

## Inhibitory Effects of *Rubus crataegifolius* Leaf Water Extract on Adipocyte Differentiation and Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes

Mee-Kyung Kim\*

\*Professor, Dept. of Bio-Cosmetic Science, Seowon University, Chungbuk, Korea

### [Abstract]

In this study, we examined the effects of *Rubus crataegifolius* leaf on the inhibition of differentiation and adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes to confirm their potential for use as an anti-obesity functional material. *Rubus crataegifolius* leaves water extracted using hot water were then concentrated for use, with an extract yield of 4.76%. The result of measuring the rate of 3T3-L1 cell survival of *Rubus crataegifolius* leaf extract (RCLE) showed growth inhibition of 13% at a concentration of 1,000  $\mu\text{g/mL}$ . Thus, in this study, experiments were performed using RCLE treatment concentrations up to 500  $\mu\text{g/mL}$ . Production of triglyceride in 3T3-L1 cells showed a dose-dependent decrease, and the rate of reduction was 28.7, 40.8, and 51.6% at concentrations of 100, 300, and 500  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, compared to the control group. In addition, the results confirmed that suppression of lipogenesis was achieved by suppressing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ), CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EBP  $\alpha$ ), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase (ACC), and increasing the expression of p-activated protein kinase (p-AMPK). Based on these results, it is believed that *Rubus crataegifolius* leaf extract can be used in the effort to manage obesity by regulating factors related to adipocyte differentiation and adipogenesis.

▶ **Key words:** Adipocytes differentiation, Adipogenesis, Anti-obesity, *Rubus crataegifolius* leaf, 3T3-L1

### [요 약]

본 연구에서는 산딸기 잎의 항비만 기능성 소재로서의 가능성을 확인하기 위하여 3T3-L1 지방 전구세포에 산딸기 잎 추출물을 처리한 후 중성지방 함량을 측정하고 지방생성과 관련된 여러 단백질의 발현 양상을 측정하였다. 산딸기 잎은 열수로 추출·농축하여 시료로 사용하였으며 추출물의 수율은 4.76%였다. 산딸기 잎 추출물에 의한 3T3-L1 세포 생존율을 측정한 결과, 1,000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 13%의 성장 저해를 확인할 수 있었다. 이에 본 연구에서 시료 처리 농도를 500  $\mu\text{g/mL}$ 까지 처리하여 실험을 진행하였다. 세포 내 중성지방의 생성은 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 감소율은 대조군에 비하여 농도 100, 300, 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 28.7, 40.8, 51.6%를 나타내었다. 또한 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 SREBP-1c, FAS 및 ACC의 발현 억제, p-AMPK 발현 증가로 지방합성이 억제되는 것을 확인하였다. 이상의 결과, 산딸기 잎 추출물이 지방세포 분화 및 지방생성 관련 인자들을 조절함으로써 비만 개선 소재로서의 활용이 가능할 것으로 판단된다.

▶ **주제어:** 지방세포분화, 지방생성, 항비만, 산딸기잎, 3T3-L1

- First Author: Mee-Kyung Kim, Corresponding Author: Mee-Kyung Kim
- \*Mee-Kyung Kim (kim5179@hanmail.net), Dept. of Bio-Cosmetic Science, Seowon University
- Received: 2023. 12. 29, Revised: 2024. 01. 22, Accepted: 2024. 01. 22.

## I. Introduction

서구화된 식습관과 영양소의 과다 섭취로 인해 에너지 불균형이 생겨 비만 인구가 꾸준히 증가하고 있다. 비만은 신체 활동과 성장에 필요한 에너지 요구량을 초과하는 칼로리 섭취로 인해 과도한 지방이 체내에 축적되는 상태로 서[1] 단순히 체중만 증가시키는 것이 아니라 심혈관계 질환, 당뇨병, 동맥경화증, 지방간 등의 2차적인 질환을 유발시키는 원인이 되기 때문에 전세계적으로 건강상 문제로 대두되고 있다[2-5]. 비만 발생은 지방전구세포가 지방세포로 분화(adipogenesis)되는 과정에서 생성되는 지방세포의 과잉분화와 비대에 의한 지방의 과잉축적으로 지방세포의 수나 크기의 증가에 의한 것으로 알려져 있다[6-8]. 지방세포의 과잉분화는 세포 증식 및 분화에 의한 것이고 지방세포의 비대는 지방의 축적에 의한 것이다. 지방세포의 분화를 조절하는 전사인자는 Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), peroxisome dine-adenosine-adenosine-thymidine (CCAAT) /enhancer-binding protein family (C/EBP  $\alpha$ , C/EBP $\beta$  및 C/EBP $\delta$ ) 및 sterol controlled element-binding protein-1c (SREBP-1c)이다[9], 이들은 생성 관련 유전자의 발현을 유도하고 fatty acid synthase (FAS) 및 acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 같은 지방산 생성 효소의 활성을 촉진한다. 활성화된 FAS 및 ACC는 malonyl CoA를 생산하여 지방산 합성을 촉진하고 이로 인해 중성지방의 축적을 초래하며 이 모든 과정은 전지방세포를 지방세포로 분화하는데 기여한다[10]. 따라서 비만 예방 및 치료를 위해서는 지방전구세포 분화 관련 전사인자, 지방생성 및 분해 관련 효소들의 활성을 조절하는 것이 중요하다고 할 수 있다.

현대인은 비만 치료를 위해 운동이나 식이조절을 하기 보다는 음식물 흡수 억제제, 식용 억제제와 같은 비만치료제를 주로 이용하고 있다. 그러나 비만치료제의 경우 복통, 불안, 변비, 두통 등의 부작용이 발생되므로 안전성이 입증된 치료제 개발이 필요한 실정이다[11]. 이에 천연물 소재를 이용한 안전한 비만 예방 및 치료를 위한 약물 연구가 활발히 진행되고 있다[12-15].

산딸기(*Rubus crataegifolius*)는 한국, 중국 북동부, 일본 및 러시아 지역에서 널리 자라는 나무딸기의 일종이며 수년 동안 류마티스 관절염, 간염의 치료에 사용되었다[16]. 열매의 경우는 전통적으로 발기 부전, 야뇨증, 정자 변증 및 천식의 치료제로 사용되었고[17], 뿌리의 경우는 항산화, 항암, 항염증, 항균과 같은 다양한 약리적 효과가

있어 만성 간염 및 류마티스 관절염 치료에 사용되었다[18]. 산딸기에는 phenolic acids, triterpenoids, flavonoids, ellagitannin 등 다양한 생리활성 화합물과 anthocyanins, epicatechin, ellagic acid, ferulic acid 등의 항산화제가 주된 성분으로 함유되어 있다[19]. 최근 보고된 바에 의하면 산딸기에서 추출한 ellagic acid는 helicobacter pylori에 의한 위염 치료에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다[20].

따라서 본 연구에서는 식용되지 않고 있는 산딸기 잎의 항비만 기능성 소재로서의 가능성을 확인하기 위하여 3T3-L1 전구지방세포를 이용하여 지방세포 분화 억제 및 분화 관련 전사인자 발현 억제, 지방생성 및 분해 관련 효소 발현 조절에 관한 연구를 수행하였다.

## II. Methods

### 1. Sample preparation

본 실험에 사용한 산딸기 잎은 경북 포항에서 구입하여 저온(4°C)에 보관하면서 사용하였다. 산딸기 잎 추출물은 시료 중량에 증류수를 10배(w/v)가 되게 첨가하여 100°C에서 3시간 동안 환류냉각 추출하여 상등액을 여과하였으며, 동일 조작을 3회 반복하여 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 2)를 이용하여 여과한 후 그 여액을 감압 농축기(Rotary Vacuum Evaporator, N-100, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하여 동결건조하였다. 이를 산딸기 잎 열수 추출물(RCLE, *Rubus crataegifolius* leaf water extract)로 명명하고, 냉동실(-20°C)에서 보관하면서 실험에 사용하였고 시료의 수율은 4.76%였다.

### 2. 3T3-L1 cell culture and differentiation induction

3T3-L1 (mouse embryonic fibroblast cellline)는 지방전구세포는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 분양 받아서 사용하였다. 세포 배양은 100 U/mL penicillin/streptomycin (P/S, Thermo, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, USA)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, USA) 배지를 배양액으로 하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건하에서 배양하였다. 분화를 유도하기 위하여 3T3-L1 지방전구세포를 6-well에 1×10<sup>5</sup> cells/well 분주한 후 confluent 될 때까지 배양한 후, MDI solution (0.5 mM IBMX, 1  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/mL insulin)과 10% FBS를 첨

가한 DMEM 배지에 시료 RCLE를 농도별로 함께 처리하여 2일간 배양하였다. 분화 유도 2일 후에 RCLE, 10 µg/mL insulin과 10% FBS를 포함한 DMEM 배지로 교체하여 3일간 배양하였으며 그 후에는 RCLE, 1% P/S과 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 2일마다 교체해주어 세포를 분화시켜 총 8일간 배양하였다[21].

### 3. Cell toxicity

세포 독성은 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI)를 사용하여 측정하였다. 96-well plate에 3T3-L1 지방전구 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주한 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건 하에서 24시간 배양한 다음 RCLE를 농도별(5, 10, 50, 100, 300, 500, 1000 µg/mL)로 처리하고 24시간 배양하였다. 그 후 CellTiter 96® AQueous One Solution 용액을 20 µL를 각 well에 분주하여 1시간 반응시켜 490nm에서 흡광도를 측정하였다[22].

### 4. Measurement of fat content

3T3-L1 지방전구세포를 8일 동안 분화시킨 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 10% formaldehyde를 사용하여 실온에서 60분간 고정한 후 60% isopropanol을 이용하여 세척한 다음 Oil Red O 용액을 처리하여 실온에서 염색하였다. 염색 후에 100% isopropanol을 사용하여 세포를 용해시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다[23].

### 5. Measurement of adipogenesis-related protein expression

RCLE의 처리에 따른 지방세포 분화 관련 분자인 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , SREBP-1c, FAS 및 ACC (Cell signaling, USA)의 단백질 발현과 AMPK, MAPKs, NF- $\kappa$ B (Cell signaling, USA)의 인산화를 확인하기 위하여 western blot analysis를 실시하였다. RCLE를 처리하여 8일간 분화한 3T3-L1 지방전구세포는 배지를 제거한 뒤 PBS로 세척하여 lysis buffer (10 mM pH 7.4 Tris-HCl, 5 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA)를 표준화한 Bio-Rad protein assay kit를 사용하였다. 단백질을 정량한 뒤 10% SDS-PAGE에서 전기영동하여, membrane으로 transfer하여 1시간 동안 5% skim milk에 blocking 하였다. Blocking 후에 1차 항체를 1시간 반응시키고 HRP가 결합된 2차 항체로 반응시킨 다

음, chemiluminescence substrate kit (Amershm, UK)로 결과를 확인하였다[24].

### 6. Data Analysis

본 실험의 모든 통계분석은 GraphPad Prism5 (GraphPad Software, USA)를 이용하여 시행하였다. 실험별 평균±표준편차(Mean±SD)를 표시하고, 각 실험군 내에 차이를 비교하기 위해 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 시행하였다. 사후분석은 Tukey 법을 사용하였으며, 통계적 유의성 검증은 신뢰수준 P<0.05로 설정하였다.

## III. Research Results

### 1. Confirmation of cell cytotoxicity

세포 독성 평가는 일반적으로 세포의 증식과 생존율을 알아보는 것으로서 MTT tetrazolium이 탈수소 효소 작용에 의해 formazan으로 환원되는 정도를 측정하는 MTT 분석법으로 주로 사용한다[25]. 이에 본 연구에서도 산딸기 잎 추출물(RCLE)의 농도별 처리에 따른 3T3-L1 지방전구세포에 미치는 세포 독성 여부를 알아보기 위해 MTT 분석법으로 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 RCLE을 5~1,000 µg/mL 농도로 처리하였을 때, 1,000 µg/mL 농도에서 13%의 성장 저해를 확인할 수 있었다. 이에 본 연구에서 시료 처리 농도를 500 µg/mL까지 처리하여 실험을 진행하였다.

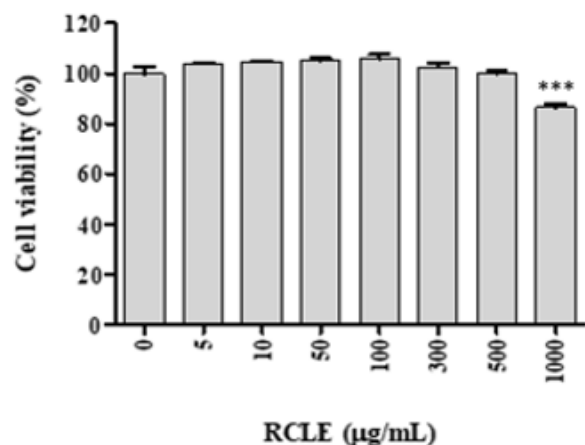


Fig. 1. Effect of RCLE on 3T3-L1 cell viability. Cell viability was determined using the proliferation kit. Cell was treated with RCLE at various concentrations (5, 10, 50, 100, 300, 500, 1000 µg/mL) for 24 h. Values are expressed as a mean ± standard error of three independent experiments. \*\*\*p<0.001 as compared with differentiated control.

## 2. Inhibitory effect on triglyceride production

지방세포 내 중성지방(triglyceride)의 저장은 혈장지질 단백질(chylomicron), 초저밀도 지질단백질(very low density lipoprotein, VLDL) 등에 의해 유발되고[26], 중성지방의 축적으로 인해 지방세포내 과포화 지방구가 형성되어 비만이 유발된다[27]. 3T3-L1 지방전구세포는 여러 호르몬과 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되면서 세포 내 지방을 축적한다. 그리고 지방전구세포를 Oil red O로 염색할 경우 중성지질, cholesterol ester만이 염색되므로 세포 내 축적된 중성지방을 확인할 수 있다. 지방전구세포에 축적된 중성지방 염색이 가능하다[28].

3T3-L1 지방전구세포 내 중성지방 생성에 미치는 RCLE의 영향을 알아보기 위해 Oil Red O로 염색된 지방구를 isopropanol로 처리하여 염색액을 추출하여 중성지방의 함량을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 RCLE를 100, 300, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 처리하였을 때 지방세포에 중성지방 축적은 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 감소율은 대조군에 비하여 각각 28.7, 40.8, 51.6 %이었다. 또한 지방세포 내에 중성지방의 함량이 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 산딸기 에탄올 추출물을 처리한 3T3-L1 지방전구세포와 투여한 동물 실험에서 중성지방의 함량이 대조군에 비해 유의적인 감소를 나타낸 결과[17]와 일치하는 결과를 나타내었다. 이는 딸기류의 주요 성분인 안토시아닌과 엘라지탄닌에 의해 지방 분해가 유도되어 지방 생성 억제에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[29-31]. 따라서 RCLE가 농도 의존적으로 세포 내 중성지방의 축적을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

## 3. Expression of transcription factors

지방세포 분화는 지방전구세포가 증식과 분화를 거쳐 성숙한 지방세포로 되는 과정이고 CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) family, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$ , sterol response element binding protein (SREBP)-1c 등의 발현에 의해 지방분화가 진행되어 세포내 중성지방을 축적한다[27],[32]. 이들 중에 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 는 지방세포 분화를 조절하는 핵심 전사인자이며 terminal marker의 발현을 유도하는 것으로 보고되어 있다[33]. 또한 SREBP-1c는 지방세포 분화 촉진과 지방대사 관련 유전자의 발현을 증가시켜 지방 대사를 촉진하는 인자로서 AMPK의 인산화를 통해 조절되며 지방산 합성에 관여하는 acetyl CoA carboxylase (ACC), 지방산 합성효소(FAS) 등의 발현을 조절한다[34],[35].

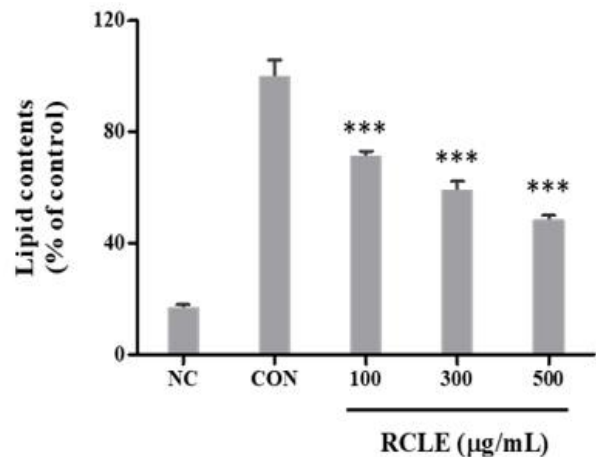


Fig. 2. Effect of RCLE on the lipid accumulation in 3T3-L1 cell.

Intracellular lipid content was stained with Oil Red O dye, and the stained oil droplets were dissolved with isopropanol and quantified by spectrophotometer analysis at 490nm. The values are expressed the same as in Fig. 1. \*\*\*p < 0.001 as compared with MDI-treated control.

따라서 본 연구에서는 RCLE가 지방전구세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  및 SREBP-1c의 단백질 발현을 western blot을 이용하여 확인하였다. 그 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 분화 유도인자인 MDI만 처리한 경우에는 C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  및 SREBP-1c의 단백질 발현이 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. RCLE를 농도별(100, 300, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리한 경우에는 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 특히, 농도 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  및 SREBP-1c의 단백질 발현은 분화처리군 대비하여 유의적으로 감소됨을 확인하였다. 이는 중성지방 생성 억제 효과와 유사한 경향을 보였고, Jung et al. [17]의 산딸기 에탄올 추출물 처리시 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 단백질 발현이 감소되었다는 결과와 일치함을 알 수 있었다. 이 외에도 김다혜 외 [36] 및 최혜영과 김건희[32]이 지방세포 분화와 관련한 전사인자의 발현이 억제되면 지방세포 분화가 억제된다는 연구보고와 일치하였다. 이상의 결과에 의하면 RCLE는 지방전구세포의 분화를 조절하는 주된 전사인자인 C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  및 SREBP-1c의 단백질 발현을 감소시켜 지방세포 내 지방생성이 감소되는 것으로 판단된다.

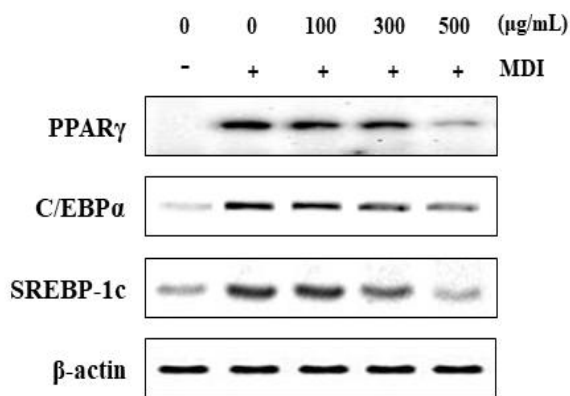


Fig. 3. Effect of RCLE on the expression of transcription factors related to adipocyte differentiation. 3T3-L1 cells were stimulated to differentiate in the presence of RCLE (100, 300 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cell lysates were prepared and subjected to western blotting to detect PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , and SREBP-1c. The  $\beta$ -actin probe served as protein-loading control.

#### 4. Inhibitory effect on enzymes related to lipogenesis

아세틸-CoA 카르복실라제(acetyl CoA carboxylase, ACC)와 지방산 합성효소(fatty acid synthase, FAS)는 지방합성에 관여하는 효소로서 지방세포 분화 관련 전사인자들에 의해 조절된다[7],[37],[38]. ACC는 지방합성과 콜레스테롤 합성에 관여하는 효소로서 ACC의 인산화 증가로 불활성화될 경우 지방합성을 억제한다[39]. FAS는 acetyl-coenzyme A와 maloyl-coenzyme A로부터 지방을 합성하고 세포 내에 지방 저장을 촉진하는 효소이다 [40]. 따라서 본 연구에서는 RCLE가 지방합성 관련 효소의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시료를 농도별로 처리한 뒤 Western bolt analysis를 통해 ACC와 FAS의 발현을 확인하였다. 그 결과 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 ACC와 FAS의 발현 양상은 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과는 RCLE가 지방세포 분화를 유도하는 전사인자들의 발현을 억제시켜 분화된 지방세포가 감소되므로 인해 지방합성에 관여하는 ACC와 FAS가 효과적으로 억제된 것으로 사료된다.

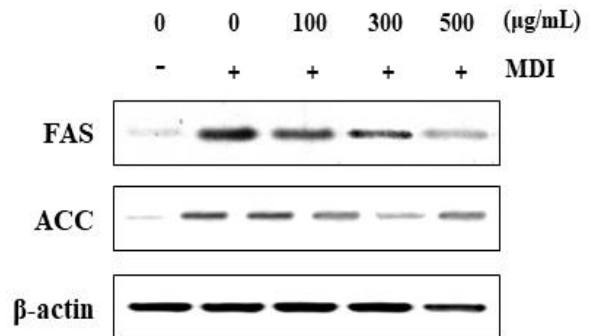


Fig. 4. Effect of RCLE on FAS and ACC expression in 3T3-L1 cells.

3T3-L1 cells were stimulated to differentiate in the presence of RCLE (100, 300 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cell lysates were prepared and subjected to western blotting to detect FAS and ACC.

#### 5. AMPK regulation related to lipogenesis and decompose

AMPK(AMP-activated protein kinase)는 신장, 폐 및 지방조직에 분포되어있는 효소로서 당과 지방의 대사에 관여하고 있다. 특히 지방세포에서는 지방분화 및 생성 전사인자들, 지방합성 관련 효소들을 제어하여 체내 지방생성과 지방분해를 조절함으로써 비만 억제와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다[41-43]. AMPK는 인산화를 통해 활성화되어 SREBP-1c, PPAR $\gamma$  및 FAS 등의 발현을 억제하여 지방합성을 억제하고, ACC의 비활성화와 carnitine palmitoyltransferase (CPT)-1의 활성화를 통해 지방산화를 촉진한다[44-46].

RCLE를 농도별로 처리한 후 3T3-L1 지방세포의 AMPK 인산화를 살펴본 결과 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 AMPK는 모든 처리구에서 거의 동일하게 발현하였으나 p-AMPK는 농도의존적으로 증가됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 RCLE이 AMPK의 인산화를 촉진하여 지방세포 분화, 지방생성 및 분해 관련된 전사인자들과 지방생성 효소들을 조절함으로써 지방의 축적을 억제하는 것으로 판단된다.



- 4, pp. 720-725, October 2003.
- [14] K. S. Lee, M. G. Kim, and N. Y. Lee, "Antimicrobial effect of the extracts of Cactus Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens", *Journal of The Korean Science and Food Science and Nutrition*, Vol. 33, No. 8, pp. 1268-1272, September 2004. DOI:10.3746/jkfn.2004.33.8.1268
- [15] J. A. Yoon, and Y. S. Son, "Effects of *Opuntia ficus-indica* complexes B (OCB) on blood glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats", *The Korean Journal Food and Nutreiton*, Vol. 22, No. 3, pp. 48-56, September 2009. DOI: <https://doi.org/10.9799/ksfan.2013.26.3.526>
- [16] W. Ni, X. Zhang, H. Bi, J. Iteku, L. Ji, C. Sun, J. Fang, G. Tai, Y. Zhou, and J. Zhao, "Preparation of a glucan from the roots of *Rubus crataegifolius* Bge. and its immunological activity", *Carbohydrate Research*, Vol. 344, No. 18, pp. 2512-2518, December 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.08.042>
- [17] M. S. Jung, S. J. Lee, Y. Song, S. H. Jang, W. Min, C. K. Won, H. D. Kim, T. H. Kim, and J. H. Cho, "*Rubus crataegifolius* Bunge regulates adipogenesis through Akt and inhibits high-fat diet-induced obesity in rats", *Nutrition & metabolism*, Vol. 13, No. 29, November 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0091-0>
- [18] Y. Sun, L. Jia, Z. Huang, J. Wang, J. Lu, and J. Li, "Hepatoprotective effect against  $\text{CCl}_4$ -induced acute liver damage in mice and High-performance liquid chromatography mass spectrometric method for analysis of the constituents of extract of *Rubus crataegifolius*", *Natural Product Research*, Vol. 31, No. 22, pp. 2695-2699, November 2017. DOI: 10.1080/14786419.2017.1292264
- [19] A. Hussain, J. S. Cho, J. S. Kim, and Y. I. Lee, "Protective effects of polyphenol enriched complex plants extract on metabolic dysfunctions associated with obesity and related nonalcoholic fatty liver diseases in high fat diet-induced c57bl/6 mice", *Molecules*, Vol. 26, No. 2, pp. 302-316, January 2021. DOI: 10.3390/molecules26020302
- [20] J. U. Park, J. S. Cho, J. S. Kim, H. K. Kim, Y. H. Jo, M. A. A. Rahman, and Y. I. Lee, "Synergistic effect of *Rubus crataegifolius* and *Ulmus macrocarpa* against *Helicobacter pylori* clinical isolates and gastritis", *Frontiers in pharmacology*, Vol. 11, No. 4, February 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00004>
- [21] S. J. Lee, J. E. Kim, Y.J. Choi, J. E. Gong, Y. J. Jin, D. W. Lee, Y. W. Choi, and D. Y. Hwang, "Anti-Obesity Effect of  $\alpha$ -Cubebenol Isolated from *Schisandra chinensis* in 3T3-L1 Adipocytes", *Biomolecules*, Vol. 11, No. 11, pp. 1650-1659, November 2021. DOI: 10.3390/biom11111650
- [22] K. Zhang, M. Han, X. Zhao, X. Chen, H. Wang, J. Ni, and Y. Zhang, "Hypoglycemic and Antioxidant Properties of Extracts and Fractions from *Polygoni Avicularis Herba*", *Molecules*, Vol. 27, No. 11, pp. 3381-3388, May 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27113381>
- [23] T. Li, L. Zhang, C. Jin, Y. Xiong, Y. Y. Cheng, and K. Chen, "Pomegranate flower extract bidirectionally regulates the proliferation, differentiation and apoptosis of 3T3-L1 cells through regulation of PPAR $\gamma$  expression mediated by PI3K-AKT signaling pathway", *Biomed Pharmacother*, Vol. 131, pp. 110769-110773, September 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110769>
- [24] P. H. Shie, C. P. Yang, G. J. Huang, S. Y. Wang, and Y. H. Kuo, "Sinensol-C Isolated from *Spiranthes sinensis* Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Cells through the Regulation of Adipogenic Transcription Factors and AMPK Activation", *Molecules*, Vol. 25, No. 18, p. 4204, September 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25184204>
- [25] E. O. Choi, H. S. Kim, M. H. Han, Y. H. Choi, B. W. Kim, J. A. Hwang, and H. J. Hwang, "Effects of *Hizikia fusiforme* Extracts on Adipocyte Differentiation and Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes", *Journal of Life Science*, Vol. 22, No. 10, pp. 1399-1406, September 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.10.1399>
- [26] T. Yano, S. Kobori, M. Sakai, Y. Anami, T. Matsumura, H. Matsuda, M. Kasho, and M. Shichiri, "Beta-very low density lipoprotein induces triglyceride accumulation through receptor mediated endocytotic pathway in 3T3-L1 adipocytes", *Atherosclerosis*, Vol. 135, No. 1, pp. 57-64, November 1997. DOI: 10.1016/s0021-9150(97)00146-9
- [27] H. Green, and O. Kehinde, "Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells", *Cell*, Vol. 7, No. 1, pp. 105-113, January 1976. DOI: 10.1016/0092-8674(76)90260-9
- [28] J. H. Choi, Y. H. Park, I. S. Lee, S. P. Lee, and M. H. Yu, "Antioxidant activity and inhibitory effect of *Aster scaber* Thunb. extract on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells", *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol. 45, No. 3, pp. 356-363, June 2013. DOI:10.9721/KJFST.2013.45.3.356
- [29] P. Dobson, J. Graham, D. Stewart, R. Brennan, C. A. Hackett, and G. J. McDougall, "Over-seasons analysis of quantitative trait loci affecting phenolic content and antioxidant capacity in raspberry", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Vol. 60, No. 21, pp. 5360-5366, May 2012. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf3005178>
- [30] W. Mullen, J. McGinn, M. E. J. Lean, M. R. MacLean, P. Gardner, G. G. Duthie, T. Yokota, and A. Crozier, "Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Vol. 50, No. 18, pp. 5191-5196, July 2002. DOI: <https://doi.org/10.1021/>

- jf020140n
- [31] H. J. Park, J. Y. Cho, M. K. Kim, P. O. Koh, K. W. Cho, C. H. Kim, K. S. Lee, B. Y. Chung, G. S. Kim, and J. H. Cho, "Anti-obesity effect of Schisandra chinensis in 3 T3-L1 cells and high fat diet-induced obese rats", *Food Chemistry*, Vol. 134, No. 1, pp. 227-234, September 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.101>
- [32] H. Y. Choi, and G. H. Kim, "Inhibitory Effects of Allium senescens L. methanol extracts on reactive oxygen species production and lipid accumulation during differentiation in 3T3-L1 cells", *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol. 46, No. 4, pp. 498-504, October 2014. DOI: <https://doi.org/10.9721/KJFST.2014.46.4.498>
- [33] R. F. Morrison, and S. R. Farmer, "Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation", *The Journal of Nutrition*, Vol. 130, No. 12, pp. 3116S-3121S, December 2000. DOI: 10.1093/jn/130.12.3116S
- [34] J. B. Kim, and B. M. Spiegelman, "ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism". *Genes & Development*, Vol. 10, pp. 1096-1107, March 1996.
- [35] K. Fang, F. Wu, G. Chen, H. Dong, J. Li, Y. Zhao, L. Xu, X. Zou, and F. Lu, "Diosgenin ameliorates palmitic acid-induced lipid accumulation via AMPK/ACC/CPT-1A and SREBP-1c/FAS signaling pathways in LO2 cells", *BMC complement altern medicine*, Vol. 19, No. 1, pp. 255-266, September 2019. DOI: 10.1186/s12906-019-2671-9
- [36] D. H. Kim, S. J. Kim, S. I. Jeong, C. J. Cheon, and S. Y. Kim, "Antiadipogenic effects of red radish (*Raphanus sativus* L.) sprout extract in 3T3-L1 preadipocyte", *Journal of Life Science*, Vol. 24, No. 11, pp. 1224-1230, November 2014. DOI : <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2014.24.11.1224>
- [37] F. M. Gregoire, C. M. Smas, and H. S. Sul, "Understanding adipocyte differentiation", *Physiological Reviews*, Vol. 78, No. 3, pp. 783-809, July 1998. DOI: 10.1152/physrev.1998.78.3.783
- [38] E. D. Rosen, and B. M. Spiegelman, "Molecular regulation of adipogenesis", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 16, pp. 145-171, November 2000. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.145
- [39] B. B. Kahn, T. Alquier, D. Carling, and D. G. Hardie, "AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism", *Cell Metabolism*, Vol. 1, No. 1, pp. 15-25, January 2005. DOI: 10.1016/j.cmet.2004.12.003
- [40] K. J. Claycombe, B. H. Jones, M. K. Standridge, Y. Guo, J. T. Chun, J. W. Taylor, and N. Moustaid-Moussa, "Insulin increases fatty acid synthase gene transcription in human adipocytes", *American Physiological Society Journal*, Vol. 274, No. 5, pp. 1253-1259, May 1998. DOI: 10.1152/ajpregu.1998.274.5.R1253
- [41] D. G. Hardie, S. A. Hawley, and J. W. Scott, "AMP-activated protein kinase-development of the energy sensor concept", *The Journal of Physiology*, Vol. 574, No. 1, pp. 7-15, April 2006. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.108944
- [42] X. J. Xu, R. J. Valentine, and N. B. Ruderman, "AMP-activated Protein Kinase (AMPK): Does this master regulator of cellular energy state distinguish insulin sensitive from insulin resistant obesity", *Current Obesity Reports*, Vol. 3, No. 2, pp. 248-255, June 2014. DOI: 10.1007/s13679-014-0095-x
- [43] G. Kewalramani, D. An, M. S. Kim, S. Ghosh, D. Qi, A. Abrahani, T. Pulinilkunnil, W. Sharma, R. B. Wambolt, M. F. Allard, S. M. Innis, and B. Rodrigues, "AMPK control of myocardial fatty acid metabolism fluctuates with the intensity of insulin-deficient diabetes", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Vol. 42, No. 2, pp. 333-342, February 2007. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2006.11.010
- [44] D. G. Hardie, "The AMP-activated protein kinase cascade: The key sensor of cellular energy status", *Endocrinology*, Vol. 144, No. 12, pp. 5179-5183, December 2003. DOI: <https://doi.org/10.1210/en.2003-0982>
- [45] M. Foretz, D. Carling, C. Guichard, P. Ferre, and F. Foufelle, "AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, No. 24, pp. 14767-14771, June 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.24.14767
- [46] Y. Han, Z. Hu, A. Cui, Z. Liu, F. Ma, Y. Xue, Y. Liu, F. Zhang, Z. Zhao, Y. Yu, J. Gao, C. Wei, J. Li, J. Fang, J. Li, J. G. Fan, B. L. Song, and Y. Li, "Post-translational regulation of lipogenesis via AMPK-dependent phosphorylation of insulin-induced gene", *Nature communications*, Vol. 10, No. 1, pp. 623-635, February 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-08585-4

## Authors



Mee-Kyung Kim received the Ph.D. degree in Department of Food Science and Technology from Daegu Catholic University, Korea. Dr. Kim is currently an assistant professor of Dept. of Bio-Cosmetic Science at Seowon University.

She is interested in cosmetic professional training course, customized cosmetic manufacturing manager trainin course and development of cosmetic functional materials.