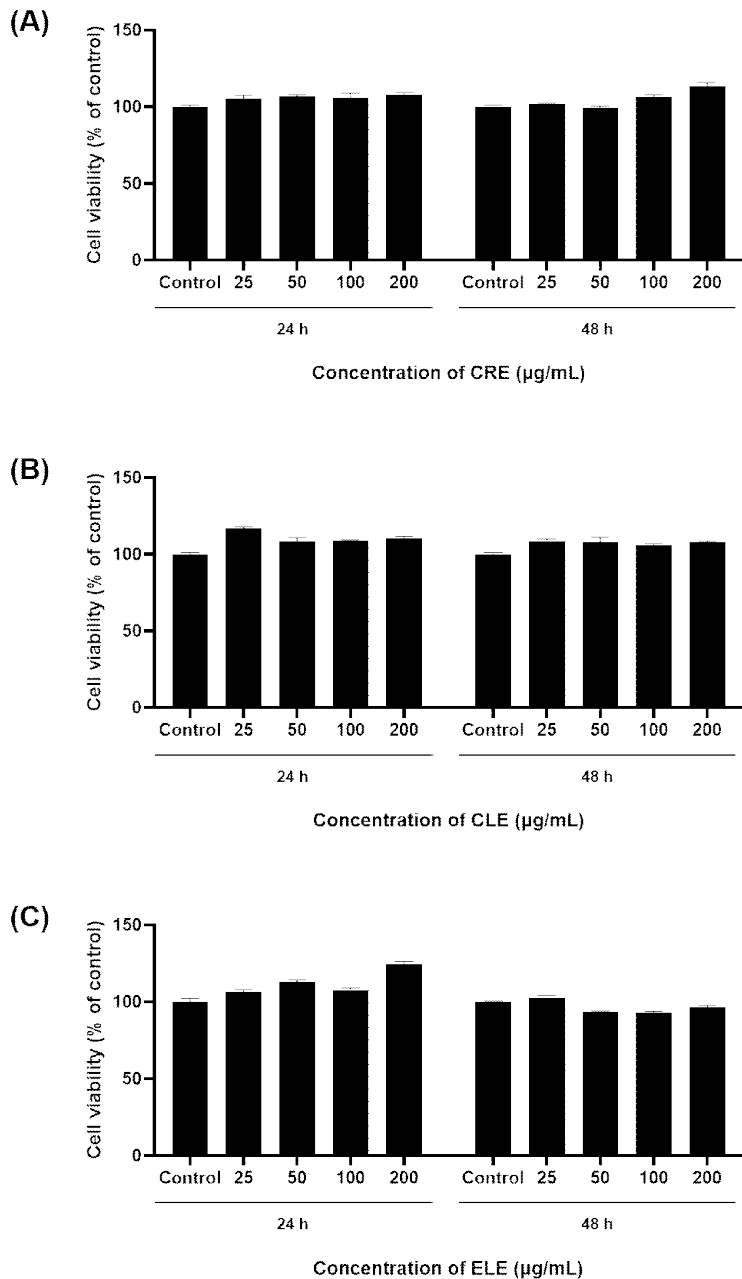


Figure 3. Cell viability of C2C12 cells treated CRE, CLE, ELE Various concentrations(0, 25, 50, 100, 200 µg/mL) of (A) CRE, (B) CLE, and (C) ELE were treated to C2C12 cells. and then cultured for 24 and 48 h. Data are presented mean \pm standard error mean(n = 6). CRE, *Colocasia esculenta* roots extract; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract.

2. C2C12 근육세포에서 토란, 와사비 추출물이 근육분화에 미치는 영향

토란 구근 추출물(CRE), 토란잎 추출물(CLE), 와사비 추출물(ELE)이 C2C12 근육세포의 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해 이전과 동일한 방법으로 분화시킨 C2C12 세포를 6일째 되는 날 추출물과 DEX를 동시처리하여 12시간 후 현미경으로 검사하였다.

C2C12 근육세포에 DEX를 처리했을 때 근관 직경이 줄어든 것을 확인할 수 있었다(Figure 4A). 근관 직경을 측정한 결과 CON그룹에 비해 DEX그룹이 통계적으로 유의하게 감소하였다. 그리고 CRE200, CLE200, ELE200 처리 시 감소하였던 근관 직경이 유의적으로 증가했다(Figure 4B).

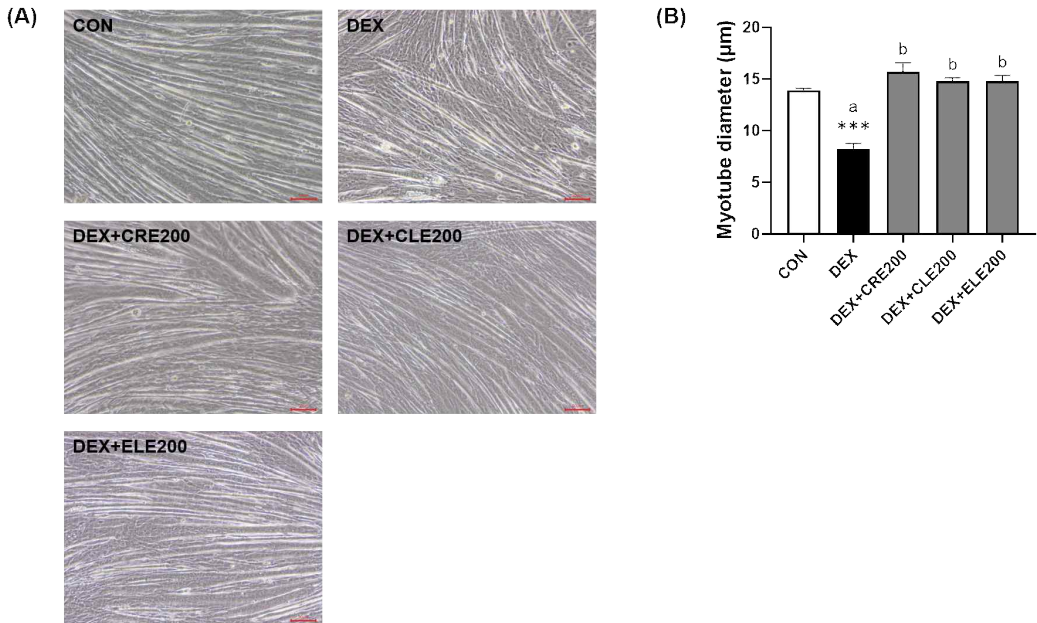


Figure 4. Effect of CRE, CLE, ELE treatment on the morphology and diameter of C2C12 myotubes

C2C12 cells were differentiated for 6 days and then co-treated with DEX and CRE, CLE, ELE for 12 h, after which the myotubes were examined under a microscope. (A) The morphology of C2C12 myotubes was examined at 200× magnification. (B) The diameter of the myotubes was represented as an average value, measured from 50 myotubes per well. Data are presented mean ± standard error mean. Statistical analysis was conducted using unpaired Student's *t*-test: *DEX* vs. *CON*; ****P*<.001. (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of *P*<.05, as determined by Duncan's multiple range test CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; CRE, *Colocasia esculenta* roots extract treated group; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract treated group; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract treated group.

3. 토란, 와사비 추출물 처리 시 C2C12 근육세포에서 mRNA 발현에 미치는 영향

토란 구근 추출물(CRE), 토란잎 추출물(CLE), 와사비 추출물(ELE)이 DEX로 유발된 근육위축에서 효과를 조사하기 위해 C2C12 세포에 DEX(10 μ M)와 CRE, CLE, ELE(50, 100, 200 μ g/mL)를 12시간 동시 처리하였다. 이후 분자생물학적인 조사를 위해 real-Time qPCR 분석으로 근육분화의 대표 인자인 *Mhc*, *Myod*, *Myog*와 근육 단백질 분해 인자 *Trim63*, *Fbxo32*를 확인하였다.

CRE 처리 시 CON 그룹 대비 DEX 그룹에서 *Mhc* 발현이 유의적으로 감소하지는 않았지만, CRE50, CRE100, CRE200 그룹에서 DEX 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다. *Myod* 발현은 DEX 그룹이 CON 그룹 대비 유의적으로 감소하였고, CRE를 처리한 모든 그룹에서 유의적으로 증가하였다. *Myog* 발현 역시 DEX 그룹에서 CON 그룹 대비 유의적으로 감소하였고, CRE50, CRE100 그룹에서 유의적으로 증가하고 CRE200 그룹에서는 증가하는 경향을 보였다(Figure 5). *Trim63*, *Fbxo32* 발현은 CON 그룹에 비해 DEX 그룹이 유의하게 증가하였지만, CRE를 처리하였을 때 DEX 그룹과 비교하여 변화를 보이지 않았다(Figure 6).

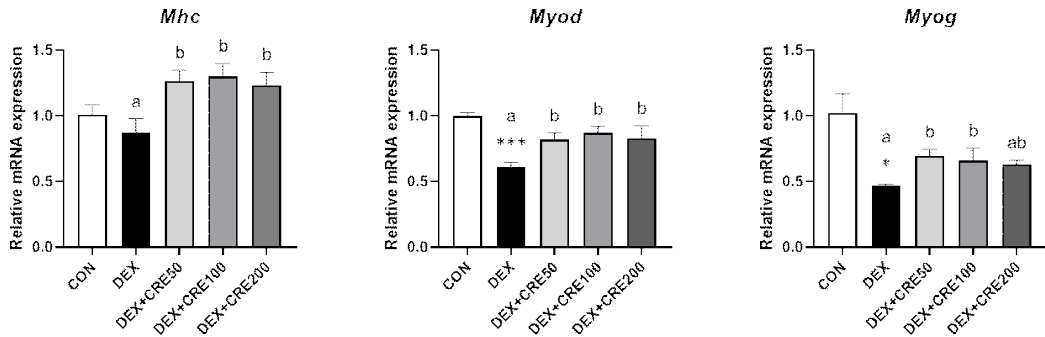


Figure 5. Effect of CRE on mRNA expression of myogenic regulatory factors in C2C12 cells

mRNA expression levels of *Mhc*, *Myod*, and *Myog* were determined by real-time qPCR and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). Statistical analysis was conducted using unpaired Student's *t*-test: *DEX* vs. *CON*; * $P < .05$, *** $P < .001$. (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; CRE, *Colocasia esculenta* roots extract treated group.

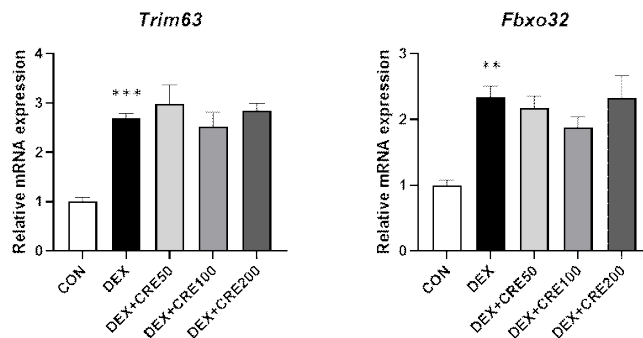


Figure 6. Effect of CRE on mRNA expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells

mRNA expression levels of *Trim63* and *Fbxo32* were determined by real-time qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). Statistical analysis was conducted using unpaired Student's *t*-test: *DEX* vs. *CON*; ** $P < .01$, *** $P < .001$. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; CRE, *Colocasia esculenta* roots extract treated group.

CLE 처리 시 *Mhc* 발현은 그룹 간의 차이를 보이지 않았고, *Myod*와 *Myog* 발현은 CON 그룹에 비해 DEX 그룹은 감소하였지만 CLE 그룹과 DEX 그룹에서 차이가 없었다(Figure 7). 한편 *Trim63*, *Fbxo32* 발현은 DEX 그룹이 CON 그룹에 비해 유의적으로 증가하였고, CLE100 그룹이 DEX 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다. 그리고 CLE50, CLE200 그룹은 DEX 그룹에 비해 감소하는 경향을 보였다(Figure 8).

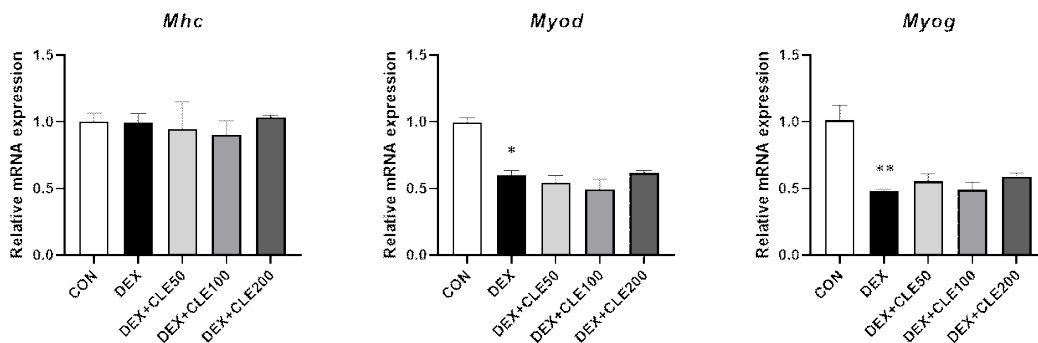


Figure 7. Effect of CLE on mRNA expression of myogenic regulatory factors in C2C12 cells

mRNA expression levels of *Mhc*, *Myod*, and *Myog* were determined by real-time qPCR qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). Statistical analysis was conducted using unpaired Student's *t*-test: *DEX* vs. *CON*; * $P < .05$, ** $P < .01$. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract treated group.

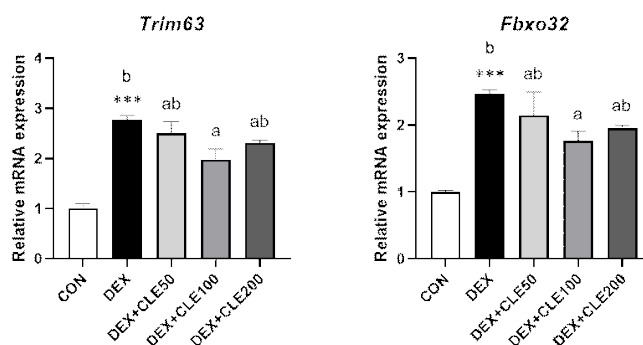


Figure 8. Effect of CLE on mRNA expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells

mRNA expression levels of *Trim63* and *Fbxo32* were determined by real-time qPCR qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). Statistical analysis was conducted using unpaired Student's *t*-test: *DEX* vs. *CON*; *** $P < .001$. (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract treated group.

ELE 처리 시 *Mhc* 발현은 DEX 그룹과 비교했을 때 ELE50, ELE200 그룹에서는 증가하는 경향을 보였고, ELE100 그룹에서는 유의적으로 증가하였다. *Myod* 발현은 DEX 그룹이 CON 그룹에 비해 유의적으로 감소하였으나 ELE 200 처리 그룹에서 DEX 그룹에 비해 감소하였다(Figure 9). *Myog* 발현 역시 DEX 그룹이 CON 그룹에 비해 유의적으로 감소하였으며, DEX 그룹과 비교했을 때 ELE50 그룹은 증가하는 경향을, ELE100 그룹은 유의적으로 증가하였다. *Trim63*, *Fbxo32* 발현은 CON 그룹에 비해 DEX 그룹이 유의적으로 증가하였고, ELE200 그룹에서 유의적으로 감소하였다(Figure 10).

CRE는 근육분화유도 인자들의 발현을 증가시키고, CLE와 ELE는 근육 단백질 분해 인자들의 발현을 감소시켰음을 확인하였다.

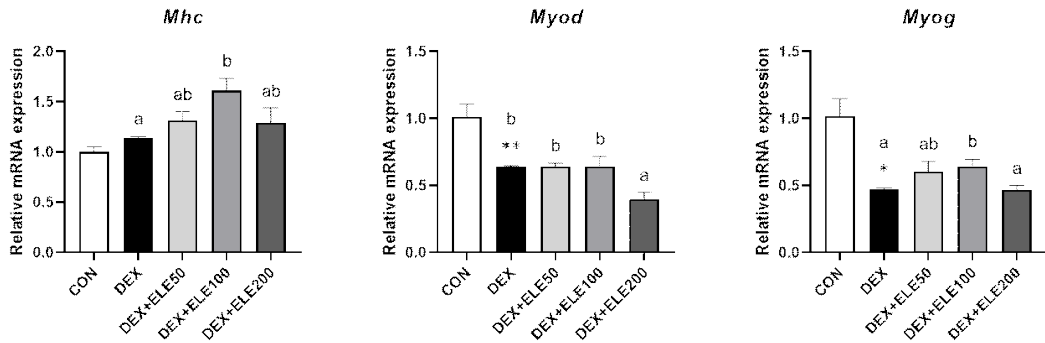


Figure 9. Effect of ELE on mRNA expression of myogenic regulatory factors in C2C12 cells

mRNA expression levels of *Mhc*, *Myod* and *Myog* were determined by real-time qPCR qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). Statistical analysis was conducted using unpaired Student's *t*-test: *DEX* vs. *CON*; * $P < .05$, ** $P < .01$. (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract treated group.

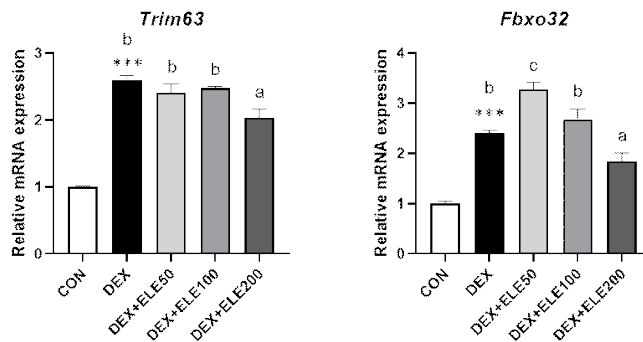


Figure 10. Effect of ELE on mRNA expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells

mRNA expression levels of *Trim63* and *Fbxo32* were determined by real-time qPCR qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). Statistical analysis was conducted using unpaired Student's *t*-test: *DEX* vs. *CON*; *** $P < .001$. (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract treated group.

4. 토란, 와사비 추출물 처리 시 C2C12 근육세포에서 단백질 발현에 미치는 영향

토란 구근 추출물(CRE), 토란잎 추출물(CLE), 와사비 추출물(ELE)이 DEX로 유발된 근감소증에서의 영향에 대한 메커니즘을 조사하기 위해 western blot을 수행하여 단백질 발현을 확인하였다. 실험은 mRNA 발현에서 주로 효과를 보였던 100, 200 µg/mL 처리 그룹으로 진행하였다.

CRE 처리 시 근육분화 인자인 MHC 발현은 CON 그룹에 비해 감소하지는 않았지만, CRE100과 CRE200 그룹에서 DEX 그룹 대비 유의적으로 증가하였고, Myogenin와 Myo D의 발현은 그룹 간의 차이를 보이지 않았다(Figure 11B). 근육 단백질 합성 인자인 4E-BP1과 P70S6K1을 확인한 결과, p-4E-BP1/4E-BP1 발현은 DEX 그룹에서 CON 그룹에 비해 감소하지 않았지만 CRE100과 CRE200 그룹에서 DEX 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다. p-P70S6K1/P70S6K1 발현은 역시 DEX 그룹에서 CON 그룹에 비해 감소하지 않았지만, CRE200 그룹에서 DEX 그룹보다 증가하는 경향을 보였고, CRE100 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 12B). 한편 FoxO3의 인산화가 CON 그룹에 비해 DEX 그룹이 감소하지 않았지만 CRE100 그룹에서 DEX 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다(Figure 13B). 이에 따라 하위 기전인 Atrogin-1 발현은 CON 그룹에 비해 DEX 그룹이 유의적으로 증가하였고 CRE 처리 시 모든 그룹에서 유의적으로 감소하였다. MuRF1 발현은 CON 그룹에 비해 DEX 그룹이 감소하지는 않았지만, CRE100과 CRE200 그룹에서 유의적으로 감소하였다(Figure 13C). CRE100 그룹에서 FoxO3의 인산화가 증가함에 따라 하위 기전인 MuRF1과 Atrogin-1의 발현이 감소하였고, CRE 처리 시 4E-BP1과 P70S6K1은 상향조절되었다.

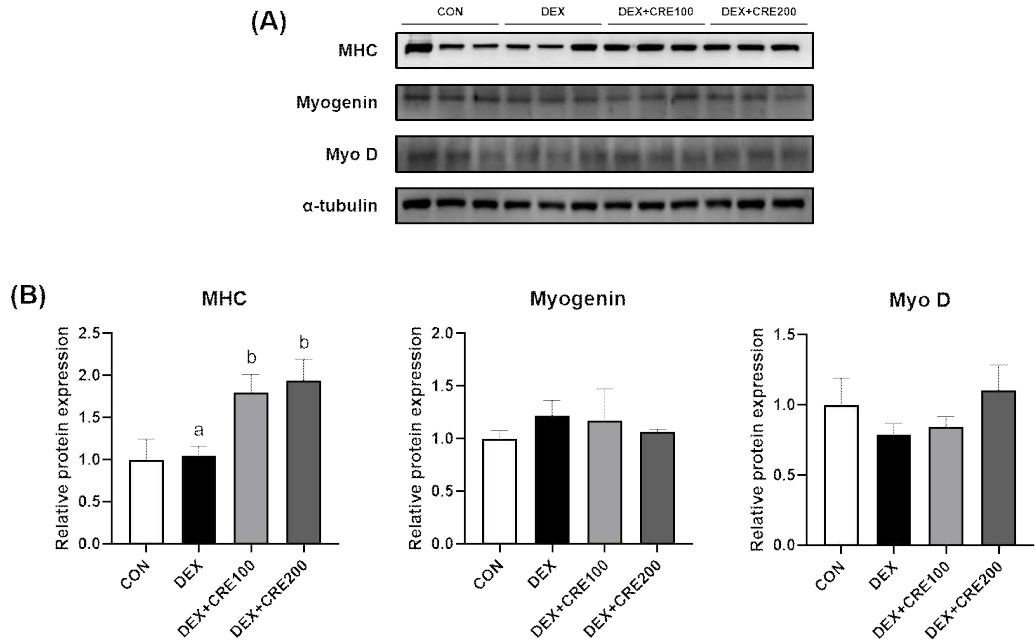


Figure 11. Effect of CRE on protein expression of myogenic regulatory factors in C2C12 cells

(A) The expression of protein was performed using western blot. (B) The expression level of MHC, Myogenin and Myo D proteins were normalized to α -tubulin. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; CRE, *Colocasia esculenta* roots extract treated group.

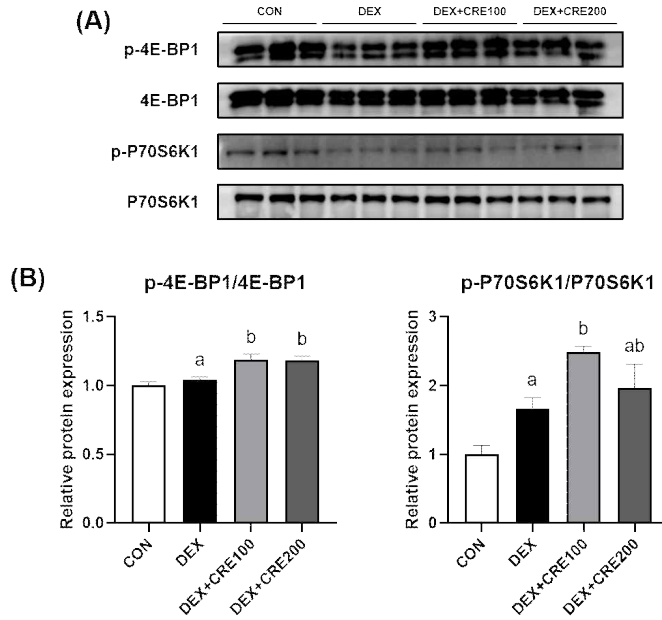


Figure 12. Effect of CRE on protein expression of protein synthesis regulatory factors in C2C12 cells

(A) The expression of protein was performed using western blot. (B) The ratios of p-4E-BP1 to 4E-BP1 and p-P70S6K1 to P70S6K1 proteins were indicated. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; CRE, *Colocasia esculenta* roots extract treated group.

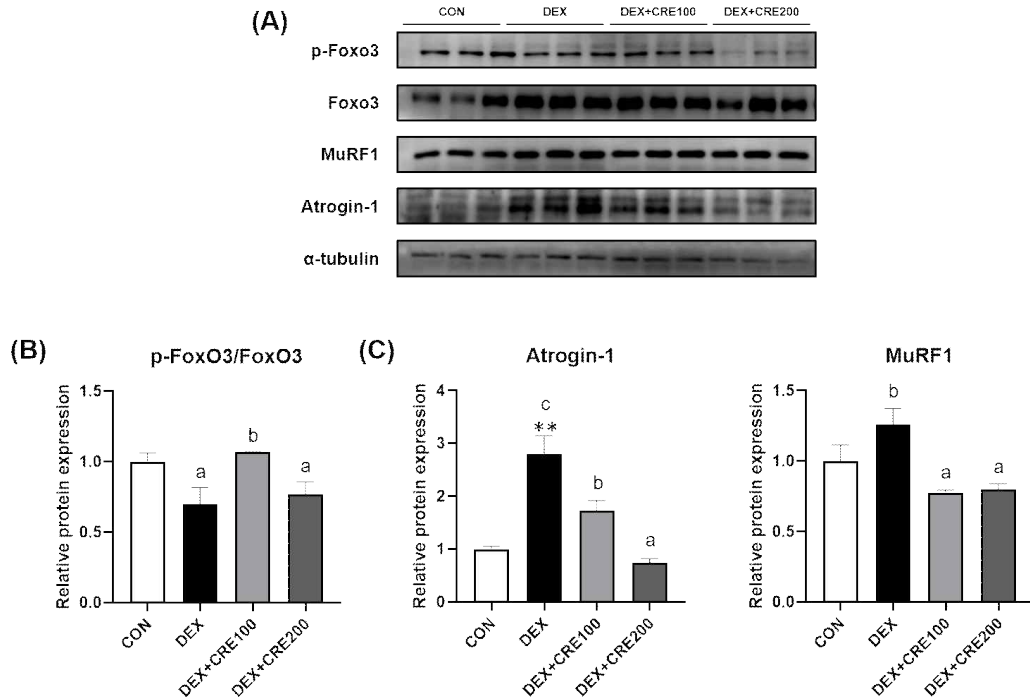


Figure 13. Effect of CRE on protein expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells

(A) The expression of protein was performed using western blot. (B, C) The expression level of Atrogin-1 and MuRF1 proteins were normalized to α -tubulin and the ratio p-FoxO3 to FoxO3 protein was indicated. Data are presented mean \pm standard error mean ($n = 3$). Statistical analysis was conducted using unpaired Student's t -test: *DEX* vs. *CON*; $**P < .01$. (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; CRE, *Colocasia esculenta* roots extract treated group.

CLE 처리 시 근육분화 인자인 MHC 발현은 CON 그룹에 비해 DEX 그룹에서 감소를 보이지 않았지만 CLE200 그룹에서 DEX 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다(Figure 14B). 또한 4E-BP1과 P70S6K1을 확인한 결과, p-4E-BP1/4E-BP1 발현은 DEX 그룹에서 CON 그룹에 비해 감소하는 경향($P = 0.55$)을 보였고 CLE200 그룹에서 DEX 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다. p-P70S6K1/P70S6K1 발현은 DEX 그룹에서 CON 그룹에 비해 유의적으로 감소하였고 CLE200 그룹에서 DEX 그룹보다 유의적으로 증가하였다(Figure 14C). 한편, 근육단백질 분해 인자인 p-FoxO3/FoxO3, MuRF1, Atrogin-1의 발현을 확인한 결과, FoxO3의 인산화가 DEX 그룹 대비 CLE200 그룹에서 유의하게 증가하였다(Figure 15B). MuRF1 발현은 CON 그룹에 비해 DEX 그룹에서 증가하지 않았다. 하지만 CLE를 처리한 CLE100, CLE200 그룹에서 DEX 그룹보다 유의적으로 감소하였다. Atrogin-1 발현은 DEX 그룹에서 CON 그룹에 비해 유의적으로 증가하였으며 CLE200 그룹에서 DEX 그룹과 비교하여 유의적으로 감소하였다(Figure 15C). CLE200 그룹에서 FoxO3의 인산화가 증가함에 따라 하위 기전인 MuRF1과 Atrogin-1의 발현이 감소하고, 4E-BP1과 P70S6K1이 상향조절되었다.

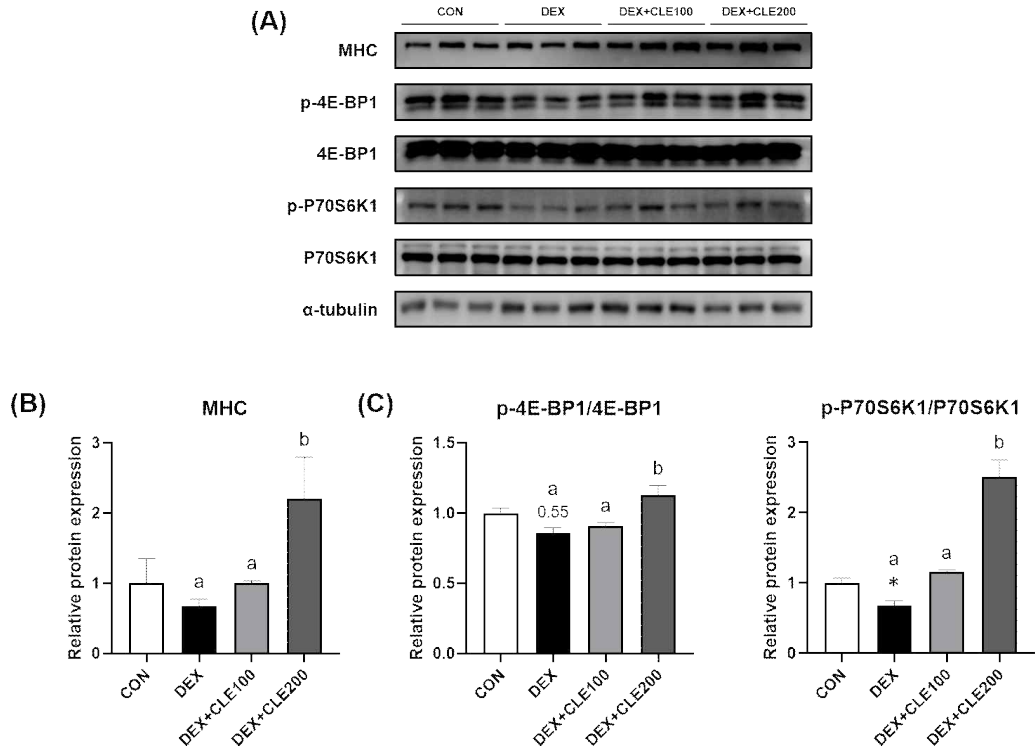


Figure 14. Effect of CLE on protein expression of myogenic and protein synthesis regulatory factors in C2C12 cells

(A) The expression of protein was performed using western blot. (B, C) The expression level of MHC protein was normalized to α -tubulin and the ratios of p-4E-BP1 to 4E-BP and p-P70S6K1 to P70S6K1 proteins were also indicated. Data are presented mean \pm standard error mean ($n = 3$). Statistical analysis was conducted using unpaired Student's *t*-test: *DEX* vs. *CON*; $*P < .05$. (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract.

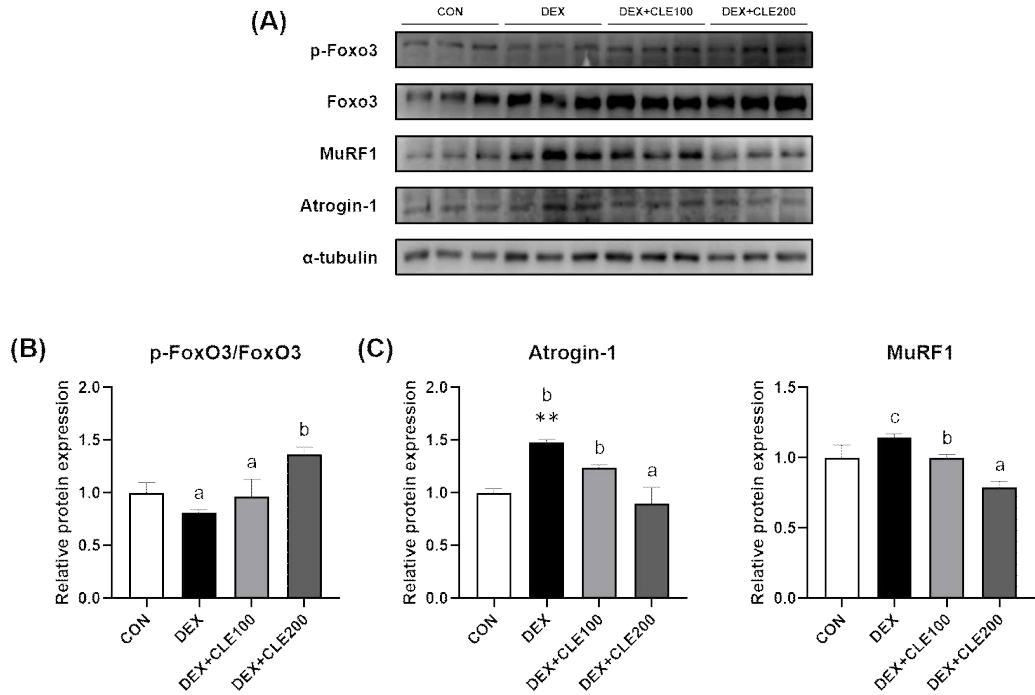


Figure 15. Effect of CLE on protein expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells

(A) The expression of protein was performed using western blot. (B, C) The expression level of Atrogin-1 and MuRF1 proteins were normalized to α -tubulin and the ratio p-FoxO3 to FoxO3 protein was indicated. Data are presented mean \pm standard error mean ($n = 3$). Statistical analysis was conducted using unpaired Student's t -test.: *DEX* vs. *CON*; $**P < .01$. (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract.

ELE 처리 시 MHC 발현은 CON 그룹에 비해 DEX 그룹에서 감소를 보이지 않았지만 ELE100 그룹에서 DEX 그룹에 비해 증가하는 경향을, ELE200 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 16B). 근육단백질 합성 인자인 p-4E-BP1/4E-BP1와 p-P70S6K1/P70S6K1 발현은 DEX 그룹에서 CON 그룹에 비해 감소하지 않았지만, ELE100과 ELE200 그룹 모두에서 유의적으로 증가하였다(Figure 16C). 반면 FoxO3의 인산화가 CON 그룹에 비해 DEX 그룹에서 유의적으로 감소하였고, ELE100 그룹에서 증가하는 경향을 보였고, ELE200 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 17B). 이에 따라 MuRF1, Atrogin-1의 발현 확인 결과, MuRF1와 Atrogin-1 발현은 CON 그룹에 비해 DEX 그룹에서 유의적으로 증가하였고, ELE를 처리한 ELE100, ELE200 그룹에서 DEX 그룹보다 유의적으로 감소하였다(Figure 17C). ELE100과 ELE200 그룹에서 FoxO3의 인산화가 증가함에 따라 하위 기전인 MuRF1과 Atrogin-1의 발현이 감소하였고, 또한 4E-BP1과 P70S6K1은 상향조절되었다.

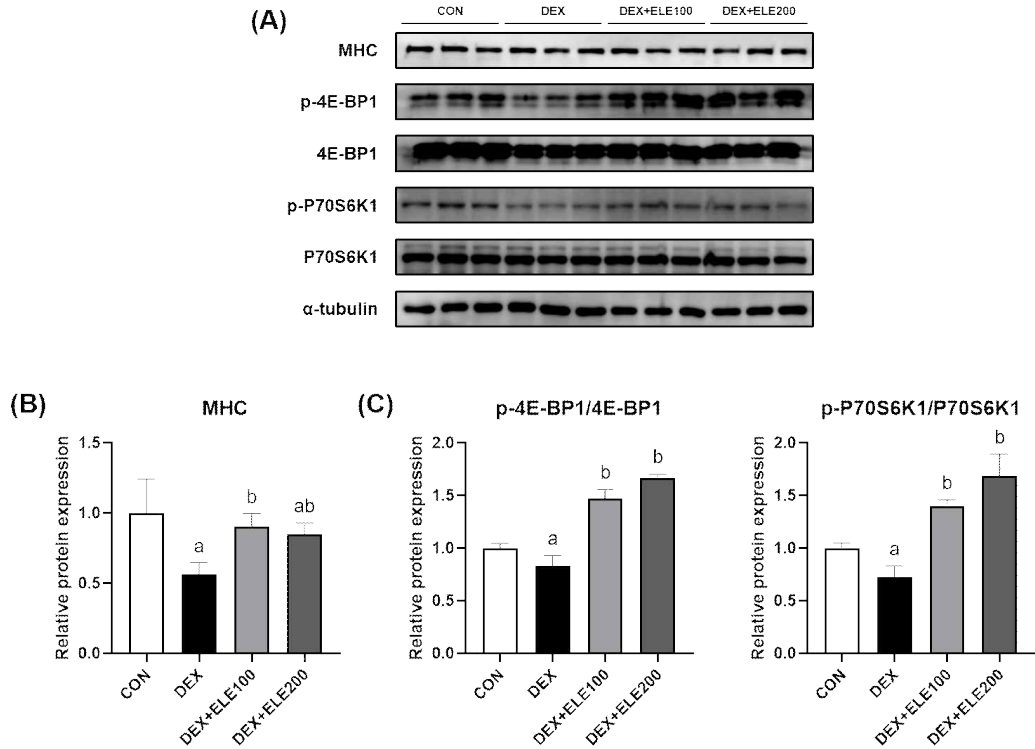


Figure 16. Effect of ELE on protein expression of myogenic and protein synthesis regulatory factors in C2C12 cells

(A) The expression of protein was performed using western blot. (B, C) The expression level of MHC protein was normalized to α -tubulin. The ratios of p-4E-BP1 to 4E-BP1 and p-P70S6K1 to P70S6K1 proteins were also indicated. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). Statistical analysis was conducted using unpaired Student's *t*-test: *DEX* vs. *CON*; **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001. (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of *P* < .05, as determined by Duncan's multiple range test. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract.

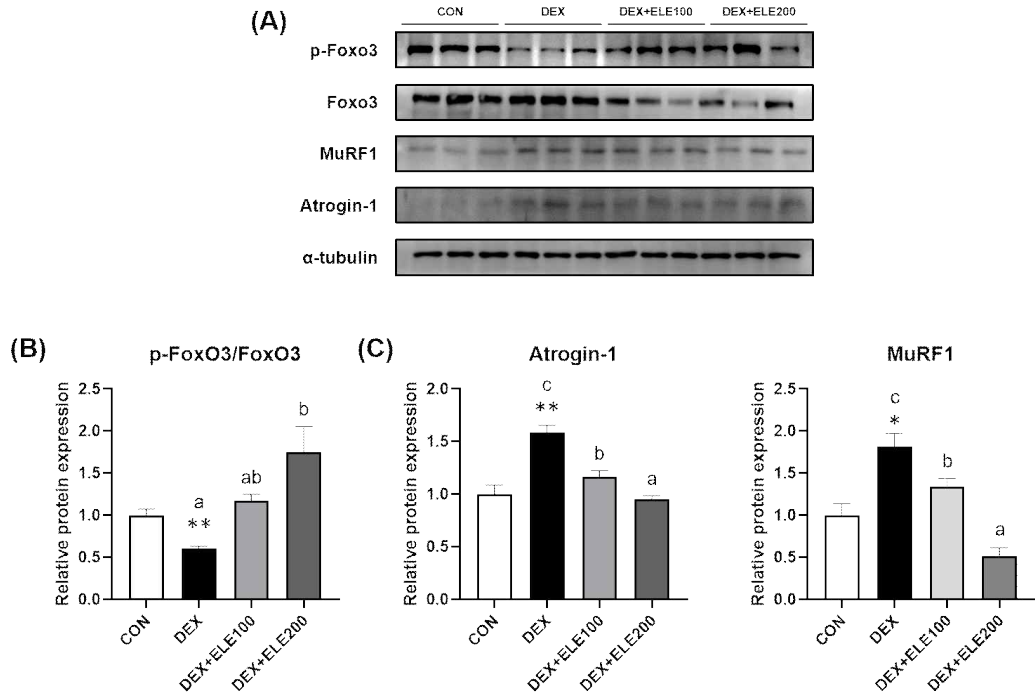


Figure 17. Effect of ELE on protein expression of protein degradation regulatory factors in C2C12 cells

(A) The expression of protein was performed using western blot. (B, C) The expression level of Atrogin-1 and MuRF1 proteins were normalized to α -tubulin and the ratio p-FoxO3 to FoxO3 protein was indicated. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). Statistical analysis was conducted using unpaired Student's *t*-test: DEX vs. CON; * $P < .05$, ** $P < .01$. (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the DEX treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, control group; DEX, dexamethasone treated group; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract.

제2절 3T3-L1 지방세포에서 토란, 와사비 추출물이 미치는 영향

1. 3T3-L1 지방세포에서 토란, 와사비 추출물의 세포독성 평가

본 실험에 사용한 토란 구근 추출물(CRE), 토란잎 추출물(CLE), 와사비잎 추출물(ELE)이 3T3-L1 지방세포에 대한 세포독성을 확인하기 위해 WST-8 assay를 진행했다. 3T3-L1 지방세포에 CRE, CLE, ELE를 농도별(0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24시간, 48시간 동안 처리하였다. CRE, CLE, ELE를 처리하지 않은 대조군(Control)을 기준으로 비교하였을 때, CRE, CLE, ELE 모두 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도까지 3T3-L1 지방세포 생존율에 유의적인 감소를 보이지 않았다(Figure 18). 이후 진행된 실험에 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지의 농도를 사용하였다.

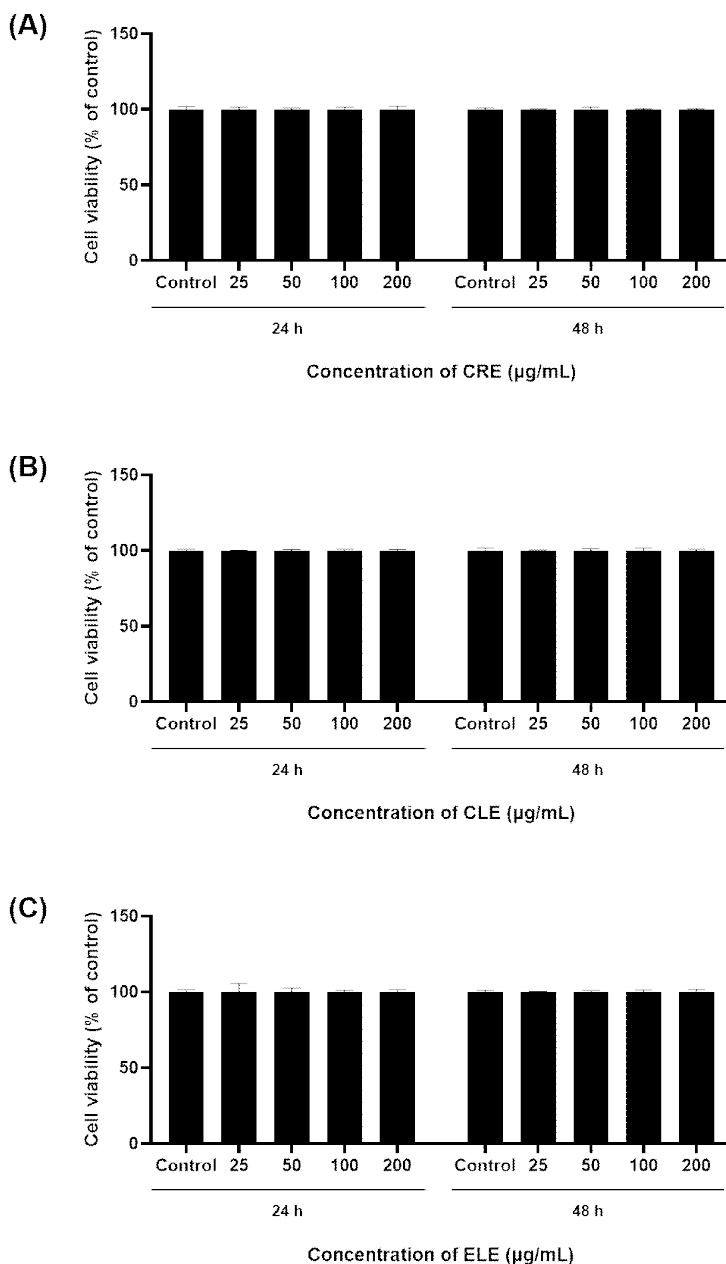


Figure 18. Cell viability of 3T3-L1 cells treated CRE, CLE, ELE

Various concentrations (0, 25, 50, 100, 200 µg/mL) of (A) CRE, (B) CLE, and (C) ELE were treated to 3T3-L1 cells, and then cultured for 24 and 48 h. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 6). CRE, *Colocasia esculenta* roots extract; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract.

2. 토란, 와사비 추출물 처리 시 3T3-L1 지방세포에서 지방생성 억제에 미치는 영향

토란구근 추출물, 토란잎 추출물, 와사비 추출물이 지방세포 분화에 대한 억제 효과를 조사하기 위해 3T3-L1 세포에 지방 분화 유도 호르몬을 첨가한 배지로 분화시켰다. CRE, CLE, ELE를 농도별로 동시에 처리하고, 8일 동안 분화시켜 Oil Red O 염색을 통해 총 지질 축적량을 측정하였다.

분화시키지 않은 Non-diff. 그룹과 비교했을 때 CON 그룹의 총 지질 축적량이 증가하였으며 분화가 정상적으로 진행된 것을 확인하였다. CON 그룹의 총 지질 축적량을 기준으로 하였을 때, CON 그룹에 비해 CRE50 그룹은 약 21%, CRE200 그룹에서 약 19% 감소하였고 통계적으로 감소하는 경향을 보였다. CRE100 그룹에서는 약 29% 감소하고, CON 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다. CLE를 처리한 그룹에서는 CLE50 그룹 약 39%, CLE100 그룹 약 38%, CLE200 그룹 약 42% CON 그룹에 비해 감소하였고 통계적으로 모두 유의적으로 감소하였다. ELE를 처리한 그룹 역시, ELE50 그룹 약 39%, ELE100 그룹 약 40%, ELE200 그룹 약 42% CON 그룹에 비해 감소하였고 통계적으로 모두 유의적으로 감소하였다 (Figure 19B). CRE는 농도별로 차이를 보이지만, CRE, CLE, ELE 모두 지질의 축적을 억제하여 지방 생성을 억제하는 효과에 가능성을 보였다.

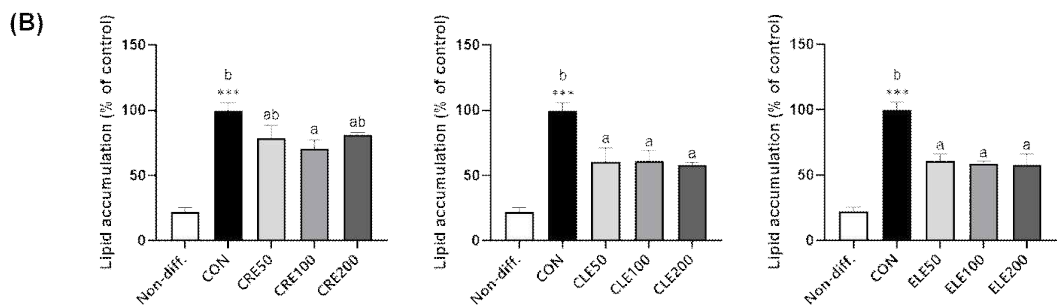
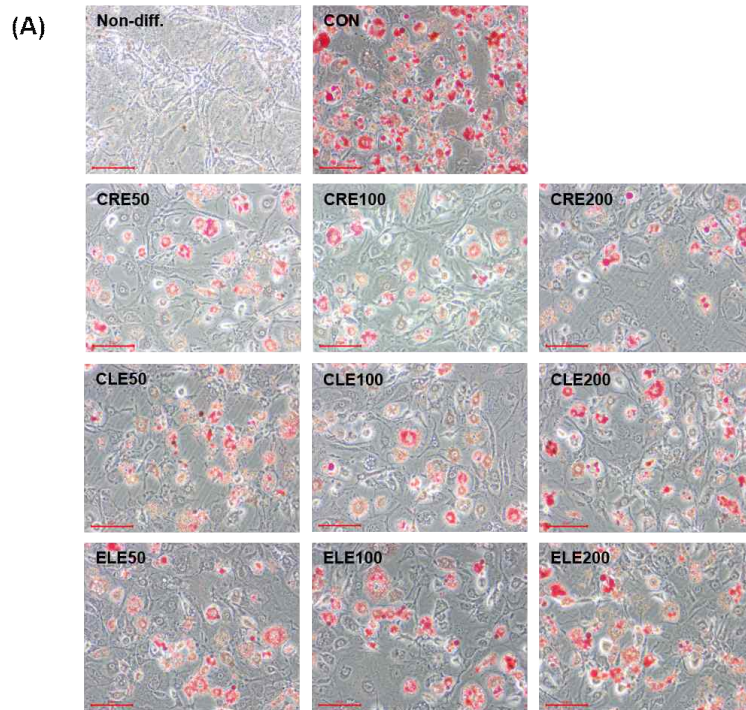


Figure 19. Effect of CRE, CLE, ELE on lipid accumulation in 3T3-L1 cells

(A) The morphology of lipid accumulation observed under a microscope(200× magnification). (B) Lipid accumulation levels of CRE, CLE, ELE in 3T3-L1 cells were assessed using Oil Red O staining. The fully differentiated Non-diff. group was set as the standard at 100%. Data are presented mean ± standard error mean. Statistical analysis was conducted using unpaired Student's *t*-test: Non-diff. vs. CON; ****P*<.001. (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of *P*<.05, as determined by Duncan's multiple range test. Non-diff., Non-differentiated group; CON, 1 μM DEX, 0.5 μM IBMX and 10 μL/mL insulin treated group; CRE, *Colocasia esculenta* roots extract treated group; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract treated group; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract treated group.

3. 토란, 와사비 추출물 처리 시 3T3-L1 지방세포에서 mRNA 발현에 미치는 영향

토란 구근 추출물(CRE), 토란잎 추출물(CLE), 와사비 추출물(ELE)이 지방세포 분화에 대한 영향을 조사하기 위해 3T3-L1 전지방세포에 DEX, IBMX, insulin의 혼합 각테일과 함께 각 well에 CRE, CLE, ELE(50, 100, 200 µg/mL)를 처리하여 분화시켰다. 이후 분자생물학적인 조사를 위해 real-time qPCR 분석으로 지방생성 인자와 지방분해인자들을 확인하였다.

CRE 처리 시 mRNA 발현 수준을 확인하였다. 먼저 지방세포 분화 초기에 발현되는 주요인자인 *Cebpa*, *Pparγ*의 발현을 조사하였다. *Cebpa* 발현은 그룹간에 차이를 보이지 않았고, *Pparγ* 발현은 분화시킨 CON 그룹과 비교했을 때 CRE50, CRE100, CRE200의 그룹에서 모두 유의적으로 감소하였다. 지방세포 분화를 유도하는 *Fas*와 *Acc*의 발현은 그룹간의 차이를 보이지 않았다(Figure 20). 지방조직에서 분비되는 Adiponectin의 유전자인 *Adipoq* 발현은 CON 그룹에 비해 CRE를 처리한 모든 그룹에서 유의적으로 증가하였다. 지방산의 산화에 관여하는 *Cpt1*은 그룹간 차이를 보이지 않았다. TG의 분해를 유도하는 지방분해인자인 *Pnpla2* 발현이 CON 그룹과 비교했을 때 CRE를 처리한 모든 그룹에서 유의적으로 증가하였고, *Lipe* 발현은 CON 그룹에 비해 CRE200 그룹은 증가하는 경향을, CRE50, CRE100 그룹에서는 유의적으로 증가하였다(Figure 21). 열발생에 관여하는 인자인 *Ucp1*, *Ucp3*, *Pgc1a* 발현을 확인하였다. *Ucp1* 발현은 그룹간의 차이를 보이지 않았고, *Ucp3* 발현은 CON 그룹과 비교했을 때 CRE200 그룹에서 유의적으로 증가하였다. *Pgc1a* 발현은 CON 그룹대비 CRE50, CRE100 그룹에서 유의적인 증가를 보였다(Figure 22).

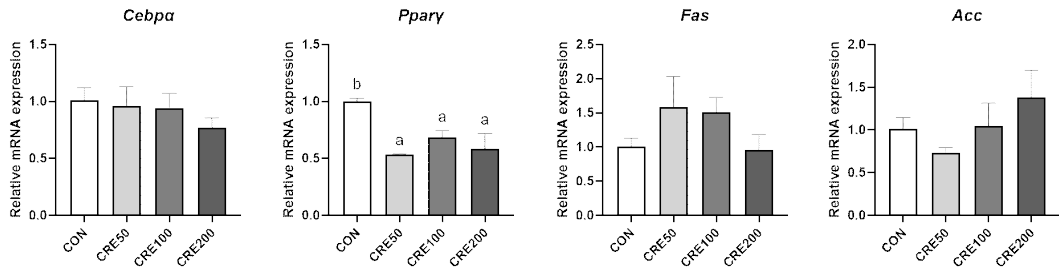


Figure 20. Effect of CRE on mRNA expression of adipogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells

mRNA expression levels of *Cebpa*, *Pparγ*, *Fas* and *Acc* were determined by real-time qPCR qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean(n = 3). (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; CRE, *Colocasia esculenta* roots extract treated group.

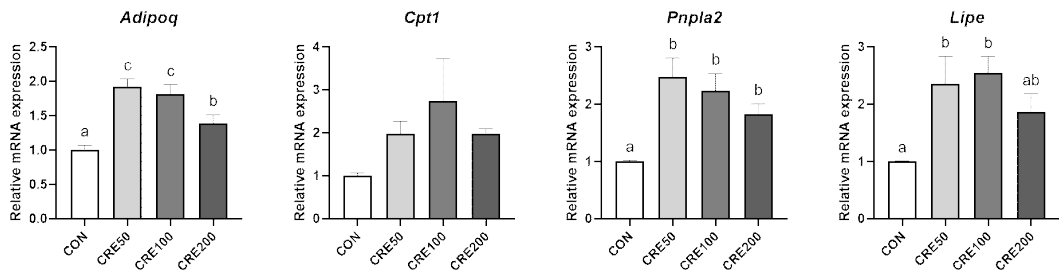


Figure 21. Effect of CRE on mRNA expression of adiponectin and fat breakdown regulatory factors in 3T3-L1 cells

mRNA expression levels of *Adipoq*, *Cpt1*, *Pnpla2* and *Lipe* were determined by real-time qPCR qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean(n = 3). (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; CRE, *Colocasia esculenta* roots extract treated group.

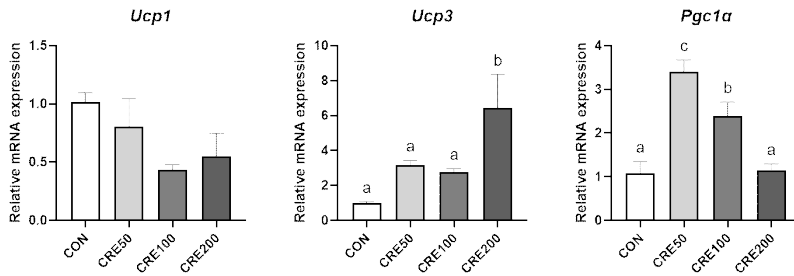


Figure 22. Effect of CRE on mRNA expression of thermogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells

mRNA expression levels of *Ucp1*, *Ucp3* and *Pgc1a* were determined by real-time qPCR qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; CRE, *Colocasia esculenta* roots extract treated group.

CLE처리 시 mRNA 발현 수준을 확인하였다. 지방생성 관련 인자인 *Cebpa* 발현은 그룹간의 차이를 보이지 않았고, *Pparγ* 발현은 CON그룹과 비교했을 때 CLE100 그룹은 감소하는 경향을 보였고, CLE50 과 CLE200 그룹은 유의적으로 감소하였다. *Fas* 발현은 CON 그룹에 비해 CLE50 그룹에서 증가하였고, CLE100 그룹에서 증가하는 경향을 보였다. *Acc* 발현은 CON 그룹과 비교하여 CLE 100 그룹에서 유의적으로 증가하였고 CLE50, CLE200 그룹에서 증가하는 경향을 보였다 (Figure 23). 다음 *Adipoq* 발현 확인 결과 CON 그룹보다 CLE100과 CLE200 그룹에서 증가하는 경향을 보였고, CLE50 그룹에서 유의적으로 증가하였다. 지방분해 관련 인자 확인 결과 *Cpt1*, *Pnpla2*, *Lipe* 발현은 CON 그룹에 비해 CLE50, CLE100, CLE200 모든 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 24). 열발생 관련 인자인 *Ucp1*와 *Ucp3* 발현은 그룹간에 차이를 보이지 않았고, *Pgc1a* 발현은 CON 그룹보다 CLE를 처리한 모든 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 25).

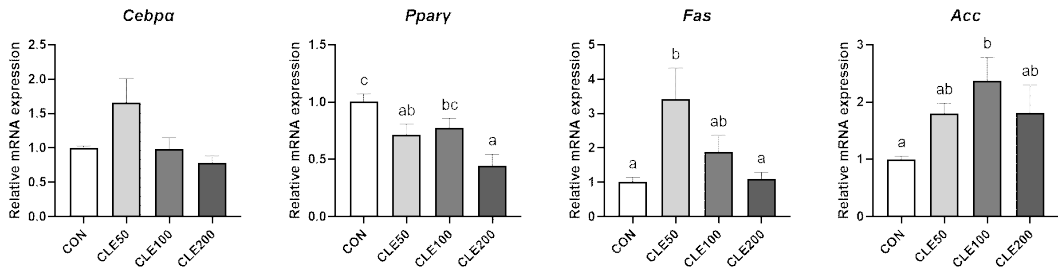


Figure 23. Effect of CLE on mRNA expression of adipogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells

mRNA expression levels of *Cebpa*, *Pparγ*, *Fas* and *Acc* were determined by real-time qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract treated group.

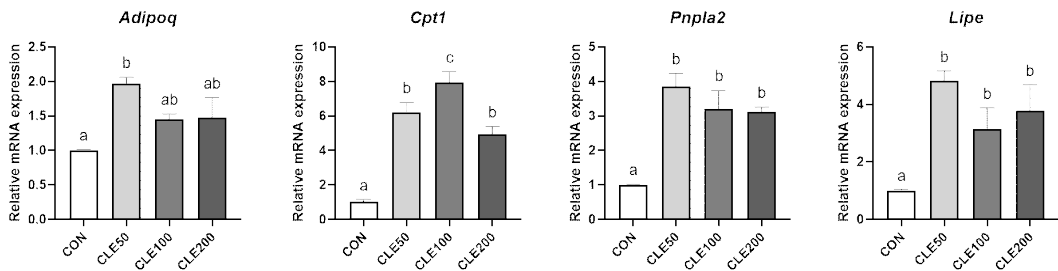


Figure 24. Effect of CLE on mRNA expression of adiponectin and fat breakdown regulatory factors in 3T3-L1 cells

mRNA expression levels of *Adipoq*, *Cpt1*, *Pnpla2* and *Lipe* were determined by real-time qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract treated group.

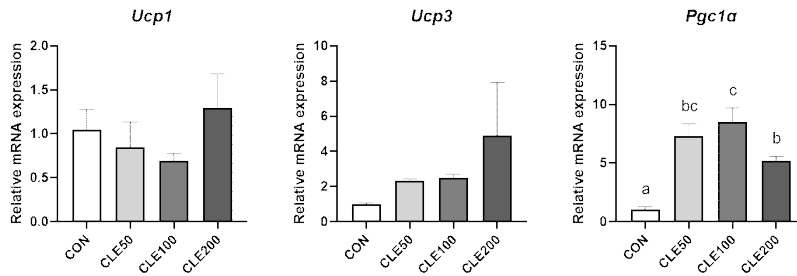


Figure 25. Effect of CLE on mRNA expression of thermogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells

mRNA expression levels of *Ucp1*, *Ucp3* and *Pgc1a* were determined by real-time qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract treated group.

ELE 처리 시 mRNA 발현 수준을 확인하였다. 지방생성 관련 인자인 *Cebpa* 발현은 그룹간의 차이를 보이지 않았고, *Ppar γ* 발현은 CON그룹과 비교했을 때 ELE를 처리한 모든 그룹에서 유의적으로 감소하였다. *Fas* 발현은 그룹간 차이가 없었고, *Acc* 발현은 CON 그룹과 비교하여 ELE를 처리한 모든 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 26). 다음 *Adipoq* 발현은 CON 그룹에 비해 ELE50 과 ELE100 그룹에서 유의적으로 증가하였고, ELE200 그룹에서는 유의적으로 감소하였다. 지방분해 관련 인자에서 *Cpt1* 발현은 CON 그룹에 비해 ELE200 그룹에서 유의적으로 증가하였고, *Pnpla2* 발현은 CON 그룹보다 ELE를 처리한 모든 그룹에서 유의적으로 증가하였다. *Lipe* 발현은 ELE50 그룹에서는 CON 그룹과 비교했을 때 증가하는 경향을, ELE100과 ELE200 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 27). 열을 발생하는데 관련 인자인 *Ucp1* 발현은 그룹간의 차이가 없었지만, *Ucp3* 발현은 CON 그룹에 비해 ELE100과 ELE200 그룹에서는 증가하는 경향을, ELE50 그룹에서는 유의적인 증가를 보였다. *Pgc1a* 발현은 ELE200 그룹에서 CON 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다(Figure 28).

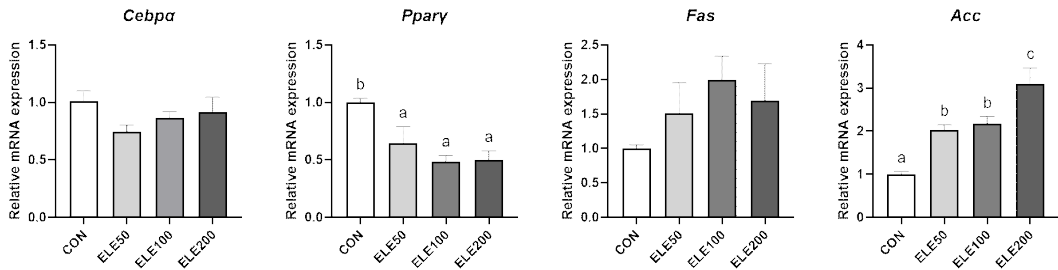


Figure 26. Effect of ELE on mRNA expression of adipogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells

mRNA expression levels of *Cebpa*, *Pparγ*, *Fas* and *Acc* were determined by real-time qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract treated group.

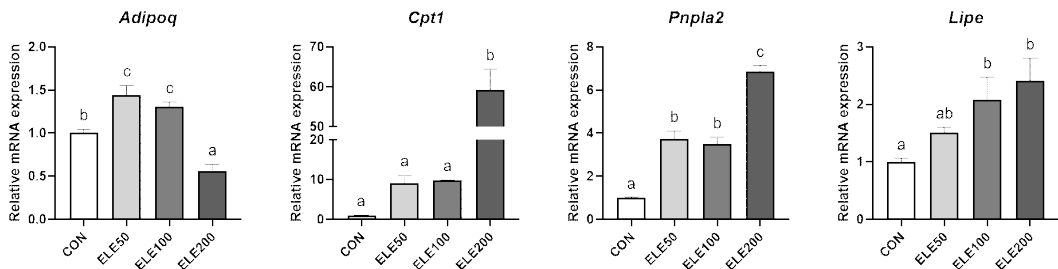


Figure 27. Effect of ELE on mRNA expression of adiponectin and fat breakdown regulatory factors in 3T3-L1 cells

mRNA expression levels of *Adipoq*, *Cpt1*, *Pnpla2* and *Lipe* were determined by real-time qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a-c) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract treated group.

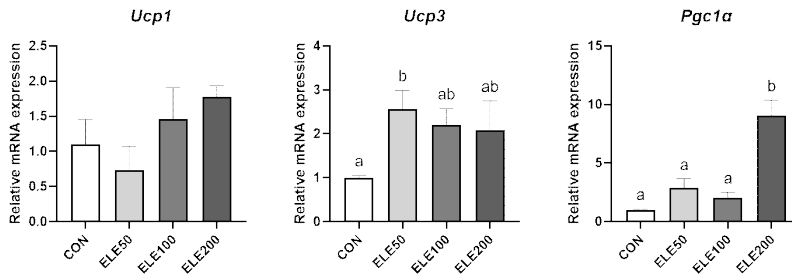


Figure 28. Effect of ELE on mRNA expression of thermogenesis regulatory factors in 3T3-L1 cells

mRNA expression levels of *Ucp1*, *Ucp3* and *Pgc1a* were determined by real-time qPCR, and all data were normalized to *Gapdh*. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract treated group.

4. 토란, 와사비 추출물 처리 시 3T3-L1 지방세포에서 단백질 발현에 미치는 영향

토란 구근 추출물(CRE), 토란잎 추출물(CLE), 와사비 추출물(ELE)이 지방세포 분화에 대한 영향에 대한 매커니즘을 조사하기 위해 western blot을 수행하여 단백질 발현을 확인하였다.

CRE 처리 시 지방의 대사를 조절하는 중요한 인자인 AMPK의 인산화가 CRE100, CRE200 그룹에서 CON 그룹에 비해 유의적으로 증가했다(Figure 29B). 반면 지방산의 합성을 촉진하는 FAS의 발현은 그룹간의 차이를 보이지 않았다(Figure 29C). 트리글리세롤을 분해하는 lipolysis를 조절하는 HSL의 인산화는 CON 그룹에 비해 CRE를 처리한 모든 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 29D).

CLE 처리 시 AMPK의 인산화가 CLE50 그룹에서는 증가하는 경향을 보였고, CLE100, CLE200 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 30B). FAS의 발현은 CLE를 처리한 모든 그룹에서 유의적으로 감소하였다(Figure 30C). 반면 HSL의 인산화는 CLE를 처리한 모든 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 30D).

ELE 처리 시 AMPK의 인산화가 ELE200 그룹에서 CON 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다(Figure 31B). 반면 FAS의 발현은 ELE 처리한 모든 그룹에서 유의적으로 감소하였고(Figure 31C), HSL의 인산화는 ELE50, ELE100 그룹에서 유의적으로 증가하였다(Figure 31D).

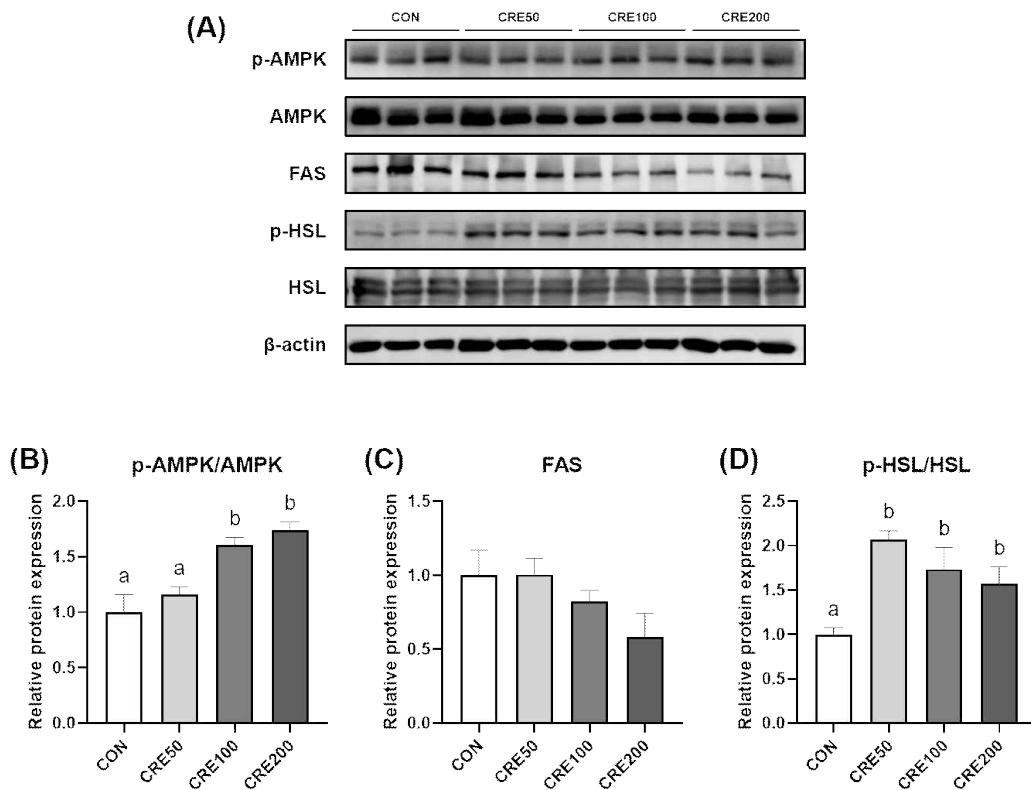


Figure 29. Effect of CRE on protein expression in 3T3-L1 cells

(A) The expression of protein was performed using western blot. The ratios of (B) p-AMPK/AMPK and (D) p-HSL/HSL were indicated and the expression level of (C) FAS protein were normalized to β -actin. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; CRE, *Colocasia esculenta* roots extract treated group.

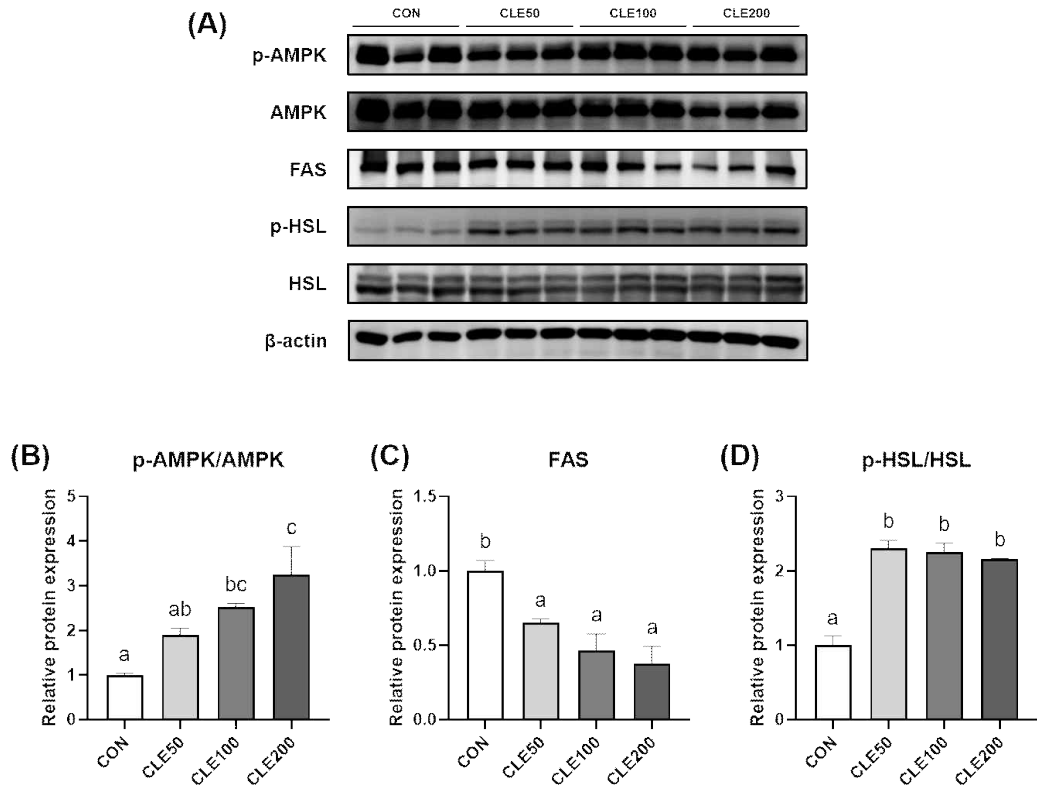


Figure 30. Effect of CLE on protein expression in 3T3-L1 cells

(A) The expression of protein was performed using western blot. The ratios of (B) p-AMPK/AMPK and (D) p-HSL/HSL were indicated and the expression level of (C) FAS protein were normalized to β -actin. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; CLE, *Colocasia esculenta* leaves extract treated group.

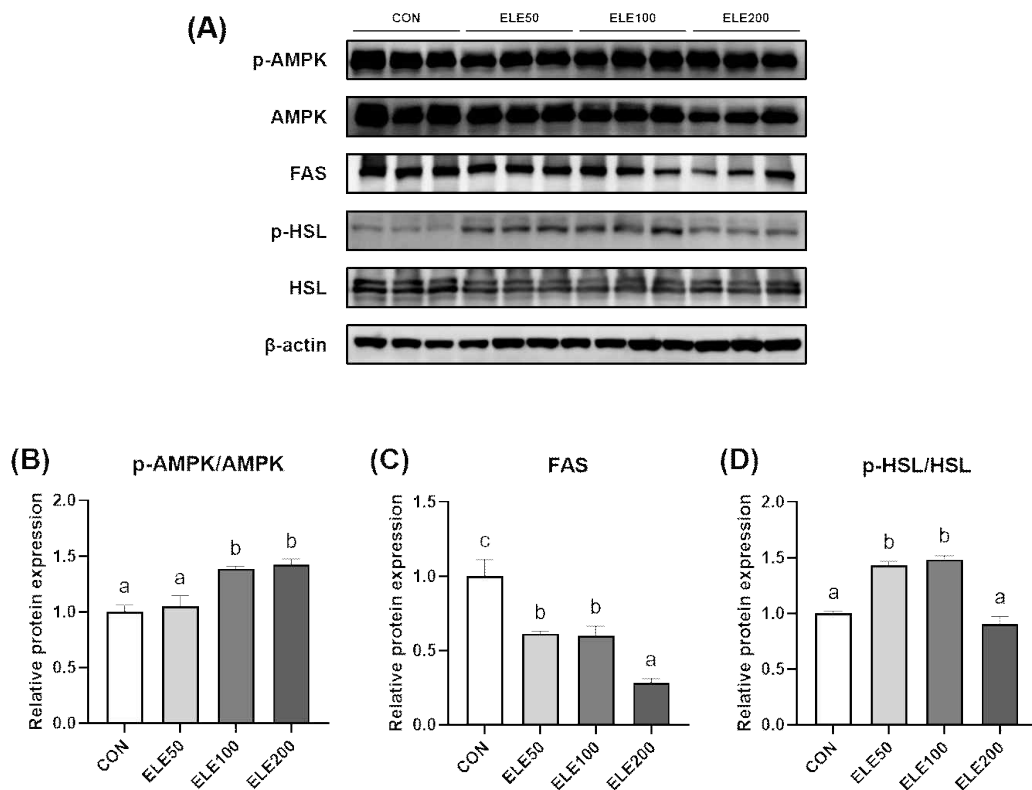


Figure 31. Effect of ELE on protein expression in 3T3-L1 cells

(A) The expression of protein was performed using western blot. The ratios of (B) p-AMPK/AMPK and (D) p-HSL/HSL were indicated and the expression level of (C) FAS protein were normalized to β -actin. Data are presented mean \pm standard error mean (n = 3). (a, b) Means that do not have a common letter are significantly different among the CON treatment groups at a significance level of $P < .05$, as determined by Duncan's multiple range test. CON, 1 μ M DEX, 0.5 μ M IBMX and 10 μ L/mL insulin treated group; ELE, *Eutrema japonicum* leaves extract treated group.

제4장 고찰 및 결론

근감소증은 근육 단백질의 분해와 합성의 불균형으로 근육량이 감소되면서 유발된다. 근감소증은 생리학적 혹은 병리학적 이유로 발병될 수 있으며 최근 2017년 WHO에서 근감소증 관련 코드까지 제정되며 심각성이 증가되었다[16]. 하지만 근감소증의 예방 및 치료제가 없는 바 근감소증 관련 연구가 필요하다.

글루코코르티코이드는 여러 의학적 치료제로 사용되는 약물이며 또한 패혈증, 악액질, 기아 등의 상태에서 방출되는 내분비 호르몬이다. 하지만 글루코코르티코이드는 골격근 위축 혹은 감소를 일으킬 수 있다[36]. 글루코코르티코이드계 약물 중 하나인 Dexamethasone(DEX)은 다발성 경화증, 알레르기, 뇌부종, 염증 및 쇼크, 천식 등의 치료제로서 사용되고 있지만, DEX가 근감소 및 근육위축을 유발한다는 것은 잘 알려져 있으며 실험에서 근육위축을 유발하는데 사용된다[37, 38].

본 연구에 사용된 토란과 와사비잎은 선행연구에서 항염증 효과를 보인 바 있다[2, 13]. 근감소증을 유도하는 병리학적 질병들의 원인은 대부분 염증과 관련이 있으며, 이는 근감소증과 염증이 밀접하게 관련되어 있음을 시사한다[39]. 이에 본 연구에서는 토란 구근, 토란잎 그리고 와사비잎의 주정 추출물이 C2C12 세포에서의 근감소증 예방 효과를 확인하기 위해 관련 효능 및 메커니즘을 분석하였다.

근육위축과 관련된 연구에서 DEX 처리 시 C2C12 세포의 근관이 감소되는 것으로 나타났다[40, 41]. 본 연구에서 역시 C2C12 세포에 DEX를 투여했을 때, 근관이 유의하게 감소하였고, CRE, CLE, ELE를 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 처리한 그룹에서는 근관의 직경이 DEX 그룹보다 유의적으로 크게 나타났다(Figure 4). 이는 DEX가 근육위축을 유발하였고 DEX와 추출물을 함께 처리한 그룹에서는 근육위축이 개선된 것으로 판단된다.

여러 연구에서 DEX가 분화된 근관에서 FoxO 계열을 조절하여 근육 특이적 ubiquitin-E3 ligase인 Atrogin-1 및 MuRF1의 발현을 증가시켜 C2C12 근관의 근육위축을 유도한다고 밝혀져 있다[42]. 반면 Myod 계열(Myod, Myogenin, Myf5 and MRF4)인 myogenic 조절 인자는 C2C12 세포에서 골격근 형성 및 분화를 활성화하며, Myo D와 Myf5는 분화 초기 단계에서 Myogenin과 MRF4는 후기 분화와 근관형성을 담당한다[43, 44]. 또한 이전 연구에서 IGF-1/AKT/mTOR pathway를 통해 MHC의 발현이 조절되고, mTOR의 활성화가 4E-BP1과 P70S6K1의 인산

화를 조절하여 단백질 합성을 조절한다는 사실이 입증되었다[45].

본 연구에서 CRE 처리 시 mRNA 발현 수준에서 *Mhc*의 발현이 CRE 처리 그룹에서 DEX 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다. 또한 *Myod*와 *Myogenin*은 CRE 처리 시 증가하였다(Figure 5). 반면 근육 단백질 분해를 조절하는 *Trim63*과 *Fbxo32*의 발현은 DEX 그룹이 CON 그룹에 비해 유의적으로 증가하였지만, CRE 처리 그룹과는 차이를 보이지 않았다(Figure 6). 단백질 발현 수준에서는 Myo D와 *Myogenin*의 발현이 그룹 간의 차이를 보이지 않았다(Figure 11). 이는 유전자 발현 수준이 여러 이유에 의해 단백질 발현까지 이어지지 않았거나 혹은 Myo D와 *Myogenin*은 근관분화 초기에 발현이 상향조절 되는 인자이므로 발현이 증가하지 않았음을 추측할 수 있다[44, 46]. 이에 반해 MHC, 4E-BP1과 P70S6K1의 인산화는 CRE 처리 그룹이 DEX 그룹에 비해 증가하였다(Figure 11, 12). FoxO3의 인산화가 CRE100 그룹에서 유의적으로 증가하였고, 이에 따라 Atrogin-1, MuRF1의 단백질 발현 수준은 CRE 처리 시 DEX 그룹에 비해 감소하였다(Figure 13).

CLE 처리 시 mRNA 발현 수준에서 *Trim63*과 *Fbxo32*의 발현은 CON 그룹에 비해 DEX 그룹에서 유의적으로 증가하였고, CLE 처리시 감소하였다(Figure 8). 단백질 발현에서 역시 CLE 처리 시 Atrogin-1과 MuRF1의 발현이 감소하였다. FoxO3의 인산화는 CLE200 처리 시 증가하였다(Figure 15). 역시 Foxo3에 의해 Atrogin-1과 MuRF1의 발현이 조절되었다. 4E-BP1과 P70S6K1의 인산화가 DEX에서 감소하고 CLE200 처리 시 증가하였다(Figure 14).

ELE 처리 시 ELE200 그룹에서 *Trim63*과 *Fbxo32*의 mRNA 발현이 DEX 그룹에 비해 유의적으로 감소했다(Figure 10). Atrogin-1과 MuRF1의 단백질 발현이 CON 그룹에 비해 DEX 그룹이 유의적으로 증가하고, ELE의 처리 시 감소하였다. 이는 상위기전의 FoxO3의 인산화가 증가함으로써 Atrogin-1과 MuRF1의 발현이 조절되었음을 확인하였다(Figure 17). 또한 *Mhc*의 mRNA 발현이 ELE 처리 시 증가하였고, 단백질 발현 역시 상향조절 되었다(Figure 9, Figure 16). 4E-BP1, P70S6K1의 인산화가 DEX 그룹에 비해 ELE 처리 시 증가하였다(Figure 16).

mRNA와 단백질 발현을 확인한 결과, CRE, CLE, ELE의 일부농도에서 C2C12 세포에서 FoxO3의 인산화를 증가시켜 Atrogin-1과 MuRF1의 발현을 조절하여 단백질 분해를 억제하고, 4E-BP1과 P70S6K1의 인산화를 증가시켜 단백질 합성을 증가시켜 DEX 유발 근육위축을 예방시켰음을 시사한다.

본 연구를 통해 토란 구근과 잎, 그리고 와사비 추출물이 각각 근육세포의 분화,

단백질 분해와 합성에 미치는 영향을 확인했다. 그러나 본 연구에 한계점은 단백질 합성의 상위기전에 대한 연구가 필요하다는 것이다. 또한 단백질 분해를 촉진하는 다른 자가포식 시스템과 같은 경로에 대한 연구가 필요하다. 하지만 CRE, CLE, ELE가 근육 단백질 분해에서 중요한 UPS 경로를 조절한다는 점과 단백질 합성의 하위 기전을 상향조절 시켜 근육 건강 유지 및 근육위축 방지에 활용될 수 있는 가능성을 제시했다는 점에서 중요한 연구 결과로 해석될 수 있다.

비만은 제2형 당뇨병, 이상지질혈증, 고혈압, 심장질환의 주요 위험요소이며 이는 수명을 단축시킬 위험이 있다. 비만 관련 의료비 증가에 의한 소득의 손실 역시 문제이다[47]. 비만 치료제의 장기 치료 시 효능과 안전성에 대한 끊임없는 논란이 있다. 이에 천연물의 화학물질이 지방의 분해를 억제하는 생물학적 활성을 갖는 잠재적인 물질로서 꾸준한 연구가 진행되고 있다[48, 49]. 지방조직은 지방세포의 비대 또는 새로운 지방세포 형성으로 지방량이 증가하며 이는 비만과 밀접하게 관련된다. 따라서 지방세포가 증식하는 매커니즘을 파악하는 것은 중요하다[50]. 이에 따라 토란 구근, 토란잎 그리고 와사비잎의 주정 추출물이 3T3-L1 지방세포의 분해를 억제하는 항비만 효과에 대한 가능성을 입증하기 위해 본 연구를 수행하였다.

지질 축적량을 확인한 결과 CRE, CLE, ELE를 처리 시 모든 그룹에서 CON 그룹 대비 감소한 결과를 보였다(Figure 19). 이는 선행연구와 동일하게 CRE, CLE, ELE가 지질축적을 감소시켜 지방세포 분화동안 지방생성이 억제되었음을 확인할 수 있다[51]. 지질축적의 감소는 지방생성 억제 혹은 지질분해 촉진에 의해 조절될 수 있으며, 비만 연구 시 이와 관련 매커니즘의 확인이 필요하다. 지방생성은 PPAR γ 및 C/EBP α 과 같은 여러 전사인자에 의해 조절된다. 특히 PPAR γ 는 고지방식에 의해 유도된 지방세포 분화 및 비대를 유도하고 인슐린 저항성을 발생시킨다고 확인되었다[52]. 또한 PPAR γ , C/EBP α 는 FAS, ACC, aP2 및 LPL과 같은 지방 조직에서 지방합성에 관여하는 전사인자를 조절한다. FAS와 ACC는 지방산을 합성하는데 중요한 역할을 한다[53]. SREBP1c가 증가되면 FAS, ACC와 같은 유전자들이 활성화되며, SREBP1c는 AMPK에 의해 발현이 억제된다. AMPK의 활성화는 간, 지방 조직, 근육 등 다양한 조직의 경로에서 유전자의 인산화 및 조절에 관여한다. 또한 AMPK는 지방분해를 조절하기도 하는데 AMPK의 인산화 증가는 ACC를 비활성화 하고 CPT1 활성화시킴으로써 β -oxidation을 촉진한다[50, 54]. 지방분해에서 TG가 분해되는 과정은 비만을 감소시키는데 중요하다. ATGL, HSL,

MGL의 발현 증가는 지방세포에서 TG를 분해하여 유리지방산과 글리세롤로 가수 분해시킨다[55].

본 연구에서 CRE 처리 시 lipolysis를 조절하는 *Pnpla2*와 *Lipe*의 유전자 발현이 CON 그룹에 비해 증가하였고 단백질 발현도 증가하였으며(Figure 21, 29). 또한 AMPK의 인산화도 증가되었다. 하지만 FAS의 발현에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Figure 29). 이를 통해 CRE는 주로 지방분해 촉진을 통해 지방형성을 억제하는 것으로 판단된다.

CLE 처리 시 *CPT1*, *Pnpla2*와 *Lipe*의 mRNA 발현이 증가하였다(Figure 24). 또한 단백질 발현에서도 AMPK와 HSL의 인산화가 증가하였다. 반면 FAS의 발현은 감소하였다(Figure 30). 이를 통해 CLE가 AMPK를 활성화시켜 지방분해를 촉진하고 지방합성을 억제하는 것으로 나타났다. .

ELE 처리 시 ELE 200 µg/mL을 처리한 그룹에서 *CPT1*의 mRNA가 증가하였고, *Pnpla2*와 *Lipe*의 mRNA가 증가하였다. 단백질 발현은 50 µg/mL과 100 µg/mL 그룹에서 HSL의 인산화가 증가하였다. AMPK는 ELE 100µg/mL와 ELE 200µg/mL 그룹에서 활성화되었으며, FAS의 발현은 ELE 처리 시 감소하였다. 이를 통해 ELE의 일부 농도에서 지방분해가 증가하고 지방생성이 억제된 것을 확인하였다.

mRNA와 단백질 발현을 확인한 결과, 토란 구근, 토란잎 그리고 와사비잎의 추출물이 3T3-L1에서 TG를 분해하는 HSL의 인산화를 증가시켜 지방분해를 증가시켰으며, 특히 토란잎과 와사비잎은 지방산을 합성하는 FAS의 발현을 감소시켜 지방합성을 억제시켰다. 또한 세 가지 추출물 모두 AMPK를 활성화시키는 것으로 나타났다. 선행연구에서 AMPK와 HSL의 상관관계를 밝혔으며 부분적으로 조절될 수 있음을 확인했다[54]. 그러나 AMPK가 활성화됨에 따른 다양한 하위 기전들에 대한 추가연구를 통해 메커니즘 규명이 필요하다. 그럼에도 불구하고 세 가지 추출물이 에너지 대사 및 지질대사에서 핵심적인 역할을 하는 AMPK를 활성화시켰고, 지방생성 억제 및 지방분해 증가를 통해 항비만 기능성 소재로서의 가능성을 제시하였다.

본 연구는 국내에서 재배하는 천연물인 토란과 와사비를 활용하여 근감소 및 비만 개선을 위한 소재를 발굴하고자 하였다. 세 가지 천연물의 특정 농도에서 근육세포의 단백질 합성 증가와 단백질 분해 감소를 확인하였다. 또한 토란잎과 와사비잎 추출물은 지방생성을 억제하고, 토란 구근, 토란잎과 와사비잎의 추출물이 지방분해를 증가시키는 것으로 나타나 이들 추출의 근감소 개선 및 비만 개선 효능을

확인할 수 있었다. 결론적으로 본 연구를 통해 도출된 결과는 향후 동물실험 및 임상 시험의 기초자료로 활용될 수 있으며 근감소 예방과 항비만의 기능성 소재로서의 가능성을 제시한다. 그러나 본 연구는 세포실험을 통해 얻어진 결과이므로, 토란 구근, 토란잎, 그리고 와사비잎 추출물의 실제 효능과 안전성을 확인하기 위해서는 추가적인 실험이 요구된다.

제5장 참고문헌

1. RASHMI, D. R., et al. Taro (*Colocasia esculenta*): an overview. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 2018, 6.4: 156-161.
2. TAEJIN, P. A. R. K., et al. Anti-inflammatory Effect of *Colocasia esculenta* Biorenovate Extract in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. *한국생물공학회 학술대회*, 2021, 387-387.
3. QUACH, My Le, et al. Cell wall compositions of raw and cooked corms of taro (*Colocasia esculenta*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2001, 81.3: 311-318.
4. CHO, Hyeyoung; KANG, Kyoungah. Effects of taro extract on brain resilience in in vitro Parkinson's disease model induced by 6-hydroxydopamine. *Journal of Korean Biological Nursing Science*, 2020, 22.4: 223-231.
5. MOON, Ji-Hye, et al. Anti-obesity and hypolipidemic activity of taro powder in mice fed with high fat and cholesterol diets. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 2010, 42.5: 620-626.
6. SULTANA, Tamanna; SAVAGE, Geoffrey P. Wasabi-Japanese Horseradish. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 2008, 43.4: 433-448.
7. DUFOUR, Virginie; STAHL, Martin; BAYSSE, Christine. The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology*, 2015, 161.2: 229-243.
8. HECHT, Stephen S. Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug metabolism reviews*, 2000, 32.3-4: 395-411.

9. DOS SANTOS SZEWCZYK, Katarzyna, et al. Chemical composition of extracts from leaves, stems and roots of wasabi (*Eutrema japonicum*) and their anti-cancer, anti-inflammatory and anti-microbial activities. *Scientific Reports*, 2023, 13.1: 9142.
10. UTO, Takuhiro, et al. Molecular mechanisms underlying anti-inflammatory actions of 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate derived from wasabi (*Wasabia japonica*). *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2012, 2012.
11. MORIMITSU, Yasujiro, et al. Antiplatelet and anticancer isothiocyanates in Japanese domestic horseradish, wasabi. *Mechanisms of ageing and development*, 2000, 116.2-3: 125-134.
12. SHIN, Il Shik; MASUDA, Hideki; NAOHIDE, Kinae. Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94.3: 255-261.
13. YOSHIDA, Shuhei, et al. Component analysis of wasabi leaves and an evaluation of their anti-inflammatory activity. *Food Science and Technology Research*, 2015, 21.2: 247-253.
14. OGAWA, Tetsuro, et al. Suppressive effect of hot water extract of wasabi (*Wasabia japonica* Matsum.) leaves on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Food chemistry*, 2010, 118.2: 239-244.
15. DING, Shengguang, et al. An overview of muscle atrophy. *Muscle Atrophy*, 2018, 3-19.
16. POWERS, Scott K.; KAVAZIS, Andreas N.; DERUISSEAU, Keith C.

- Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2005, 288.2: R337-R344.
17. GUMUCIO, Jonathan P.; MENDIAS, Christopher L. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. *Endocrine*, 2013, 43: 12-21.
 18. YIN, Lin, et al. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. *Pharmacological research*, 2021, 172: 105807.
 19. GLASS, David J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nature cell biology*, 2003, 5.2: 87-90.
 20. MCKINNELL, Iain W.; RUDNICKI, Michael A. Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell*, 2004, 119.7: 907-910.
 21. YOON, Mee-Sup. mTOR as a key regulator in maintaining skeletal muscle mass. *Frontiers in physiology*, 2017, 8: 788.
 22. CHEN, Jianling; ALBERTS, Ian; LI, Xiaohong. Dysregulation of the IGF-I/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in autism spectrum disorders. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2014, 35: 35-41.
 23. BLÜHER, Matthias. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019, 15.5: 288-298.
 24. JU, Jae-Hyun, et al. Anti-obesity and antioxidative effects of purple sweet potato extract in 3T3-L1 adipocytes in vitro. *Journal of medicinal food*, 2011, 14.10: 1097-1106.
 25. SARJEANT, Kelesha; STEPHENS, Jacqueline M. Adipogenesis. *Cold Spring*

- Harbor perspectives in biology, 2012, 4.9: a008417.
26. ALI, Aus Tariq, et al. Adipocyte and adipogenesis. *European journal of cell biology*, 2013, 92.6-7: 229-236.
 27. ZECHNER, Rudolf, et al. Lipolysis: pathway under construction. *Current opinion in lipidology*, 2005, 16.3: 333-340.
 28. ZECHNER, Rudolf, et al. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of lipid research*, 2009, 50.1: 3-21.
 29. FREDRIKSON, Gudrun; TORNQVIST, Hans; BELFRAGE, Per. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochimica et biophysica acta (bba)-lipids and lipid metabolism*, 1986, 876.2: 288-293.
 30. LEE, Ho Seon, et al. Naringin promotes fat browning mediated by UCP1 activation via the AMPK signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Pharmacal Research*, 2023, 46.3: 192-205
 31. ZHAO, Weidong, et al. Testosterone protects against dexamethasone-induced muscle atrophy, protein degradation and MAFbx upregulation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2008, 110.1-2: 125-129.
 32. WRIGHT, Suzanne M.; ARONNE, Louis J. Causes of obesity. *Abdominal Radiology*, 2012, 37: 730-732.
 33. HILL, James O., et al. Obesity and the environment: where do we go from here?. *Science*, 2003, 299.5608: 853-855.
 34. BRAY, George A. Medical consequences of obesity. *The Journal of clinical*

- endocrinology & metabolism, 2004, 89.6: 2583-2589.
35. VAN DER MEIJDEN, K., et al. Effects of 1, 25 (OH) 2D3 and 25 (OH) D3 on C2C12 myoblast proliferation, differentiation, and myotube hypertrophy. *Journal of Cellular Physiology*, 2016, 231.11: 2517-2528.
 36. SCHAKMAN, Olivier, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2013, 45.10: 2163-2172.
 37. SON, Young Hoon, et al. Dexamethasone downregulates caveolin-1 causing muscle atrophy via inhibited insulin signaling. *J Endocrinol*, 2015, 225.1: 27-37.
 38. JOHNSON, Donavon B.; LOPEZ, Michael J.; KELLEY, Brendan. *Dexamethasone*. 2018.
 39. JI, Yanan, et al. Inflammation: Roles in skeletal muscle atrophy. *Antioxidants*, 2022, 11.9: 1686.
 40. SCHAKMAN, Olivier, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2013, 45.10: 2163-2172.
 41. SON, Young Hoon, et al. Sulforaphane prevents dexamethasone-induced muscle atrophy via regulation of the Akt/Foxo1 axis in C2C12 myotubes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 95: 1486-1492.
 42. KIM, Jonggun, et al. Cortisone and dexamethasone inhibit myogenesis by modulating the AKT/mTOR signaling pathway in C2C12. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80.11: 2093-2099.

43. FERRI, Paola, et al. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *Journal of cellular biochemistry*, 2009, 108.6: 1302–1317.
44. DEDIEU, Stephane, et al. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *International Journal of Developmental Biology*, 2002, 46.2: 235–241.
45. WYATT, Sharon B.; WINTERS, Karen P.; DUBBERT, Patricia M. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *The American journal of the medical sciences*, 2006, 331.4: 166–174.
46. GREENBAUM, Dov, et al. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome biology*, 2003, 4.9: 1–8.
47. WYATT, Sharon B.; WINTERS, Karen P.; DUBBERT, Patricia M. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *The American journal of the medical sciences*, 2006, 331.4: 166–174.
48. ANDERSEN, Charlotte, et al. Phytochemicals and adipogenesis. *Biofactors*, 2010, 36.6: 415–422.
49. DEROSA, Giuseppe; MAFFIOLI, Pamela. Anti-obesity drugs: a review about their effects and their safety. *Expert opinion on drug safety*, 2012, 11.3: 459–471.
50. CHANG, Eugene; KIM, Yangha. Vitamin D decreases adipocyte lipid storage and increases NAD-SIRT1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Nutrition*, 2016,

32.6: 702-708.

51. KIM, Se-Kwon; KONG, Chang-Suk. Anti-adipogenic effect of dioxinohydroeckol via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes. *Chemico-biological interactions*, 2010, 186.1: 24-29.
52. KADOWAKI, Takashi, et al. The role of PPAR γ in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Journal of diabetes and its complications*, 2002, 16.1: 41-45.
53. KIM, Ji Hye, et al. Anti-obesity effect of extract from fermented *Curcuma longa* L. through regulation of adipogenesis and lipolysis pathway in high-fat diet-induced obese rats. *Food & nutrition research*, 2016, 60.1: 30428.
54. FANG, Ke, et al. Diosgenin ameliorates palmitic acid-induced lipid accumulation via AMPK/ACC/CPT-1A and SREBP-1c/FAS signaling pathways in LO2 cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 2019, 19: 1-12.
55. JIANG, Dongqing, et al. Berberine increases adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes through the AMPK pathway. *Lipids in health and disease*, 2016, 15.1: 1-8.