

식방풍잎(*Peucedanum japonicum* Thunberg L.)의 물추출물이 3T3-L1 세포와 고지방식이로 유도된 마우스에서 항비만 효과

정호경, 심미옥, 장지훈, 김태묵, 안병관, 김민석, 정원석*

전남한방산업진흥원

Anti-obesity Effects of *Peucedanum japonicum* Thunberg L. on 3T3-L1 Cells and High-fat Diet-induced Obese Mice

Ho-Kyung Jung, Mi-Ok Sim, Ji-Hun Jang, Tae-Muk Kim, Byeong-Kwan An,
Min-Suk Kim and Won Seok Jung*

Jeollanamdo Development Institute of Korean Traditional Medicine, Jangheung 59338, Korea

Abstract - Obesity is a pro-inflammatory state that contributes to the development of metabolic disorders such as hyperlipidemia, insulin resistance, type 2 diabetes, non-alcoholic fatty liver, and cardiovascular disease. In this study, we evaluated the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells and in high-fat diet (HFD)-induced obese mice by *Peucedanum japonicum* Thunberg L. water extract (PJT). Lipid accumulation measurement indicates that PJT markedly inhibited adipogenesis in a dose-dependent manner. RT-PCR results demonstrated that the mRNA expression of adipogenic transcription factors such as peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) and CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α) in 3T3-L1 cells were significantly down-regulated by PJT treatment. Oral administration of PJT (100, 300, and 500 mg/kg, b.w./daily for 4 weeks) was conducted in high-fat diet induced obese mice and C57BL/6 mice. The PJT-administered group of HFD-induced mice had a lower body weight gain, along with decreased serum levels of glucose, triglycerides, and total cholesterol compared with the control mice, however, the HDL-cholesterol/total cholesterol ratio was increased. Furthermore, the elevated mRNA expression levels of adipogenesis related genes in the white adipose tissue of obese mice were significantly suppressed by PJT. These results indicate that PJT exhibits anti-obesity effects in obese mice by decreasing in serum lipid levels and lipogenesis related gene.

Key words - Adipogenesis, C/EBP α , Fas, Lipogenesis, PPAR γ , SREBP-1c

서 언

최근 비만인구는 서구화된 생활습관으로 인해 지속적으로 증가하고 있으며, 특히 2014년에는 전 세계 성인의 13%가 비만인구로 나타났다(Sim *et al.*, 2015). 비만은 소모하는 열량에 비해 과다한 열량을 섭취함으로써 여분의 열량이 체내에 과도하게 축적되어 제2형 당뇨병, 심혈관계 질환, 각종 암 및 고지혈증과 같은 만성질환의 발병원인으로 간주된다(Jung *et al.*, 2014). 지방축적은 지방세포의 과형성과 지방축적에 의한 지방세포의

비대에 의한 결과라고 할 수 있다. 지방세포의 과형성은 지방전구세포의 증식과 분화에 의해 조절되며, 지방세포의 비대는 지방의 합성과 지방분해의 균형에 의해 조절된다(Yang *et al.*, 2008). 또한, 지방세포의 분화에 따라 중성지방의 합성이 증가하며 지방세포의 크기를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 즉, 지방세포의 과형성, 비대 또는 크기 증가는 식사조절로는 억제할 수 없으므로 비만의 근본적 치료 또는 억제를 제어하기 위해서는 지방세포의 분화과정을 조절하여, 지방축적을 억제하는 것이 중요하다(Nagai *et al.*, 2014).

지방세포 형성(adipogenesis) 과정에 관여하는 중요한 인자로는 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α)가 있다(Roncari

*교신저자: i0823@nicom.com

Tel. +82-61-860-2812

et al., 1981; Yang *et al.*, 2008). C/EBP α 와 PPAR γ 는 adipogenesis 과정을 조절하는 전사인자로서 두 인자의 발현은 adipogenic gene의 발현을 조절함으로써 지방조직에서 지방산 합성을 증가시키고 중성지방을 생산한다(Morrison and Farmer, 2000; Rosen and Macdougald, 2006). 그러므로, adipogenesis 조절에 중요한 점은 C/EBP α 와 PPAR γ 발현을 억제하는 것이다.

식방풍(갯기름나물, *Peucedanum japonicum* Thunb; PJT)은 미나리과에 속하는 다년생 초본으로, 뿌리는 갯방풍(해방풍, *Glehnia littoralis* Fr. Schm.), 원방풍(방풍, *Ledebouriella seseloides* Wolff=*Saposhnikovia divaricata* Schis.)과 함께 한약재의 방풍 대용으로 이용하는 약용식물의 하나이다. 민간에서는 식방풍의 어린잎과 줄기를 식용으로 이용하고 있고, 한방에서는 고혈압 또는 뇌졸중으로 발병되는 중풍병, 해독 등에 효능이 있어 가래, 기침, 두통, 전신마비, 해열, 신경통 등에 이용될 뿐 아니라 이질간균, 고초간균, 일부 피부 진균에 억제작용이 보고되어 있다. 그러나 식방풍의 이러한 생리활성을 뒷받침 할 수 있는 과학적 연구결과는 미흡하고, 식방풍의 뿌리 이외에 잎, 줄기 등의 부위는 우수한 생리활성을 나타내에도 불구하고 대부분 장아찌나 무침 등 식용으로만 이용되고 있을 뿐, 약용의 원료로는 원활히 이용되지 못하고 있다.

따라서, 본 연구에서는 식방풍잎의 활용을 차, 음료, 환 등으로 늘리기 위하여 물추출물을 이용한 항비만 효과를 실험하였다. 먼저, 3T3-L1 세포에서 지방 세포의 분화를 촉진시키는 PPAR γ 와 지방세포에서 분비되는 호르몬인 leptin, adiponectin의 mRNA 발현량 분석을 통하여 3T3-L1의 분화 유도능 억제에 관한 연구를 수행하였다. 또한 고지방식으로 급여로 비만을 유도하는 동물모델에서 식방풍 추출물을 농도별로 경구 투여하여 지방 축적 및 혈장 내 지방질 함량과 당에 미치는 효능을 조사하였다.

재료 및 방법

시료추출 및 제조

실험에 사용한 식방풍 잎은 전남한방산업진흥원 재배포장에서 재배한 식방풍 잎을 3월에 종자 파종하여 5월경에 수확한 것을 사용하였다. 식방풍 잎을 건조하여 분쇄한 후 10배 용량의 증류수를 첨가하여 105°C 3시간 동안 3회 열수추출한 후 여과하여 불순물을 제거하였다. 열수추출한 시료는 Freeze dry (PVTFD20R, Ilshin, Korea)를 사용하여 동결건조(Ilshin, Korea) 시킨 후 28.8%의 회수율을 얻어 실험 시료로 사용하였다.

세포배양 및 분화유도

실험에 사용한 3T3-L1 세포는 마우스 지방전구세포로 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였고, 10% new born calf serum (BCS, Invitrogen, USA)과 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)이 함유된 DMEM (Invitrogen, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO $_2$ 의 조건에서 배양하였다. 세포가 confluence 상태가 되면 10% FBS-DMEM에 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 0.25 mM dexamethasone, 10 μ g/ml insulin이 첨가된 배지를 처리하여 분화를 2일간 유도 한 뒤 다시 2일간 10% FBS-DMEM에 10 μ g/ml insulin이 첨가된 배지로 교체해주었다. 그 후 2일마다 10% FBS-DMEM 배지로 교체하였다. 시료의 처리는 분화유도 배지 첨가 시점부터 같이 처리하였다(Sim *et al.*, 2014).

세포독성 실험

본 실험에 사용한 PJT가 지방세포에 독성을 나타내는지를 측정하기 위하여 MTS assay를 수행 하였다. 3T3-L1 preadipocyte를 96 well plate에 5×10^3 cells/well로 분주하였으며, 10% BCS가 함유된 DMEM을 넣어 well당 최종 용적을 100 μ l로 하였다. 24시간 동안 배양한 후 추출물을 각각의 농도별로(0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/ml) 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 그 후의 각각 세포 배양액 용량의 1/10배의 MTS 용해액을 첨가한 후 37°C에서 2시간 배양한 후 ELISA microplate reader (Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Oil-red O 염색

앞의 과정을 거친 다음 배지를 제거해서 pH 7.4 PBS로 세척하고 10% formalin 용액으로 2시간 동안 고정한 이후, 고정액 제거 후 다시 PBS로 3회 세척하였다. 완전히 건조시킨 후 Oil red O 염색액(Oil red O staining kit, sciencell, USA)을 처리하여 15분간 상온에서 염색하고, 염색액을 제거한 후 물로 3회 세척 한 다음 Microscope (Nikon TS100, Japan)로 관찰하였다. 또한, 흡광도 측정을 위하여 100% isopropyl alcohol로 염색된 지방구를 용출 시켜 ELISA microplate reader (Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Sim *et al.*, 2014).

지방관련 유전자 Real-time PCR 분석

Total RNA는 배양한 3T3-L1 지방전구세포를 TRI reagent

Table 1. Primer sequence for Real time RT-PCR

Gene	Sequences of forward and reverse primer 5' - 3'	
PPAR γ	Forward	TTC TGA CAG GAC TGT GTG ACA G
	Reverse	ATA AGG TGG AGA TGC AGG TTC
FAS	Forward	AGA CCC GAA CTC CAA GTT ATT G
	Reverse	GAT ACC ACC AGA GAC CGT TAT G
C/EBP α	Forward	GCG CAA GAG CCG AGA TAA A
	Reverse	GGT GAG GAC ACA GAC TCA AAT C
FABP4	Forward	AGC TCC TCC TCG AAG GTT TA
	Reverse	CTG TCG TCT GCG GTG ATT T
GAPDH	Forward	GGG TGT GAA CCA CGA GAA ATA
	Reverse	GGG TCT GGG ATG GAA ATT GT

(Molecular Research Center, USA)를 사용하여 분리하였다. 즉 배양된 세포에서 배지를 제거하고 PBS로 세척하여 TRIzol 1 ml를 가하여 실온에서 교반하였다. 클로로포름 200 μ l를 넣고 다시 교반하여 15,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리한 다음, 상등액 500 μ l에 이소프로판올을 가하여 다시 원심 분리하여 mRNA를 얻었다. 5 μ g의 mRNA를 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystem, USA)를 이용하여 cDNA로 합성을 하였다. 합성된 cDNA 1 μ l, primer 1 μ l, SYBR Master Mix II (Applied biosystem, USA) 10 μ l, 3차 증류수 8 μ l를 넣고 Real-time PCR기(ABI7500, Applied biosystem, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 또한 Real-time PCR 반응 조건은 50°C에서 2분 95°C에서 10분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 15초 어닐링 온도 60°C에서 15초 신장온도 72°C 15초인 사이클을 40회 반복 수행하였다. 유전자 특이적 primer의 정보는 Table 1에 나타내었다(Sim *et al.*, 2015).

실험동물 디자인 및 실험식이 조성

실험동물은 6주령 C57BL/6 마우스를 샘타코(SAMTAKO, Korea)로부터 구입하였다. 마우스는 1주간 고품식으로 적응시킨 후 난괴법에 의하여 분류하였으며, 정상식이군(ND)과 고지방식이군(HFD)으로 나누어서 4주간 사육하였다. 그 뒤, 고지방군은 다시 난괴법에 의하여 고지방식이군(HFD), 고지방-PJT (100 mg/kg, 300 mg/kg, 500 mg/kg)군으로, 8마리씩 나누어 6주간 사육하였다. 동물사육실의 환경은 항온(22 \pm 2°C), 항습(50 \pm 5%). 12시간 간격(08:00 ~ 20:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하고 동물들은 폴리카보네이트 사육상자에 2 마리씩 분리하여 사육하였다. 본 실험에서 사용한 식방풍의 농도는 인체적

용시 8 mg/kg, 24 mg/kg, 40 mg/kg과 동등할 것으로 사료된다 (Reagan-Shaw *et al.*, 2007).

본 실험에 사용한 60% kcal 고지방 식이는 샘타코(SAMTAKO, Korea)로부터 구입하여서 제공하였으며, 물과 식이는 제한 없이 섭취하도록 하였고 체중은 매주 1회 일정시각에 측정하였으며, 식이섭취량은 매일 일정시각에 공급량에서 잔량을 감하였다.

혈청 및 장기 채취

사육이 끝난 실험동물은 희생 전 12시간 동안 절식시킨 후 안외정맥채혈을 통해 공복혈액을 채취하였다. 혈액은 900 xg (4°C)에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 실험동물의 장기조직은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 phosphate buffered saline (PBS)용액으로 수차례 헹군 후 표면의 수분을 제거하여 칭량하였으며, 즉시 액체질소로 급냉시켜 -70°C에 보관하였다.

혈청 생화학 지표 분석

혈청 중의 total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triacylglycerol (TG)를 FUJI DRI-CHEM 4000i (FUJI, Japan)를 이용하여 효소법을 통해 생화학분석을 하였다.

혈청 adipokine 측정

혈청 adipokine (leptin, adiponectin) 함량 측정은 Multiplex detection kit (Bio-Rad, USA) 및 Luminex 200 Labmap system (Bio-Rad, USA)을 사용하였으며, 데이터분석은 Bio-Plex manager soft ware version 5.0 (Bio-rad, USA)를 이용하여 수행하였다.

지방조직 세포의 형태학적 분석

지방조직의 형태학적 관찰은 다음과 같이 실시하였다. 동물 희생시 적출한 지방조직 일부를 10% formaldehyde 용액에 24 시간 고정한 다음, 수세하고 60% 에탄올에서부터 상승농도로 탈수하여 파라핀에 포맷하고, 이것을 4 μm 두께로 박절하여 hematoxylin & eosin (H & E) 염색한 다음 광학현미경(Nikon TS100, Japan)에서 지방조직 세포를 200배 배율로 관찰하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균 ± 표준편차(mean ± S.D.)로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Science Inc., USA)를 이용하여 일원변량 분석(One way ANOVA)을 실시한 후 세포실험은 Student's t-test로 동물실험은 Duncan's multiple range test로 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

지방전구세포에서 PJT의 세포독성 및 adipogenesis 저해 효과

지방전구세포의 세포독성 평가는 MTS 방법을 이용해 측정하였다(Fig. 1). PJT를 각각 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μg/ml)로 48시간 동안 처리하여 실험을 진행하였다. 그 결과 농도에 따른 세포독성은 유발되지 않았다. 또한 PJT의 1,000 μg/ml 고농도 처리에 의해서도 세포생존율이 높게 나타나 PJT 추출물이 낮은 독성의 안정성 높은 소재임을 확인하였다.

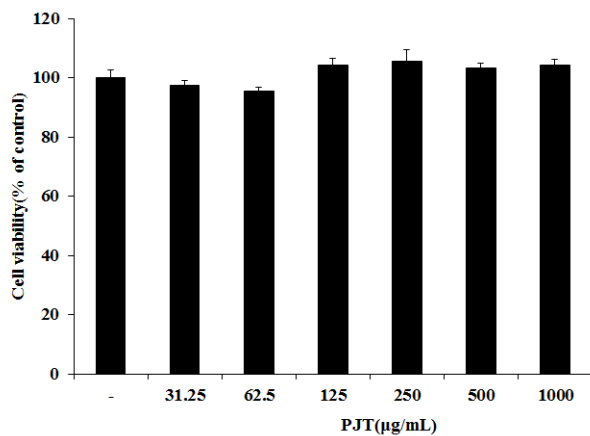


Fig. 1. Effects of cell viability on PJT of preadipocyte. The values are expressed as the means ± S.D. PJT; *Peucedanum japonicum* Thunberg L.

지방전구세포에서 PJT의 분화 억제 및 관련 유전자 발현 억제효과

PJT가 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제시키는지 확인하기 위해 지방세포로의 분화를 유도시킨 후 분화가 유도되는 동안 세포에 PJT를 125, 250, 500, 1,000 μg/ml을 처리하고 Oil Red O 시약을 이용하여 염색을 실시하였다. 현미경 사진 관찰 결과 붉은색으로 염색된 지방구가 PJT 농도 의존적으로 감소된 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 또한 Oil Red O 시약으로 염색된 추출한 값 역시 모든 농도에서 통계적으로 유의적인

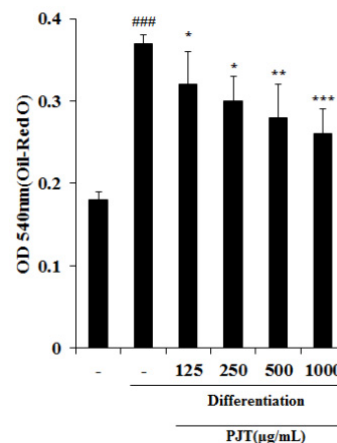
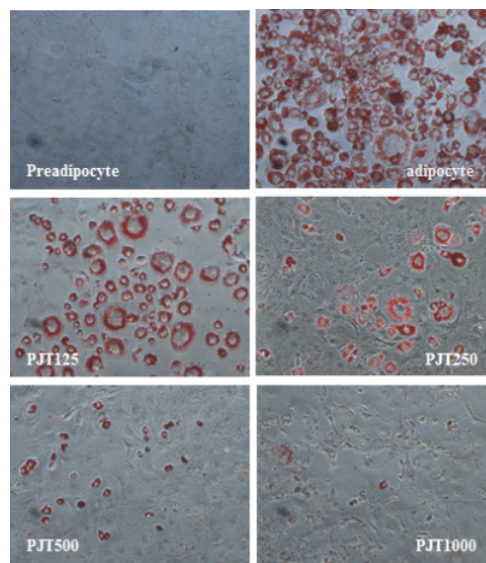


Fig. 2. Effects of PJT on lipid droplet accumulation of differentiated 3T3-L1. The values are expressed as the means ± S.D. and significantly different between groups according to Student's t test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ PJT treated group versus adipocyte, ### $p < 0.05$ preadipocyte versus adipocyte. PJT; *Peucedanum japonicum* Thunberg L.

차이를 나타냈으며, 이를 바탕으로 PJT가 지방전구세포의 분화를 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. PJT에 의한 지방축적 감소가 어떤 분자생물학적 메커니즘에 의해 유도되는지 확인하기 위해 PPAR γ , C/EBP α , Fatty acid-binding protein 4 (FABP4), Fatty acid synthase (FAS) 등의 유전자 발현을 확인하였다(Fig. 3).

지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 과정은 많은 종류의 지방세포분화 관련 전사인자들의 단계적인 조절에 의하여 유발되며, 새로운 비만치료제들은 이러한 전사인자들을 조절하여 분화를 억제하는 기전을 주요한 타겟으로 가진다(Yang *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2015). 전사인자조절에 작용하는 인자들은 C/EBP family 및 PPAR γ 가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 먼저 분화유도인자로 인해 분화가 촉진되면 초기 단계에는 C/EBP β 의 발현이 유발되고 C/EBP β 다시 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현을 촉진함으로써 최종적으로 분화과정을 완성하게 된다(Hamm *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2006). 이렇게 분화된 지방세포는 lipid droplet 생성 및 세포의 크기 증가 등과 같은 형태적 특징과 더불어 특이적인 유전자 FABP4, FAS 등의 발현을 유발함으로써 지방세포의 특징을 지니게 된다(Ahmadian *et al.*,

2013, Park *et al.*, 2015).

따라서, PJT의 처리는 C/EBP α , FABP4, FAS 등 모든 유전자에서 농도의존적으로 발현이 감소하였으며, PPAR γ 는 250 μ g/ml 농도에서부터 유의적으로 유전자 발현의 억제 효능을 보였다. 따라서 PJT는 지방분화 유전자의 조절을 통하여 지방 생성 및 축적 억제 효능을 나타낸 것으로 사료된다.

비만 동물모델에서 PJT 항비만 효과

고지방식이와 함께 PJT를 급여한 후 체중, 체중증가량, 식이 섭취량 및 내장지방 무게 변화는 Table 2와 Fig. 4와 같다.

고지방식이군의 최종 체중 및 체중증가량은 정상식이군에 비하여 유의적으로 높았으나 100 mg/kg의 농도로 투여한 PJT군에서는 체중이 감소하는 경향을 나타냈으며 특히, 300 mg/kg, 500 mg/kg은 유의적인 체중증가량 감소 효과를 보였다. 그러나 PJT는 식이섭취량에는 유의적인 영향을 미치지 않았다. PJT에 의한 체중증가량 감소가 각 조직의 지방 축적 감소에 의한 것인지 알아보기 위해 동물 희생 후 지방조직의 무게를 확인한 결과, 정상식이군에 비하여 고지방식이군은 내장지방인 부고환

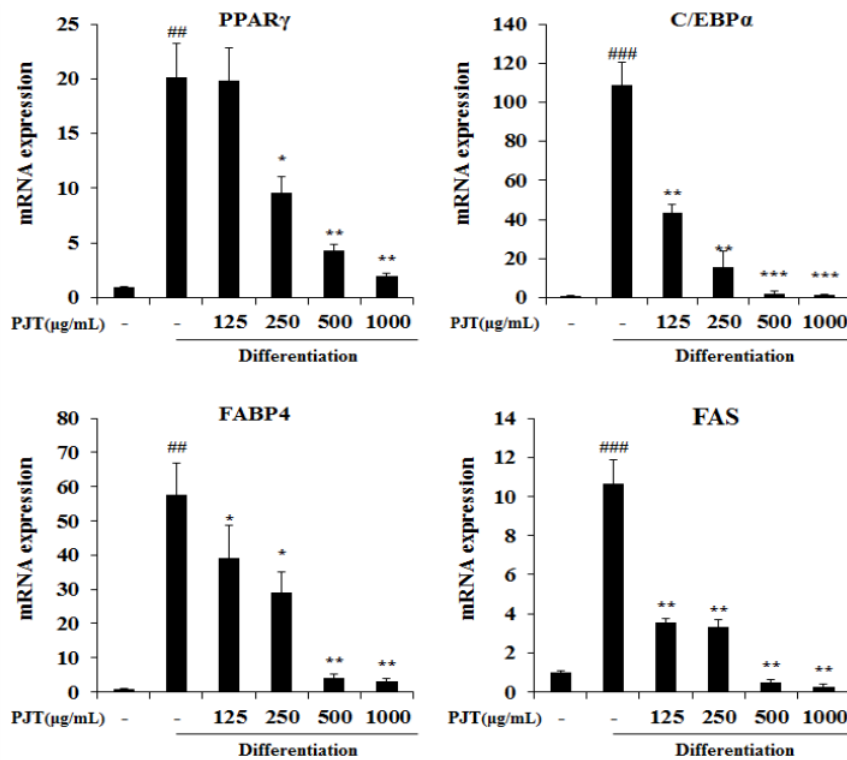


Fig. 3. Effects of PJT on adipogenic transcription factors and adipocyte expressed genes expression of differentiated 3T3-L1. The values are expressed as the means \pm S.D. and significantly different between groups according to Student's t test. ** p < 0.01, *** p < 0.001 PJT treated group versus adipocyte, ### p < 0.05 preadipocyte versus adipocyte. PJT; *Peucedanum japonicum* Thunberg L.

Table 2. Effects of PJT on body weight gain, food intake, and WAT weights in mice fed a high-fat-diet^z

Item	Normal	HF	PJT100	PJT300	PJT500
Body weight gain (g)	2.64 ± 0.20 ^a	13.20 ± 1.00 ^b	10.28 ± 0.89 ^{ab}	8.59 ± 0.97 ^{ab}	7.66 ± 1.25 ^a
WAT ^y weights (g)	0.32 ± 0.05 ^a	2.60 ± 0.22 ^c	2.39 ± 0.07 ^c	2.17 ± 0.32 ^{bc}	1.89 ± 0.49 ^b
food intake (g/day)	2.21 ± 0.08	2.56 ± 0.70	2.55 ± 0.56	2.49 ± 0.87	2.54 ± 0.08

^zMean ± SD. ^{abc}Means not sharing a common letter are significantly different between groups based on one-way ANOVA with Duncan's multiple-range post hoc test at $p < 0.05$.

^yWAT; White adipose tissue.

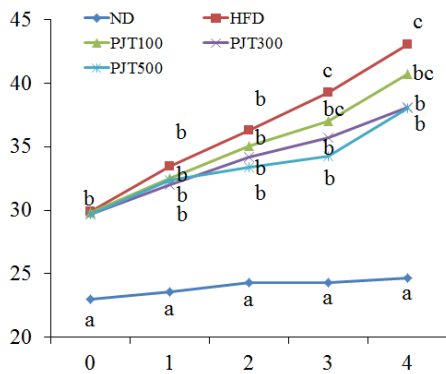


Fig. 4. Effects of PJT on body weight changes in mice fed a high-fat-diet. The values are expressed as the means ± S.E.

^{abc}Means not sharing a common letter are significantly different between groups based on one-way ANOVA with Duncan's multiple-range post hoc test at $p < 0.05$. PJT; *Peucedanum japonicum* Thunberg L.

지방의 무게가 8배 정도 증가하였으며 PJT의 섭취는 이를 유의적으로 감소시켰다. 부고환지방의 조직학적 검사를 통해서 지방 세포의 크기가 감소(Fig. 5)하고 이에 따라 지방조직의 무게가 감소하였음을 확인 할 수 있었다.

비만 동물모델에서 PJT 혈중 지질함량 및 adipokine 함량

비만과 내장지방의 축적은 혈중 지질함량을 변화시키고 지방조직에서의 adipokine의 분비에 영향을 주게 되며 이는 인슐린 저항성 및 비알코올성지방간 등에 영향을 줄 수 있다(Schaffler *et al.*, 2005). 따라서 PJT의 섭취에 따른 혈장 지질 및 adipokine의 함량을 측정 한 결과는 Table 3에 나타내었다. 8주간의 고지방 섭취는 혈장 중 트리글리세리드 함량이 30% 유의적으로 높였으며 PJT의 섭취 시 유의적으로 감소시켰다.

혈중 총 콜레스테롤의 함량이 높아지면 관상 동맥질환이나 지방대사에 이상이 생긴 것으로 간주 될 수 있다(Park *et al.*,

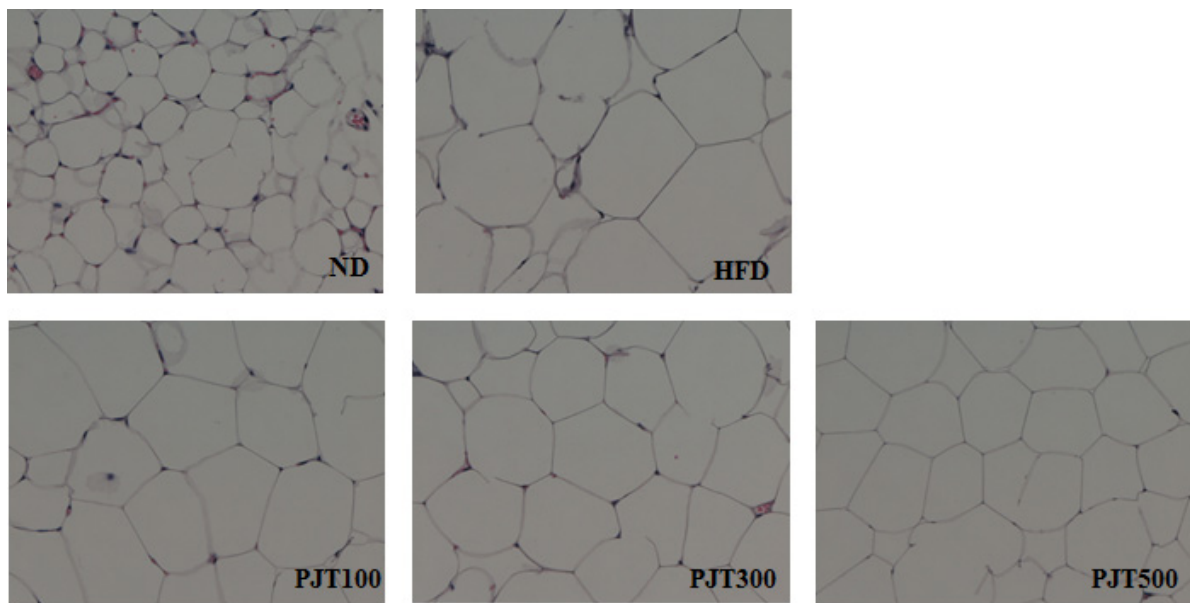


Fig. 5. Effects of PJT on size of adipocyte in mice fed a high-fat-diet (200X). PJT; *Peucedanum japonicum* Thunberg L.

Table 3. Effect of PJT on serum biomarker in mice fed a high-fat-diet^z

Item	Normal	HF	PJT100	PJT300	PJT500
TG (mg/dl)	130.80 ± 7.10 ^a	169.67 ± 8.29 ^c	162.25 ± 4.78 ^{bc}	160.75 ± 7.02 ^{bc}	143.67 ± 9.35 ^{ab}
TC (mg/dl)	93.00 ± 4.18 ^a	191.33 ± 11.19 ^c	190.00 ± 11.96 ^c	170.80 ± 14.23 ^{bc}	148.00 ± 4.84 ^b
HDL-C (mg/dl)	46.40 ± 7.10 ^a	51.92 ± 8.29 ^{ab}	56.20 ± 4.78 ^{bc}	57.40 ± 7.02 ^{bc}	60.05 ± 9.35 ^c
HTR ^y (%)	50.22 ± 5.76 ^c	27.38 ± 2.28 ^a	27.43 ± 2.31 ^a	34.07 ± 5.23 ^a	42.14 ± 4.71 ^b

^zMean ± SD. ^{abc}Means not sharing a common letter are significantly different between groups based on one-way ANOVA with Duncan's multiple-range post hoc test at $p < 0.05$.

^yHTR = (HDL-cholesterol/total cholesterol) × 100.

2013). 정상식이군에 비하여 고지방식이군의 총콜레스테롤 함량은 약 2배정도 증가되었으며 PJT의 섭취는 이를 감소시키는 경향을 나타냈으며 특히 PJT500군에서는 유의적인 감소를 보였다. HDL 콜레스테롤의 경우 정상식이군과 고지방식이군사이의 유의적인 차이는 없었으나 PJT 섭취시 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 총 콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤 비는 정상식이군에 비하여 고지방식이군이 유의적으로 낮아졌으며 PJT 섭취시 이를 유의적으로 높였다. HDL 콜레스테롤은 혈액 중의 동맥경화를 일으키는 저분자 콜레스테롤을 제거하여 간으로 이동시키는 역할을 하는 좋은 콜레스테롤로 알려져 있어 PJT의 섭취가 혈중 콜레스테롤 농도 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

Leptin은 지방세포에서 분비하는 사이토카인으로, 식욕을 억제하고 포만감을 느끼게 하는 호르몬으로 식욕과 에너지 대사를 조절하며, 비만인 경우 leptin의 분비량이 증가하는 것으로 알려져 있다(Friedman *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2014). 혈중 leptin 농도는 체지방량을 나타내는 지표로 비만연구에 많이 사용되고 있다(Caro *et al.*, 1996). 반대로, adiponectin은 비만한 사람에게서 그 발현양이 감소하며, 식욕조절 및 염증을 감소시키며 인슐린 민감도를 촉진시키는 호르몬으로 알려져 있다(Goldfine *et al.*, 2003; Gil *et al.*, 2008). 또한, 내장지방이 많을수록 더 높은 그 발현양은 나타내며, 이는 심혈관계 질환의 위험을 증가시키는 것으로 보고되어 있다(Pireiro *et al.*, 2005). 정상식이군과 고지방식이군에서 leptin의 농도는 감소하였으며 이를 PJT 섭취가 농도 의존적으로 감소시켰다. 반면, 정상식이군에 비해 고지방식이가 감소된 adiponectin의 농도를 PJT의 섭취가 농도 의존적으로 증가시키는 경향을 나타내었다. 이는

PJT의 섭취가 고지방섭취로 인하여 발생하는 이상지질혈증 및 adipokine의 변화를 개선시키는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

비만 동물모델에서 PJT 유전자 발현

PJT의 섭취가 지방 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 지방 조직에서 sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), FAS, acyl-CoA carboxylase (ACC), PPAR γ 등의 유전자 변화를 살펴보았다(Fig. 6). 지방합성이 일어나는 동안 SREBP-1c과 FAS와 같은 지질 생성 관련 유전자의 발현이 증가하게 되고 SREBP-1c는 ACC와 FAS 같이 지방산 합성을 조절하는 여러 유전자의 발현을 제어함으로써 지방산 합성을 유도하게 된다(Foretz *et al.*, 1999). 고지방식이군의 지방조직에서 SREBP-1c, FAS, ACC, PPAR γ 의 발현이 증가한 반면 PJT의 섭취군에서는 감소하였다. 이것은 앞에서 관찰된 지방조직 무게 및 지방세포 크기 감소가 지방생성 유전자의 발현과 크게 연관되어 있음을 나타내고 있다.

지방조직에서 다량 발현하는 PPAR γ 는 지방세포 분화과정 중 초기단계에 그 발현이 증가되며, 이는 lipogenic gene 발현을 촉진시킨다. 또한 PPAR γ 는 SREBP-1c에 의하여 조절되며, SREBP-1c는 ACC, FAS 등과 같이 지방산 합성을 유도하게 된다(Ryu *et al.*, 2011). 최근 연구에 따르면, 마우스의 leptin 처리시 SREBP-1c의 발현이 감소되었으며, 이로 인하여 감소된 SREBP-1c의 발현이 지방산 합성 억제에 영향을 미칠 것으로 사료된 연구결과가 보고되었다(Soukas *et al.*, 2000). 이는 leptin과 지방합성 관련 유전자와의 연관성을 제시한 것으로, 본 연구에서도 PJT 섭취에 따른 leptin 농도의 감소는 SREBP-1c와 PPAR γ 의 발현을 조절하고, 그 결과 지방산 합성에 관여하는

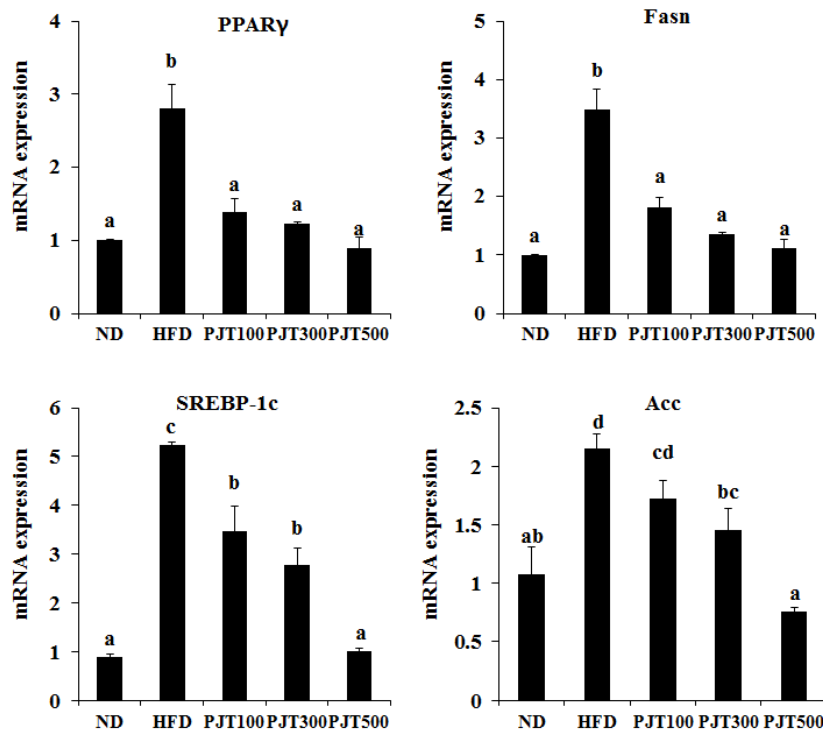


Fig. 6. Effects of PJT on lipogenesis related gene expression in mice fed a high-fat-diet. The values are expressed as the means \pm S.E. ^{abc}Means not sharing a common letter are significantly different between groups based on one-way ANOVA with Duncan's multiple-range post hoc test at $p < 0.05$. PJT; *Peucedanum japonicum* Thunberg L.

FAS 발현 억제에 영향을 미친 것으로 사료된다.

이러한 점을 미루어볼 때, PJT의 섭취는 지방생성 관련 유전자를 조절하여 지방세포의 증식과 분화기능을 억제함으로써 체내 지방 형성과 축적을 저해하는 것으로 사료되며, 본 연구결과는 PJT가 항비만 식품으로서의 가능성이 있음을 나타낸다. 향후, PJT에 함유된 생리활성 물질 규명에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 식방풍잎(PJT) 물추출물의 항비만 효과를 알아보기 위해 지방전구세포인 3T3-L1과 5주령된 C57BL/6 수컷 쥐를 이용하여 실험을 실시하였다. 먼저, 3T3-L1 분화실험에서는 PJT를 처리함으로써 지방세포 형성 관련 인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 유전자를 억제하였고, 그로 인하여 지방세포의 분화 및 지방 축적을 억제하였다. 다음으로, 동물실험은 C57BL/6 수컷 쥐 30마리를 1주일간 적응시킨 후 정상식이군 고지방식이군으로 나눈 뒤 2주간 사육하여 다시 고지방식이군은 고지방식이군, PJT100, PJT300, PJT500 군으로 나누어 4주간 실시하였

다. 체중 및 체중증가량은 고지방식이군에서 유의적으로 증가하였으며, PJT 섭취군에서 감소하였다. 지방조직의 무게도 고지방식이군에 비하여 PJT 섭취군에서 낮았다. 고지방 식이에 의한 혈청 중 지질함량, leptin 수준 증가는 PJT 섭취에 따라 낮아졌다. 반면, adiponectin 과 HDL-C 수준감소는 PJT 섭취에 따라 증가하였다. H&E staining으로 관찰한 지방세포의 크기도 PJT 섭취 시 감소하였으며 부고환 지방조직에서 관찰한 지방생성 관련 유전자인 PPAR γ , SREBP-1c, FAS의 발현은 고지방식이군과 비교시 PJT 섭취군에서 억제되었다. 이상의 실험결과 PJT의 섭취는 지방전구세포 및 고지방식이로 유도된 비만모델에서 지방합성관련인자의 유전자 발현을 감소하고 혈중 adipokine의 농도를 개선시켜 체지방 축적을 억제시켰다. 이로 인해 고지방식이로 유도된 체중을 감소시키고 더불어 이상지질혈증에도 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 농림수산식품부 기술사업화지원사업(IPET, 814002-03-1-HD020)에 의해 이루어진 것이다.

References

- Ahmadian, M., J.M. Suh, N. Hah, C. Liddle, A.R. Atkins, M. Downes and R.M. Evans. 2013. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* 19:557-566.
- Caro, J.F., M.K. Sinha, J.W. Kolaczynski, P.L. Zhang and R.V. Considine. 1996. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 45:1455-1462.
- Foretz, M., C. Guichard, P. Guichard and F. Foufelle. 1999. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:12737-12742.
- Fox, K.E., Fankell, D.M. Erickson, P.F. Majka, S.M. J.T. Crossno and D.J. Klemm. 2006. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. *J. Biol. Chem.* 281:40341-40351.
- Friedman, J.M and J.L. Halaas. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770.
- Gil, J.H., J.A. Lee, J.Y. Kim and Y.M. Hong. 2008. Leptin, adiponectin, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in obese adolescents. *Korea. J. Pediatrics* 51:597-603.
- Goldfine, A.B. and C.R. Kahn. 2003. Adiponectin: linking the fat cell to insulin sensitivity. *Lancet* 362:1431-1432.
- Hamm, J.K., B.H. Park and S.R. Farmer. 2001. A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 276:18464-18471.
- Jung, H.A., H.J. Jung, H.Y. Jeong, H.J. Kwon and J.S. Choi. 2014. Phlorotannins isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* exert anti-adipogenic activity on 3T3-L1 adipocytes by downregulating C/EBP α and PPAR γ . *Fitoterapia* 92:260-269.
- Jung, H.J., J.H. Park and M.J. Kim. 2015. Ethanol extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaves inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J. Plant Res.* 28:582-590 (in Korean).
- Kim, J.Y., M. Shin and Y.R. Heo. 2014. Effects of stabilized rice bran on obesity and antioxidative enzyme activity in high fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43:1148-1157 (in Korean).
- Morrison, R.F. and S.R. Farmer. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Nutr.* 130:3116S-3121S.
- Nagai, H., T. Tanaka, T. Goto, T. Kusudo, N. Takahashi and T. Kawada. 2014. Phenolic compounds from leaves of *Casimiroa edulis* showed adipogenesis activity. *Biosci. Biotech. Bioch.* 78:296-300.
- Park, S.J., Y.J. Jeon, H.J. Kim and J.S. Han. 2013. Anti-obesity effects of *Ishige okamurae* extract in C57BL/6J mice fed high-fat diet. *Korean J. Food.* 45:199-205 (in Korean).
- Park, Y.M., J.H. Lim and E.W. Seo. 2015. Anti-obesity effect of by-product from soybean on mouse fed a high fat diet. *Korean J. Plant Res.* 28:168-177 (in Korean).
- Pireiro, R., M.J. Iglesias, R. Gallego, K. Raghay, S. Eiras, J. Rubio, Y. Matsuzawa, T. Funahashi, S. Kihara and I. Shimomura. 2004. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:29-33.
- Reagan-Shaw, S., M. Nihal and A. Mihal. 2007. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22:65-661.
- Roncari, D.A., D.C. Lau and S. Kindler. 1981. Exaggerated replication in culture of adipocyte precursors from massively obese persons. *Metabolism* 30:425-427.
- Rosen, E.D. and O.A. Macdougald. 2006. Adipocyte differentiation from the in side out. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:885-896.
- Ryu, H.J., M.Y. Um, J.Y. Ahn, C.H. Jung, D. Huh, T.W. Kim and T.Y. Ha. 2011. Anti-obesity effect of *Hypsizigus marmoreus* in high fat-fed mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40:1708-1714 (in Korean).
- Schrffler, A., J. Schrlmerich and C. Bchler. 2005. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 6:273-280.
- Sim, M.O., J.R. Ham, H.I. Lee, K.I. Seo and M.K. Lee. 2014. Long-term supplementation of umbelliferone and 4-methylumbelliferone alleviates high-fat diet induced hypertriglyceridemia and hyperglycemia in mice. *Chem. Biol. Interact.* 216:9-16.
- Sim, M.O., H.I. Lee, J.R. Ham, K.I. Seo and M.K. Lee. 2015. Long-term supplementation of esculetin ameliorates hepatosteatosis and insulin resistance partly by activating AdipoR2-AMPK pathway in diet-induced obese mice. *J. Fuct. Foods* 15:160-171.
- Soukas, A., P. Cohen, N.D. Succi and J.M. Friedman. 2000. Leptin specific patterns of gene expression in white adipose

tissue. *Genes Dev.* 14:963-980.

Yang, J.Y., M.A. Della-Fera, S. Rayalam, S. Ambati, D.L. Hartzell, J.H. Park and C.A. Baile. 2008. Enhanced inhibition

of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci.* 82:1032-1039.

(Received 22 September 2015 ; Revised 7 December 2015 ; Accepted 16 December 2015)