

## 어린 으름잎 추출물(*Akebia quinata* D. Leaves)의 항비만 효과

전용섭<sup>1,2</sup> · 유양희<sup>3</sup> · 전주진<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 식품영양과학부

<sup>2</sup>(주)서흥캡슐 중앙연구소

<sup>3</sup>전남대학교 생활과학연구소

### Anti-obesity Effects of Extracts from Young *Akebia quinata* D. Leaves

Yongseop Jeon<sup>1,2</sup>, Yanghee You<sup>3</sup>, and Woojin Jun<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Div. of Food and Nutrition and <sup>3</sup>Research Institute for Human Ecology,  
Chonnam National University, Gwangju 550-757, Korea

<sup>2</sup>Suheung Capsule Co., Ltd. R&D CENTER, Gyeonggi 463-400, Korea

**ABSTRACT** We investigated the *in vitro* and *in vivo* anti-obesity effects of extracts from young *Akebia quinata* D. leaves, including hot water (AQH) and 80% ethanol (AQE) extracts. The inhibitory effects of AQH and AQE on lipid accumulation in 3T3-L1 cells were examined by Oil Red O staining. Compared to control, lipid accumulation was significantly reduced by 18.3% with the treatment upon AQE at a concentration of 5  $\mu$ g/mL. The levels of intracellular triglycerides and free glycerol were also reduced by 52.8% and 9.1% at the same concentration of AQE. The *in vivo* anti-obesity effect of AQE was evaluated in terms of body and white adipose tissue weights in ICR mice. Experimental groups were divided into the following five groups: normal diet (ND), high fat diet (HFD), high fat diet with 60 mg/kg/day of Orlistat (HFD-RF), high fat diet with 200 mg/kg/day of AQE (HFD-AL), and high fat diet with 600 mg/kg/day of AQE (HFD-AH). Feeding of HFD for eight weeks resulted in significant increases in body weight as well as weight gain compared to the ND group. HFD-AH group showed reduced body weight, weight gain, epididymal white adipose tissue weight, and perirenal white adipose weight as compared to the HFD group. These results indicate that AQE supplementation might have beneficial effects on anti-obesity by inhibiting lipid accumulation.

**Key words:** *Akebia quinata* D., adipogenesis, 3T3-L1, weight gain, white adipose tissue

## 서 론

비만은 지방의 축적과 에너지 저장을 위한 조절 과정에서 발생하게 된다(1). 즉 에너지 섭취량과 소비량 사이의 불균형으로 인해 체내 축적되는 지방이 과잉인 상태를 비만이라고 말하며, 이러한 지방세포 내의 과도한 지방의 축적은 당뇨병, 고혈압, 심혈관계질환을 포함한 만성질환을 유발하는 원인으로 알려져 있다(2,3). 지방세포 내의 지방구(lipid droplet)는 지질의 대사 및 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 지방구 내에 주로 존재하고 있는 중성지방의 분해와 이로 인한 glycerol의 유출은 세포 내 지방의 축적을 조절하는 중요한 기전으로 여겨져 왔다(4). 또한 비만은 지방전구세포의 분화과정에 의해 지방세포 내의 중성지방의 과잉 축적으로 발생되며, 이를 조절하는 기작을 밝혀내는 것이 비만 억제 연구의 연구범위로 알려져 있다(5). 따라서 항비

만 기능성 소재개발 연구를 위해서는 지방조직 내의 중성지방의 과도한 축적 저해를 목표로 지방세포 분화과정을 억제하거나 지방분해를 촉진하는 소재를 탐색하는 방법이 널리 사용되고 있다.

전지방세포인 3T3-L1은 Green과 Meuth(6) 및 Green과 Kehinde(7)에 의해 처음으로 3T3 세포로부터 분리되었고, 생물학적 특성과 적절한 배양 조건으로 지방세포로 분화하는 성질이 밝혀진 후 지방세포의 분화과정과 축적된 지방의 분해에 대한 연구를 수행하는데 널리 이용되고 있다(8,9). 전지방세포인 3T3-L1은 여러 호르몬과 다양한 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되면서 세포 내 지방을 축적한다. 이러한 과정을 지방세포 분화 또는 지방세포 형성과정(adipogenesis)이라 하며 adipogenesis 과정에 관여하는 중요한 인자로는 분화 초기에 발현되는 CCAAT-enhancer-binding protein  $\alpha$ (C/EBP $\alpha$ )와 C/EBP $\alpha$ 에 의해 유도되는 peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )가 대표적이며 Kruppel-like family, sterol regulatory element binding protein 1c 등이 알려져 있다

Received 2 December 2013; Accepted 13 January 2014

\*Corresponding author.

E-mail: wjjun@chonnam.ac.kr, Phone: +82-62-530-1337

(10-12). 여러 연구 등을 통해 레티놀(13)과 비타민 E(14) 등은 분화를 억제하며 비타민 C(15)와 카드몐(16) 등은 지방세포의 분화를 촉진시키는 물질로써 보고된 바 있다.

비만을 위한 약품 소재들에 대한 연구가 수행되고 있지만 아직까지 부작용이 없는 완전한 치료제는 시판되지 않고 있다(17). 본 연구에서 양성대조군으로 사용된 Orlistat는 장관 내 리파아제 저해제로서 위장과 소장의 관강 내에서 위와 췌장의 지방분해효소의 활성 부위인 serine과 공유결합을 형성하여 리파아제를 불활성화시킴으로써 항비만 약제 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 부작용은 주로 지방변 등의 소화기계 증상으로 나타난다(18).

최근 천연물질로부터 항비만 기능성을 갖는 소재를 찾아내고 이들의 작용기전을 밝히는 연구들이 활발하게 진행되고 있다(19). 췌장 리파아제의 활성촉진능 및 탄수화물 분해효소의 저해능을 갖는 소재, 백색지방세포의 평균면적을 감소시키는 소재, 체중과 체지방 감소 기능을 갖는 소재 등이 소개된 바 있다(20-22).

으름(*Akebia quinata* D.)은 으름덩굴과(Lardizabalaceae)의 낙엽 활엽 덩굴나무로써 주로 온대 기후의 동아시아 지역에서 서식하고 있다. 국내에서는 열매, 잎, 줄기가 이용되고 있으며, 전통적으로 그 줄기는 목통이라 하여 소염제, 이뇨제, 진통제로 사용되어 왔다(23,24). 으름은 oleanolic acid, hederagenin, norarjunolic acid 등의 배당체와 사포닌들을 함유하고 있으며(25,26), 현재까지 으름과 관련된 약리학적 효과로는 항산화, 통증 완화, 항염 활성이 알려진 바 있다(26,27). 으름은 식품의약품안전청 식품원재료 데이터베이스에 열매와 어린잎이 식용 가능한 것으로 제시되어 있다. 6월 이전에 2~3 cm 미만 크기의 잎을 어린잎으로 채취하며 민간에서는 데쳐서 섭취하는 재료로 이용되어 왔다. 그러나 이들 어린 으름잎에 대한 항비만 생리활성에 대한 연구는 수행된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 어린 으름잎 추출물들의 항비만 생리활성을 *in vitro*와 *in vivo*에서 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 추출물

본 연구에서 사용한 어린 으름잎은 5월 전북 임실군에서 채취되었다. 잎을 건조한 후 추출기(Kyungseo machine, Incheon, Korea)를 이용하여 정제수 및 80% 주정을 투입하고 70°C의 온도에서 4시간 0.7~0.75 kg/cm<sup>2</sup>의 압력 조건에서 추출하고 감압농축 하여 -40°C, 100 mmHG 조건에서 동결건조 후 분쇄(Hanil, Incheon, Korea)한 것으로 한국인 스팸(주)(Jeonnam, Korea)로부터 제공받았다. 어린 으름잎 열수추출물은 AQH로 어린 으름잎 80% 주정추출물은 AQE로 명명하였다. 각 추출물은 19.5% 및 14.5%의 수득율을 나타내었으며 각 추출물은 -20°C에서 보관하면서 실험에 이용하였다.

### 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), newborn calf serum(NCS), fetal calf serum(FBS), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS)은 Hyclone사(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Oil Red O, MDI(0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.5 μM dexamethasone, 10 μg/mL insulin), free glycerol reagent, free glycerol standard solution, 3-(4,5-di-methylthiazon-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bormide(MTT)와 Orlistat는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. AdipoRed<sup>TM</sup>는 Cambrex bioscience(Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다.

### 3T3-L1 세포배양과 분화

3T3-L1 전지방세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하고, 10% NCS와 1% phenycillin-streptomycin이 함유된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다. 분화를 위해 사용한 배양액은 10% FBS와 1% phenycillin-streptomycin이 함유된 DMEM(10% FBS DMEM)을 이용하였다. 3T3-L1 분화 및 시료의 처리는 adipogenesis 과정 중 시료의 anti-adipogenesis 생리활성을 평가한 선행 연구의 처리방법에 준하였다(28). 3T3-L1 전지방세포의 분화는 세포분화를 위해 각 well에 세포를 배양한 후 100% confluency가 되면 2일간 그대로 유지시켰다. 전지방세포에 MDI를 포함한 10% FBS DMEM 배지로 지방세포분화를 유도하고 72시간 후 1 μg/mL insulin이 함유된 10% FBS DMEM으로 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후에 10% FBS DMEM으로 교체하여 지방세포 분화를 유도하였다. 지방세포 분화 유도 동안 시료를 처리하지 않은 군을 Control로 명명하고 각 추출물은 50 μg/mL와 5 μg/mL의 농도로 처리하여 AQH-50과 AQE-5로 명명하였다.

### 세포독성

각 추출물의 세포독성은 탈수소효소의 작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 비수용성 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하여 생존하는 세포가 형성하는 formazan의 함량으로 세포독성을 간접적으로 측정하는 방법인 MTT assay를 이용하여 측정하였다. Well dish의 세포를 D-PBS로 2회 세척한 후 D-PBS에 용해시킨 50 mg/mL MTT 시약을 첨가하여 37 °C에서 2시간 배양한 후 상층액을 제거하고 DMSO를 처리하여 형성된 formazan을 용출한 후 ELISA reader(Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 통해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Oil Red O 염색

9일째 well dish에서 배지를 제거한 뒤 D-PBS로 2회 세

척하고 D-PBS로 제조한 10% formaldehyde 용액을 첨가하여 상온에서 30분간 세포를 고정하였다. 10% formaldehyde 용액을 제거한 후 D-PBS로 2회 세척하고 isopropyl alcohol로 제조된 Oil Red O 염색액을 처리하여 1시간 상온에서 염색한 다음 염색액을 제거한 후 D-PBS로 2회 세척하였다. D-PBS를 각 well에서 완전히 제거한 후 각 well에 100% isopropyl alcohol을 처리하여 세포의 지방구에 염색된 Oil Red O 염색액을 용출하고 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Intracellular 중성지방 함량

AdipoRed<sup>TM</sup>는 hydrophobic Nile Red solution으로써 intracellular 중성지방의 양을 용이하게 측정할 수 있는 형광염색제로써 분화된 세포 내의 중성지방을 정량적으로 측정하기 위해 사용하였다. 9일째 배지를 제거한 뒤 D-PBS로 2회 세척한 후 AdipoRed<sup>TM</sup> 시약을 처리하여 37°C에서 10분간 배양한 후 D-PBS로 2회 세척하여 형광 정도를 excitation 485 nm, emission 572 nm에서 측정하였다.

### 실험동물 및 식이

실험동물은 4주령의 ICR(Orient Bio, Gyeonggido, Korea) 수컷 마우스 75마리를 7일간의 순화 사육기간을 거쳐 23±3°C, 상대습도는 55±15%, 환기회수는 10~20회/hr, 조명시간은 12시간(오전 8시 점등~오후 8시 소등) 및 조도 150~300 Lux의 조건에서 사육하였다. 순화사육기간 동안 일반증상을 관찰하여 증상이 없고 체중감소가 없는 건강한 동물을 선택하여 체중이 동일한 5군으로 분류한 후 8주간 일반식이군은 AIN-76 diet(Research diet, New Brunswick, NJ, USA)를 제공하고 나머지 군은 모두 high-fat diet(45% kal from fat, HFD, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)를 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 식수는 미세여과장치로 여과한 후 제공하여 자유롭게 섭취시켰다. 5개의 실험군에 각 15마리를 배치하고 일반식이군(ND), 고지방식이군(HFD), 고지방식이에 Orlistat 60 mg/kg/day를 경구투여한 군(HFD-RF), 고지방식이에 으름잎 80% 주정추출물 200 mg/kg/day를 경구투여한 군(HFD-AL), 고지방식이에 으름잎 80% 주정추출물 600 mg/kg/day를 경구투여한 군(HFD-AH)으로 나누었다. Orlistat, 으름잎 80% 주정추출물은 매일 1회 동일시간에 경구투여 하였으며, ND군과 HFD군은 으름잎 80% 주정추출물을 조제한 멸균 증류수를 경구투여 하였다. 실험기간 동안 체중변화를 관찰하여 각 군별 체중증가량을 비교하였다.

### 지방조직 무게 측정

실험 종료 후 마우스를 12시간 절식시키고 에테르로 마취한 후, 지방조직의 무게를 조사하기 위하여 부고환 및 신장 주위의 좌우 백색지방을 적출하여 생리식염수로 세척한 다음 여과지로 수분을 제거한 후 중량을 측정하였다.

### 통계분석

실험 결과는 평균(mean)±표준편차(SD)와 평균(mean)±표준오차(SE)로 나타내었고, 각 군 간의 결과 비교 및 유의성 검정은 Student's t-test와 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계처리한 후  $P<0.05$  수준에서 유의수준을 검정하였다.

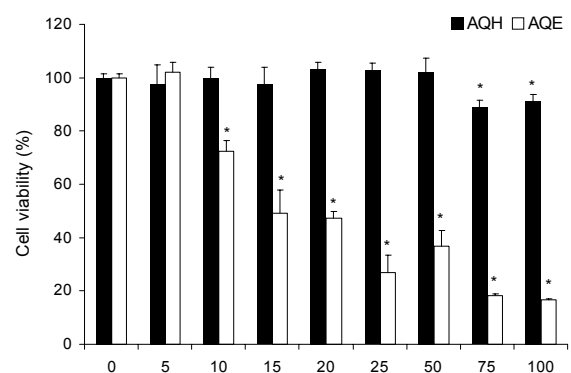
## 결과 및 고찰

### 세포독성

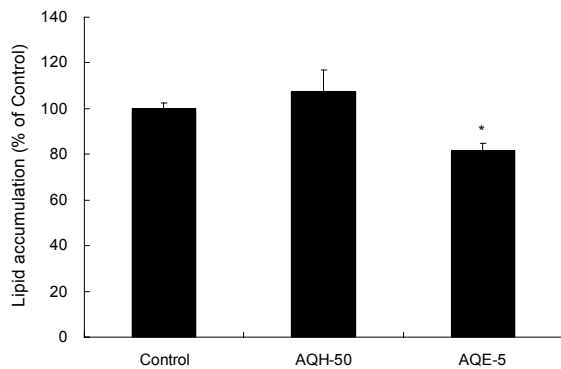
어린 으름잎 추출물들의 세포독성 농도 범위를 3T3-L1 세포 분화 과정 중 처리하여 분화 9일째에 MTT 실험방법으로 측정하였다(Fig. 1). AQH는 75 µg/mL 이상에서 세포독성이 나타났고, AQE는 10 µg/mL의 농도 이상에서 세포독성이 나타났다. 각 추출물의 세포독성의 안전범위는 선행 보고된 식품 추출물들과 상이하게 나타났다. 즉 천연초 열수 추출물과 에탄올추출물의 경우(29) 400 µg/mL의 이하에서 안전하였고, 들깨잎 에탄올추출물(30)의 경우 10 µg/mL 이하에서 세포독성이 나타나지 않았다. AQH는 50 µg/mL 이하에서 안전하였고, AQE는 5 µg/mL 이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 이후 3T3-L1을 대상으로 수행한 생리활성 평가에서 AQH는 50 µg/mL의 농도를 사용하였고, AQE는 5 µg/mL의 농도를 사용하여 연구를 수행하였다.

### 지방세포의 지방구 염색

어린 으름잎 추출물들이 3T3-L1 세포가 전지방세포에서 지방세포로의 분화 과정에 작용하여 지방구의 생성을 억제하는지 확인하기 위해 Oil Red O 염색액을 이용하여



**Fig. 1.** Effect of extracts from young *Akebia quinata* D. leaves on cell viability in 3T3-L1. The cells were incubated during differentiation with various concentrations of two extracts from young *Akebia quinata* D. leaves. The cell viability was determined by MTT assay. The values were calculated as a percentage of cell viability of the non-treated adipocyte cells not treated with extracts. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. \*Significant difference compared to non-treated adipocyte cells at  $P<0.05$ . AQH: hot water extract, AQE: 80% ethanol extract.



**Fig. 2.** Inhibitory effects of extracts from young *Akebia quinata* D. leaves on the lipid accumulation in 3T3-L1. The cells were incubated during differentiation of two extracts from young *Akebia quinata* D. leaves and lipid accumulation levels were determined by Oil Red O stain. AQH-50 and AQE-5 were incubated with 50 µg/mL of AQH and 5 µg/mL of AQE for 9 days. The values were calculated as percentage of Control. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. \*Significant difference compared to the Control at  $P<0.05$ . AQH: hot water extract, AQE: 80% ethanol extract.

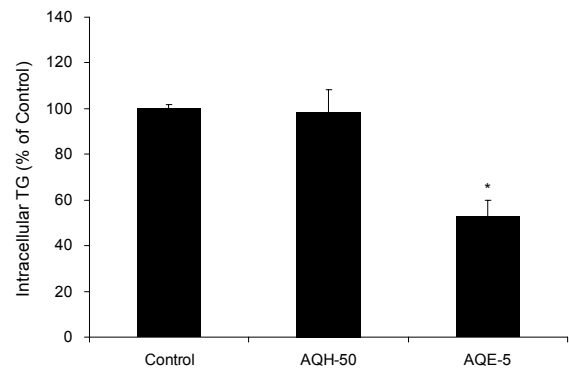
3T3-L1 세포 내에 생성된 지방구 염색 실험을 수행하여 각 처리군을 비교한 결과 AQH-50과 AQE-5는  $107.4 \pm 9.7\%$ 와  $81.7 \pm 3.2\%$ 로 나타났고, AQE-5의 경우 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소한 결과를 나타내었다 (Fig. 2). 3T3-L1 세포에서 Oil Red O 염색법은 지방세포의 지방 축적을 비교 평가하는 가장 일반적인 방법으로 이용되고 있으며, 항비만 활성과 관련하여 식품 소재들을 대상으로 한 연구들에서 소재를 처리하지 않은 군과 비교 시 항비만 활성을 갖는 소재들은 adipogenesis 과정에서 lipid accumulation의 감소에 효과가 나타나는 것으로 제시된 바 있다 (28,31,32). 따라서 본 연구의 5 µg/mL의 AQE가 3T3-L1 지방세포의 adipogenesis 과정 중 작용하여 지방세포 내 lipid accumulation을 억제시키는 것으로 확인한 바, AQE는 항비만 활성을 갖는 소재로 판단된다.

#### Intracellular 중성지방 함량

대부분의 지방구는 중성지방과 perilipin A와 같은 단백질로 구성되어 있다(28,33). 본 연구에서 지방구의 감소를 보다 직접적으로 확인하기 위해 세포 내의 중성지방 함량을 형광염색법에 의해 측정하였다(Fig. 3). AQH-50과 AQE-5 처리에 의해 intracellular 중성지방 함량이 각각  $98.6 \pm 9.6\%$ 와  $52.8 \pm 7.0\%$ 로 나타났으며, AQE-5는 대조군과 통계적으로 유의하게 감소한 결과를 나타내었다. 이로부터 어린 으름잎 추출물 중 AQE는 지방세포의 지방구 내 중성지방 생성 억제 효과를 보유하고 있는 것으로 확인되었다.

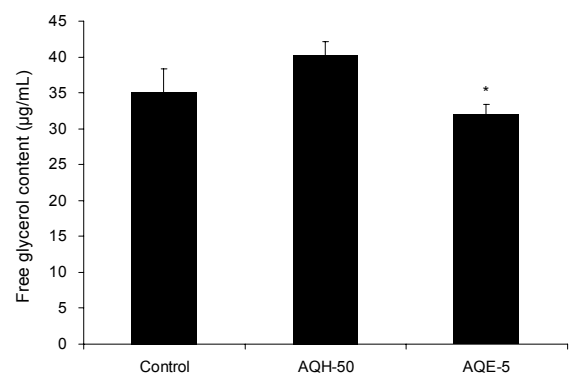
#### Free glycerol 함량

지방세포 내 축적된 지방구에 존재하는 중성지방이 분해되면 glycerol과 지방산으로 나누어지는데 인체의 경우

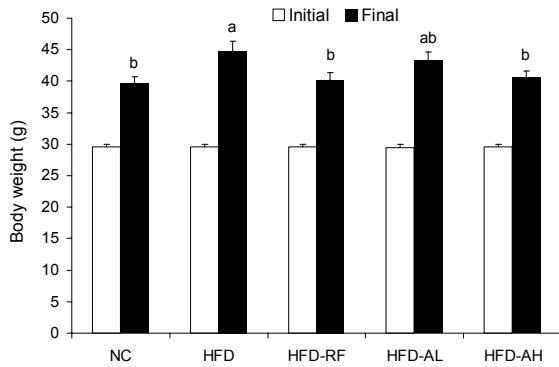


**Fig. 3.** Inhibitory effects of extracts from young *Akebia quinata* D. leaves on intracellular triglyceride in 3T3-L1. The intracellular triglyceride content was fluorescently quantified by AipoRed™ assay kit. AQH-50 and AQE-5 were incubated with 50 µg/mL of AQH and 5 µg/mL of AQE for 9 days. The values were calculated as percentage of Control. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. \*Significant difference compared to the Control at  $P<0.05$ . AQH: hot water extract, AQE: 80% ethanol extract.

glycerol은 세포 외 혈액으로 유리되어 간으로 이송되게 된다(32). 마찬가지로 3T3-L1 지방세포계에서는 free glycerol의 함량이 지방구 내 중성지방의 분해 정도를 간접적으로 나타내는 척도가 된다. 본 연구에서 어린 으름잎 추출물을 처리한 결과 대조군과 비교하여 AQH-50은 유의적 차이를 나타내지 않았으나 AQE-5는 유의적으로 감소하였다 (Fig. 4). 지방 분해 작용을 갖는 시료들을 대상으로 수행한 연구들에서 시료 처리에 따라 free glycerol 함량이 증가하는 것이 보고된 바 있으나(34), 본 연구에서는 AQE 처리에 따라 free glycerol 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 선행



**Fig. 4.** Inhibitory effects of extracts from young *Akebia quinata* D. leaves on free glycerol in 3T3-L1. The values were calculated as a percentage of free glycerol content of the Control not treated with extracts from young *Akebia quinata* D. leaves. AQH-50 and AQE-5 were incubated with 50 µg/mL of AQH and 5 µg/mL of AQE for 9 days. The values were calculated as percentage of Control. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. \*Significant difference compared to the Control at  $P<0.05$ . AQH: hot water extract, AQE: 80% ethanol extract.

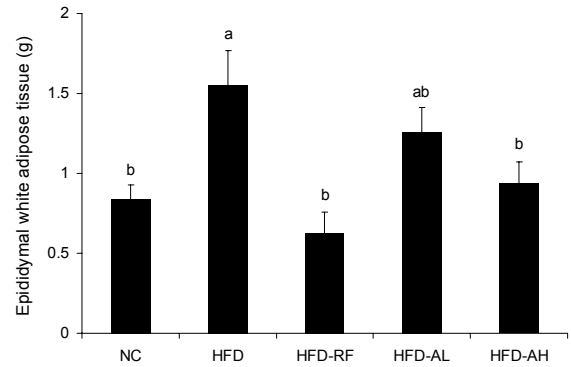


**Fig. 5.** Inhibitory effect of 80% ethanolic extract from young *Akebia quinata* D. leaves on body weight in high fat diet-fed mice. NC: normal diet control, HFD: high fat diet control, HFD-RF: high fat diet with 60 mg/kg b.w./day of Orlistat, HFD-AL: high fat diet with 200 mg/kg b.w./day of 80% ethanolic extract from young *Akebia quinata* D. leaves, HFD-AH: high fat diet with 600 mg/kg b.w./day of 80% ethanolic extract from young *Akebia quinata* D. leaves. Body weights were evaluated during 8 weeks. Data express the mean±SE. The different letters above the bar are significantly different from each group by Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

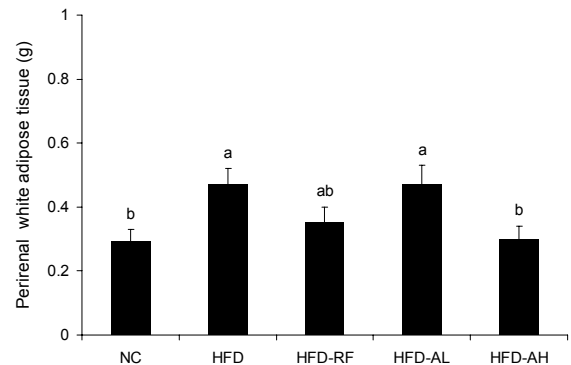
연구에서 염증성 인자에 의한 free glycerol의 증가는 AICAR과 같은 AMPK stimulator에 의해 감소된 결과를 나타내었고(35), adipogenesis 과정 중 처리한 동과분획물은 free glycerol의 감소를 나타내었다(28). 본 연구에서는 adipogenesis 초기단계부터 시료를 처리하여 adipogenesis 마지막 단계에서 배양액 중 free glycerol 함량을 비교한 것으로 AQE에 의해 지방구 생성 감소, 지방세포의 지방구 내 중성지방 함량 감소와 함께 배양액으로 유출되는 free glycerol 함량의 감소에 기인한 것으로 추정된다. 이러한 결과로부터 어린 으름잎 80% 주정추출물은 전지방세포의 분화를 억제함으로써 항비만 효과를 나타냄을 재확인할 수 있었다.

**체중 및 백색지방 무게**

초기 NC, HFD, HFD-RF, HFD-AL, HFD-AH 각 군의 체중은 29.6±0.4 g, 29.5±0.4 g, 29.6±0.4 g, 29.6±0.4 g, 29.5±0.4 g이었으며 8주 후에 각 군의 체중은 39.7±1.0 g, 44.8±1.5 g, 40.2±1.2 g, 43.3±1.3 g, 40.6±1.0 g으로 나타났다(Fig. 5). 각 군의 체중 증가는 초기에 비하여 10.1 g, 15.3 g, 10.6 g, 13.7 g, 11.1 g으로 나타났으며, HFD군과 비교하여 HFD-RF와 HFD-AH는 통계적으로 체중 및 체중증가량이 유의하게 감소하였다. 8주 후 각 군의 부고환 주위 백색지방의 무게는 0.84±0.09 g, 1.55±0.22 g, 0.63±0.13 g, 1.26±0.15 g, 0.94±0.13 g의 무게를 나타내었다(Fig. 6). 부고환 주위 백색지방의 무게는 NC군에 비하여 HFD군은 84%가 증가되었고, HFD군과 비교하여 HFD-RF와 HFD-AH군은 59%와 39%로 통계적으로 유의한 무게 감소를 나타내었다. 한편 8주 후 신장조직 주위 백색지방의 무게는 0.29±0.04 g, 0.47±0.05 g, 0.35±0.05 g, 0.47±



**Fig. 6.** Effect of 80% ethanolic extract from young *Akebia quinata* D. leaves on epididymal white adipose tissue weight in high fat diet-fed mice. NC: normal diet control, HFD: high fat diet control, HFD-RF: high fat diet with 60 mg/kg b.w./day of Orlistat, HFD-AL: high fat diet with 200 mg/kg b.w./day of 80% ethanolic extract from young *Akebia quinata* D. leaves, HFD-AH: high fat diet with 600 mg/kg b.w./day of 80% ethanolic extract from young *Akebia quinata* D. leaves. Epididymal white adipose tissue was evaluated after 8 weeks. Data express the mean±SE. The different letters above the bar are significantly different from each group by Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).



**Fig. 7.** Effect of 80% ethanolic extract from young *Akebia quinata* D. leaves on perirenal white adipose tissue weight in high fat diet (HFD)-fed mice. NC: normal diet control, HFD: high fat diet control, HFD-RF: high fat diet with 60 mg/kg b.w./day of Orlistat, HFD-AL: high fat diet with 200 mg/kg b.w./day of 80% ethanolic extract from young *Akebia quinata* D. leaves, HFD-AH: high fat diet with 600 mg/kg b.w./day of 80% ethanolic extract from young *Akebia quinata* D. leaves. Perirenal white adipose tissue was evaluated after 8 weeks. Data express the mean±SE. The different letters above the bar are significantly different from each group by Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

0.06 g, 0.30±0.04 g으로 나타났다(Fig. 7). 신장조직 주위 백색지방의 무게는 NC군에 비하여 HFD군에서 62%의 증가가 나타났고, HFD군과 비교하여 HFD-AH군이 36%로 통계적으로 유의하게 감소한 결과를 나타내었다. 본 연구에서 Orlistat를 사용한 결과는 Seo 등(36)의 0.05% 식이로 제공한 결과보다 높은 체중 및 부고환 조직무게의 감소 결과를 나타냈다. 이는 식이와 경구투여의 섭취방법이 다름에 기인하는 것으로 판단된다. Lee 등(37)은 쥐를 대상으로 4

주간 브로콜리썩 80% 에탄올추출물의 경구투여에 의해 고지방식이 섭취에 따른 체중증가량 및 부정소 주위 백색지방량의 감소를 400 mg/kg/day 고용량 투여군에서 확인하여 보고한 바 있다. Park 등(38)은 7주간 도라지 물추출물의 경구투여에 의해 고지방식이 섭취에 따른 체중 및 부정소 주위 백색지방량의 감소를 보고한 바 있다. Kim 등(39)은 산사나무 외의 5개 혼합재료를 6주간 식이로 급여하였을 때 체중 감소 및 부고환 지방세포 크기의 감소가 나타난다고 보고한 바 있다. 본 연구에서 8주간의 어린 으름잎 80% 주정추출물 경구투여는 고지방식이 섭취군과 비교하여 체중, 체중증가량, 부정소 및 신장 백색지방량을 감소시키는 것으로 확인되었다. 선행 비만억제효과를 갖는 소재들의 결과들과 유사하게 나타났고, 이러한 결과로부터 어린 으름잎 80% 주정추출물은 체지방 축적을 억제하고 체중증가량의 감소를 통해 비만 억제 효과를 갖는 소재임을 확인할 수 있었다.

최근 식의약 소재로써 으름의 국내의 연구가 수행되고 있다(40). 본 연구에서는 종래에 이용되지 않았던 식용 가능한 어린 으름잎을 대상으로 항비만 식품소재로서의 가능성을 밝히고자 하였다. 어린 으름잎 80% 주정추출물은 지방세포에서 지방구 생성 및 세포 내 중성지방 생성을 억제하였으며 동물모델에서 체중증가량의 감소와 백색지방의 감소를 나타내었다. 이에 어린 으름잎 80% 주정추출물은 항비만 소재로 이용가치가 높을 것으로 판단되며 이를 이용하여 향후 다양한 기능성식품의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구에서 어린 으름잎으로부터 추출된 열수추출물인 AQH와 80% 주정추출물인 AQE를 대상으로 3T3-L1 전지방세포의 지방세포 분화과정 중에 처리한 후, Oil Red O 염색법에 의한 lipid accumulation, intracellular 중성지방 함량을 평가하고 free glycerol release 함량을 측정하여 지방세포형성 억제능을 확인하며, ICR 마우스를 대상으로 고지방식이 섭취 하에 어린 으름잎 추출물의 경구투여에 따른 체중과 백색지방에 작용하는 효과를 평가하여 어린 으름잎 추출물의 항비만 효과를 밝히고자 하였다. 3T3-L1 지방세포 분화과정 중 AQH 및 AQE 추출물을 처리한 결과 AQE 처리군에서만 유의적 감소를 나타내었다. Intracellular 중성지방 함량의 경우도 AQE 처리군에서 유의적으로 감소되었다. 지방세포 분화 중 배양액으로 유출되는 free glycerol 함량을 평가한 결과에서도 AQE 처리군의 유의적 감소를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 AQE는 3T3-L1 지방세포 분화과정 중에 지방구 생성 억제 및 지방세포의 지방세포 생성 억제효과가 있는 것으로 판명되었다. 마우스에서 8주간 고지방식이 하에 600 mg/kg/day의 AQE를 경구투여하였을 때 고지방식이군과 비교하여 체중 및 체중증가량이 통계적으로 유의하게 감소하였고, 부정소 주위 및 신장 주위 백색지방의 감소가 나타났다. AQE 투여에 의한 체중 감소

및 부정소 주위 백색지방량의 감소는 양성대조군으로 사용한 Orlistat의 경구투여 결과와 유사하였다. 이상의 결과로 세포수준에서의 지방세포 분화 억제, 지방구 생성 억제 작용과 실험동물에서 체중증가량 및 체지방의 감소 작용을 갖는 AQE는 향후 항비만 효과를 갖는 소재로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2009년도 산학협력기업부설연구소 지원사업의 지원에 의하여 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Spiegelman BM, Flier S. 1996. Adipogenesis and obesity; rounding out the big picture. *Cell* 87: 377-389.
2. Kopelman PG. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643.
3. Visscher TL. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Publ Health* 22: 355-375.
4. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 875-888.
5. Kopelman PG. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643.
6. Green H, Meuth M. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3: 127-133.
7. Green H, Kehinde O. 1973. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1: 113-116.
8. Ailhaud G, Grimaldu P, Negrel R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12: 207-233.
9. Boney CM, Staats BM, Atilas AD, Dercole AJ. 1994. Expression on insulin-like growth factor- I (IGF- I) and IGF-binding proteins during adipogenesis. *Endocrinology* 135: 1863-1868.
10. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273: 30057-30060.
11. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai X, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. 2001. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR: a unified pathway. *Genes Dev* 16: 22-26.
12. Naowaboot J, Chung CH, Pannangpetch P, Choi R, Kim BH, Lee MY, Kukongviriyapan U. 2012. Mulberry leaf extract increases adiponectin in murine 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Res* 32: 39-44.
13. Sato M, Hiragun A, Mitsui H. 1980. Preadipocytes possess cellular retinoid binding proteins and their differentiation is inhibited by retinoids. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 1839-1845.
14. Kawada T, Aoki N, Kamei Y, Maeshige K, Nishiu S, Sugimoto E. 1990. Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation from preadipocytes to adipocytes of 3T3-L1 cells. *Comp Biochem Physiol* 96: 323-326.
15. Cno M, Aratani Y, Kitagawa I, Kitagawa Y. 1990. Ascorbic acid phosphate stimulate type IV collagen synthesis and accelerate adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Exp Cell Res* 187: 309-314.

16. Harrison SA, BuxtaonJM, Clancy BM, Czech MP. 1991. Evidence that erythroid-type glucose transporter intrinsic activity is modulated by cadmium treatment of mouse 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 266: 19438-19449.
17. Park HS. 2001. Pharmacological therapy of obesity. *Kor J Soc Study Obes* 10: 118-127.
18. Ballinger A, Peikin SR. 2002. Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur J Pharmacol* 440: 109-117.
19. Zacour AC, Sliva ME, Cecon PR, Bambirra EA, Vieira EC. 1992. Effect of dietary chitin on cholesterol absorption and metabolism in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 38: 609-613.
20. Kim YJ, Kim BH, Lee SY, Kim MS, Park CS, Rhee MS, Lee KH, Kim DS. 2006. Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with antiobesity. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 221-226.
21. Kim YS, Byun SH, Kim SC, Kum M, Cho EH. 2000. Effect on cure and prevention of an obesity. *Kor J Herbology* 15: 37-43.
22. Jeon JR, Kim JY, Lee KM, Cho DH. 2005. Anti-obese effects of mixture contained pine needle, black tea and green tea extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 375-381.
23. Choi J, Jung HJ, Lee KT, Park HJ. 2005. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the saponin and obtained from the stem of *Akebia quinata*. *J Med Food* 8: 78-85.
24. Jung HJ, Lee CO, Lee KT, Park HJ. 2004. Structure activity relationship of oleanane disaccharides isolated from *Akebia quinata* versus cytotoxicity against cancer cells and NO inhibition. *Biol Pharm Bull* 27: 744-747.
25. Higuchi R, Kawasaki T. 1976. Pericarp saponins of *Akebia quinata* Decne. I. Glycosides of hederagenin and oleanolic acid. *Chem Pharm Bull* 24: 1021-1032.
26. Ikuta A, Itokawa H. 1988. A triterpene from *Akebia quinata* callus tissue. *Phytochemistry* 27: 3809-3810.
27. Rim AR, Kim SJ, Jeon KI, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2006. Antioxidant activity of extracts from *Akebia quinata* Decne. *J Food Sci Nutr* 11: 84-87.
28. You YH, Jun WJ. 2012. Effects of fractions from *Benincasa hispida* on inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 895-900.
29. Yoon BR, Lee YJ, Kim SG, Jang JY, Lee HK, Rhee SK, Hong HD, Choi HS. 2012. Antioxidant effect of hot water and ethanol extracts from Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) on reactive oxygen species (ROS) production in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J Food Preserv* 19: 443-450.
30. Kim MJ, Kim HK. 2009. Perilla leaf extract inhibits 3T3-L1 preadipocytes differentiation. *Food Sci Biotechnol* 18: 928-931.
31. Liu F, Kim J, Li Y, Liu X, Li J, Chen X. 2001. An extract of *Lagerstroemia speciosa* L has insulin-like glucose uptake stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *J Nutr* 131: 2242-2247.
32. Grundy SM. 2004. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2595-2600.
33. Tansey JT, Sztalryd C, Hlavin EM, Kimmel AR, Londos C. 2004. The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life* 56: 379-385.
34. Lee JM, Yoon HK, Lee YH, Park JJ, You YH, Jang JY, Yang JW, Jun WJ. 2010. The potential effects of ethyl acetate fraction from *Curcuma longa* L. on lipolysis in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 13: 1-7.
35. Hong SW, Lee JM, Choi JH, Park SE, Rhee EJ, Park CY, Oh KW, Park SW, Kim SW, Lee WY. 2012. The effect of AMPK activation on Wnt and sFRP5 in TNF- $\alpha$  induced adipocyte metabolic dysfunction in 3T3-L1 cell. *Korean J Obes* 21: 29-36.
36. Seo DJ, Kim JM, Kim TH, Baek JM, Kim TW, Kim HS, Choe M. 2010. Anti-obesity effects of *Foeniculum fructus* water extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1604-1610.
37. Lee JJ, Shin HD, Lee YM, Kim AR, Lee MY. 2009. Effect of broccoli sprouts on cholesterol-lowering and anti-obesity effects in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 309-318.
38. Park YS, Yoon Y, Ahn HS. 2007. *Platycodon grandiflorum* extract represses up-regulated adipocyte fatty acid binding protein triggered by a high fat feeding in obese rats. *World J Gastroenterol* 13: 3493-3499.
39. Kim HS, Kim TW, Kim DJ, Hwang HJ, Lee HJ, Choe M. 2007. Effects of natural plants supplementation on adipocyte size of the epididymal fat pads in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 419-423.
40. Xue X, Xiao Y, Gong L, Guan S, Liu Y, Lu H, Qi X, Zhang Y, Li Y, Wu X, Ren J. 2008. Comparative 28-day repeated oral toxicity of Longdan Xieganwan, *Akebia trifoliata* (Thunb.) koidz., *Akebia quinata* (Thunb.) Decne. and *Caulis aristolochiae manshuriensis* in mice. *J Ethnopharmacol* 119: 87-93.