

고지방 식이로 유도된 비만 생쥐에서 쑥부쟁이 에탄올 추출물의 항비만 효과

이호재 · 김현식¹ · 서상완*

호남대학교 한방바이오학과, 1: 한국기초과학지원연구원

Anti-obesity Effect of *Aster Yomena* Ethanol Extract in High Fat Diet-induced Obese Mice

Ho Jae Lee, Hyun Sik Kim¹, Sang Wan Seo*

Department of Oriental Medicine & Biotechnology, Honam University,

1: Mass Spectrometry & Advanced Instrumentation Group, Korea Basic Science Institute

Aster yomena (AY) have been used as a traditional medicine to treat cough, bronchial asthma, and insect bites in Korea. In this study, we evaluated the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells and in high-fat diet (HFD)-induced obese mice by AY ethanol extract. Lipid accumulation measurement indicates that AY markedly inhibited adipogenesis in a dose-dependent manner. qRT-PCR results demonstrated that the mRNA expression of adipogenic transcription factors such as peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) in 3T3-L1 cells were significantly down-regulated by AY treatment. And inhibited the expression of FAS, a protein responsible for lipid synthesis, transport and storage. Oral administration of AY (100, 250, and 500 mg/kg, P.O/daily for 4 weeks) was conducted in high-fat diet induced obese mice and C57BL/6 mice. AY was orally administered for 4 weeks to extract liver and epididymal fat, and hematoxylin and eosin staining(H&E staining) was observed. Observation showed that the fat concentration of liver tissue tended to decrease dose-dependently and decreased significantly at 500 mg/kg concentration. The AY-administered group of HFD-induced mice had a lower body weight gain, along with decreased triglycerides and total cholesterol compared with the control mice, however, the HDL-cholesterol/total cholesterol ratio was increased. These results indicate that AY exhibits anti-obesity effects in obese mice by decreasing in serum lipid levels and lipogenesis related gene.

keywords : *Aster Yomena*, Obesity, 3T3-L1, PPAR γ , FAS, C57/BL6

서 론

비만은 체내에 지방이 과다하게 축적되어 있는 상태로서 외관상의 문제뿐 아니라 각종 성인병을 유발시키는 독립적 위험인자로 인식되고 있다. 비만은 지방간, 고지혈증, 골관절염, 담석증, 고혈압, 당뇨병, 심혈관계 질환 등의 발생요인이며 남성에 있어서는 전립선암, 직장암, 대장암과 관련이 있고, 여성에 있어서는 유방암, 난소암, 자궁암과 관련이 있어 공중보건학적으로 매우 중요하다¹⁾. 특히 비만으로 인한 과체중은 심장질환의 중요 위험요소로 알려져 있으며, 심장의 구조와 기능에 큰 영향을 미칠 수도 있음이 보고되고 있고 비만 사망의 중요 원인 중 하나인 심부전증을 유발하기도 한다²⁾. 따라서 질병예방 및 건강증진의 차원에서 그 중요성이 커지

고 있다. 쑥부쟁이(*Aster Yomena*)는 국화과(Asteraceae)에 속하는 다년생 초본이며 한국, 중국, 일본 및 시베리아 등지에 널리 분포하며, 우리나라 에서는 제주도와 남부지방, 중부지방의 산야지 약간 습기 있는 지역, 울릉도 산지 등 전국에서 자생한다. 높이는 높이 1~1.5 m로 근경이 옆으로 자란다. 잎은 호생하고 장타원형이며 끝이 뾰족하고 뒷면에 선점이 있으며 가장자리에 불규칙한 톱니가 있다. 꽃은 8~9월에 피며 원줄기 끝의 산방화서에 달린다³⁾. 쑥부쟁이는 진해, 거담, 해독, 기관지염, 이뇨 등에 효과가 있다고 알려져 있으며 어린 순은 채취 후 건조하여 나물로 이용한다⁴⁾. 우리나라의 대표적인 국화과 산채인 쑥부쟁이는 그 자원이 풍부하나 지금까지의 과학적 검증을 통하여 암 예방⁵⁾, 항균활성⁶⁾ 등이 보고된 정도이며 그 밖의 생리활성 및 성분에 관한 연구는 미비한 실정

* Corresponding author

Sang Wan Seo, Department of Physiology, Department of Oriental Medicine & Biotechnology, Honam University, Eodeung-daero, Gwangsan-gu, Gwangju, 62399, Korea

E-mail : ssw@honam.ac.kr Tel : +82-62-940-5442

Received : 2017/10/24 Revised : 2017/11/28 Accepted : 2017/12/04

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2017.12.31.6.348>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

이다. 따라서 이번 연구에서는 쏘부쟁이를 비만증 개선에 활용하기 위해 항비만 효과를 실험하였다. 세포실험 및 동물실험을 통하여 쏘부쟁이 에탄올 추출물(AE)이 지방 축적과 지방 세포의 분화를 촉진시키는 전사인자 mRNA 발현량, 장기 조직 및 혈중 콜레스테롤 수치에 미치는 영향 등을 확인하였으며 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료추출 및 제조

실험에 사용한 쏘부쟁이는 구례삼촌(Guryesamchon, Gurye, Korea) 에서 구입하였다. 쏘부쟁이를 건조 한 후 건조된 쏘부쟁이 1 kg당 20 L용량의 70% 발효주정을 첨가하여 80°C 3시간 동안 3회 추출한 후 여과하여 불순물을 제거하였다. 3회 추출로 얻어진 추출물 47L를 감압농축 하였으며 농축한 시료는 Freeze dry(PVTFD20R, Ilshin, Korea)를 사용하여 동결건조를 수행하였다. 동결건조 완료 후 얻어진 파우더 227.46g (수득률 : 22.746%)를 실험 시료로 사용하였다.

2. 세포배양 및 분화유도

실험에 사용한 3T3-L1 세포는 마우스 지방전구세포로 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, 10% new born calf serum(NBCS, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)과 100 unit/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) 이 함유된 DMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 그 외 시약은 Sigma(USA)에서 구입 하였다. 3T3-L1 세포를 6 well culture plate에 1×10⁵ cell/well로 분주 후 48시간 배양 하였다. 이후 상층액을 버린 후 NBCS가 함유된 DMEM으로 채운 뒤 다시 48시간을 배양했다. 세포가 confluence 상태가 되면 preadipocyte를 제외한 모든 well에 10% FBS-DMEM에 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), 0.25 mM dexamethasone, 10 µg/ml insulin 이 첨가된 배지를 처리하여 분화를 48시간 유도 한 뒤 다시 48시간 10% FBS-DMEM에 10 µg/ml insulin이 첨가된 배지로 교체해주었다. 그 후 2일마다 10% FBS-DMEM 배지로 교체하였다. 시료의 처리는 분화유도 배지 첨가 시점부터 매회 같이 처리하였다⁷⁾.

3. 세포활성도 확인

본 실험에 사용한 쏘부쟁이 70% 에탄올 추출물이 지방세포의 세포증식억제를 나타내는지 확인하기 위하여 MTS assay를 수행하였다. MTS solution은 Promega(USA)사에서 판매하는 CellTiter96® Aqueous one solution을 사용하였다. 3T3-L1 cell을 96 well plate에 5×10³ cells/well로 분주하였으며, 10% NBCS가 함유된 DMEM을 넣어 well당 최종 용적을 100 µL로 하였다. 24시간 동안 배양한 후 추출물을 각각의 농도별(0, 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml) 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 그 후의 각각 세포 배양액 용량의 1/10배의 MTS 용해액을 첨가한 후 37°C

에서 2시간 배양 후 ELISA microplate reader(Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다⁸⁾.

4. Oil-Red O staining

앞의 분화 과정을 거친 다음 배지를 제거해서 pH 7.4 PBS로 세척하고 10% formalin 용액으로 2시간 동안 고정한 이후, 고정액 제거 후 다시 PBS로 5회 세척하였다. 완전히 건조시킨 후 Oil red O 염색액(Oil red O staining kit, sciencell, CA, USA)을 처리하여 15분간 상온에서 염색하고, 염색액을 제거한 후 물로 5회 세척한 다음 Microscope(Nikon TS100, Tokyo, Japan)로 관찰하였다. 또한, 흡광도 측정을 위하여 100% isopropyl alcohol로 염색된 지방구를 용출시켜 ELISA microplate reader(Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다⁹⁾.

5. Quantitative RT-PCR

분화유도를 마친 cell을 TriZol Reagent를 well당 1ml씩 이용해 걷어낸 후 1.5 ml Tube에 넣고 200 µL의 chloroform을 넣고 vortexing 해준 후 13500rpm/4°C/10min의 조건으로 원심 분리하여 층을 나눠준 후 상층액 500 µL를 걷어 다른 1.5 mL Tube에 넣고 같은 용량의 isopropanol을 첨가하여 조심히 섞어준 뒤 전과 같은 조건으로 원심분리를 하였다. 원심분리가 끝나면 상층액을 버리고 DEPC-treated water로 dilution한 50% Ethanol을 1 mL씩 넣고 다시 한번 원심분리 후 Ethanol을 버리고 Dry시켰다. Ethanol을 완전히 건조 시킨 뒤 DEPC-treated water를 30 µL씩 넣고 꼼꼼히 vortexing한뒤 nanodrop plate(TECAN, Schweiz)를 이용해 RNA를 정량한 뒤 10 µL를 PCR Tube에 넣고 High capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems, USA)를 10 µL 첨가해 3시간동안 cDNA를 합성했다. 합성한 cDNA 1 µL에 Primer 1 µL, DEPC-treated water 8 µL, TaqMan® Universal Master Mix II(Thermo, USA) 10 µL를 첨가한 뒤 ABI 7300 Real-Time PCR을 이용해 qRT-PCR을 수행하였다¹⁰⁾. Primer는 Thermo Fisher(USA)사의 Hprt (TaqMan® Mm 03024075_m1 4331182), Ppar-γ (TaqMan® Mm00440940_m1 4331182), FAS (TaqMan® Mm012049774_m1 4331182)를 사용하였다¹¹⁾.

6. 실험동물 디자인 및 실험식이 조성

실험동물은 6주령 된 C57BL/6 마우스를 샘타코(SAMTAKO, Korea, Osan)로부터 구입하였다. 마우스는 1주간 고형식으로 적응시킨 후 난괴법에 의하여 일반식이군(Normal)과 고지방식이군으로 나누어서 5주간 사육하였다. 그 뒤, 고지방군은 다시 난괴법에 의하여 고지방대조군(HF), 고지방-쏘부쟁이(100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg)군으로 나누어 4주간 사육하였다. 동물사육실의 환경은 항온(22 ± 2°C), 항습(50 ± 5%), 12시간 간격(08:00~20:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하고 동물들은 폴리카보네이트 사육 상자에 5 마리씩 분리하여 사육하였다¹²⁾. 본 실험에 사용한 45 Kcal% fat whit 1.25% cholesterol 고지방 식이는 RESEARCH DIETS (RESEARCH DIETS, New Jersey, USA)로부

터 구입하여서 제공하였으며 물과 식이는 제한 없이 섭취하도록 하였고 체중은 매주 1회 일정시각에 측정하였으며, 식이섭취량은 매일 일정시각에 공급량에서 잔량을 감하였다.

7. 혈액검사 분석 및 장기조직 H&E staining

사육이 끝난 실험동물은 희생 전 12시간 동안 절식 시킨 후 안와정맥채혈을 통해 공복혈액을 채취하였다. 혈액은 3000 × g (4℃)에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 실험동물의 간 조직, 부고환지방 조직은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 수차례 헹군 후 표면의 수분을 제거하여 칭량하였으며, 일부분을 잘라 -70 ℃에 보관하고, 나머지 부분을 Formalin solution, neutral buffered, 10% 용액에 넣어 보관 하였다. 용액에 넣어 보관한 장기들은 H&E(Hematoxylin and Eosin) stain을 하였고 H&E stain한 장기 조직은 Microscope(Nikon Coolscope2, Tokyo, Japan)로 관찰하였다. 혈액검사는 혈청 중의 total cholesterol(TC), high density lipoprotein cholesterol(HDL-C), triacylglycerol(TG)은 kit(Asan Pharm, Korea)를 이용하여 분석을 하였다.

8. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치 ± 표준편차(mean ± S.D.)로 나타내었으며, 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS(18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 동물실험은 일원변량분석(One way ANOVA)을 실시하였다. 유의성이 있는 경우, p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결 과

1. 3T3-L1 preadipocyte의 증식에 미치는 AY의 영향

썩부쟁이가 3T3-L1 preadipocyte의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 100, 200, 300, 400 그리고 500 µg/mL 농도의 썩부쟁이 70% 에탄올 추출물(AY)을 48시간 동안 처리한 다음 MTS assay를 실시한 결과는 Fig. 1. 에 나타내었다. 결과에서 볼 수 있듯이 모든 농도에서 세포 증식 억제 효과가 나타나지 않았다.

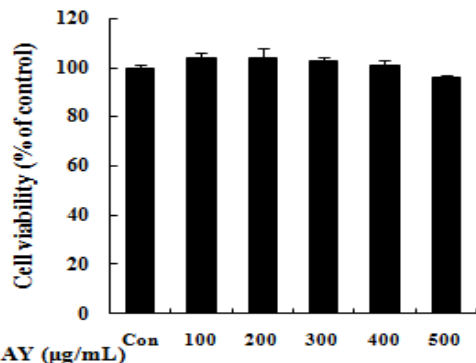


Fig. 1. Effects of cell viability on AY of preadipocyte. The values are expressed as the means ± S.D.

2. Lipid droplet 생성에 미치는 AY의 영향

AY가 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제시키는지 확인하기 위해 지방세포로의 분화를 유도 시킨 후 분화가 유도되는 동안 세포에 AY를 50, 100, 250 그리고 500 µg/mL을 처리하고 Oil Red O 시약을 이용하여 염색을 실시하였다. 현미경 사진 관찰 결과 붉은색으로 염색된 지방구가 AY농도 의존적으로 감소된 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 또한 Oil Red O 시약으로 염색된 cell의 염색약을 추출한 값 역시 모든 농도에서 통계적으로 유의적인 차이를 나타냈으며, 이를 바탕으로 AY가 지방전구세포의 분화를 억제하는 것을 확인 할 수 있었다.

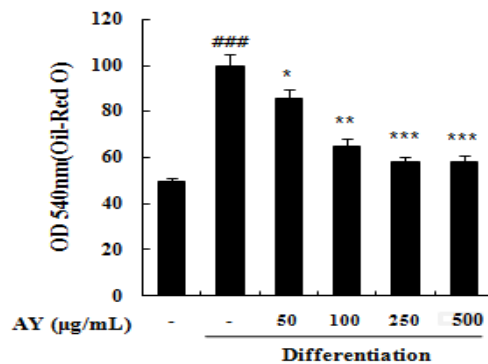
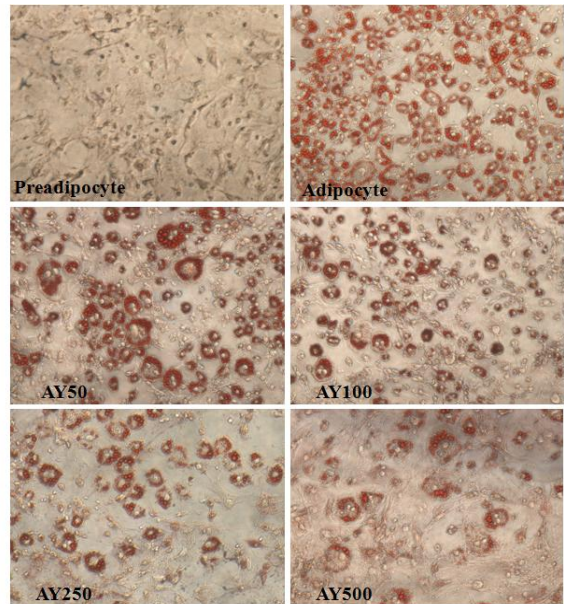


Fig. 2. Effects of AY on lipid droplet accumulation of differentiated 3T3-L1. The values are expressed as the means ± S.D. and significantly different between groups according to Student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 AY treated group versus adipocyte, ###P < 0.05 preadipocyte versus adipocyte.

3. Adipogenic transcription factors 및 adipocyte expressed genes의 발현에 미치는 AY의 영향

Adipogenesis의 핵심 조절자로 불리는 PPAR-γ는 서로 상호 작용하여 상승 효과를 나타내어 최종적으로 분화과정을 완성하게 되며¹³⁾, 그 결과로 백색지방세포에서 나타나는 lipid droplet 생성 및 triglyceride의 축적과 함께 세포의 크기 증가 등과 같은 형태

적 특징과 같은 adipocyte expressed genes의 발현을 유발함으로써 지방세포의 특징을 지니게 된다¹⁴). 먼저 adipogenic transcription factors의 발현 정도를 확인한 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 분화를 유발하였을 경우 PPAR- γ 의 발현이 현저하게 증가하였지만 AY의 처리에 의하여 농도 의존적인 감소가 유발되었다. AY50에서는 발현이 억제되지 않았지만 AY100, AY250, AY500에서는 눈에 띄게 감소한 것을 확인할 수 있다. 또한 adipocyte expressed genes인 FAS 경우에도 Fig. 3에서와 같이 adipocyte에서 FAS가 발현된 것을 확인하였고 AY50에서는 발현량 감소가 거의 보여지지 않았지만 AY100, AY250 그리고 AY500에서는 AY처리에 의하여 현저하게 감소하였음을 확인하였다.

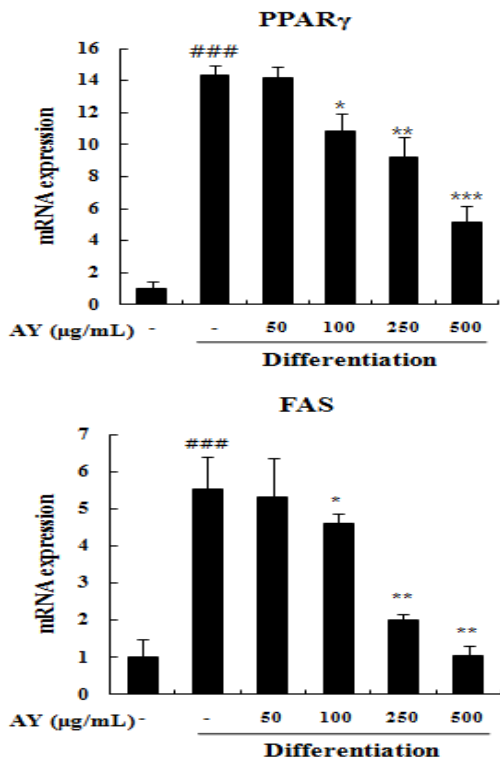


Fig. 3. Effects of AY on adipogenic transcription factors and adipocyte expressed genes expression of differentiated 3T3-L1. The values are expressed as the means \pm S.D. and significantly different between groups according to Student's t test. ** P < 0.01, *** P < 0.001 AY treated group versus adipocyte,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

4. 고지방식으로 유도된 비만 모델에서 체중에 미치는 AY의 영향

체중 변화 및 체중 감소량에 대한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 고지방식을 섭취한 군은 정상 식이군에 비해 유의적으로 체중 증가가 유도되었으며, AY를 섭취한 군에서 체중이 감소하는 경향을 나타냈다. AY의 섭취는 고지방식으로 유도된 비만 모델에서 체중을 감소함으로써 비만에긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

5. 고지방식으로 유도된 비만 모델에서 간 및 부고환지방의 중량에 미치는 AY의 영향

고지방식이 섭취는 간에 중성지방 및 콜레스테롤 등의 축적을

일으켜 간 중량을 증가 시킨다^{15,16}). 본 실험 결과에서 간 무게는 고지방 식이의 영향으로 HF군이 Normal군에 비하여 유의적으로 증가하였으며, 이는 고지방식이에 의해 간 내에 콜레스테롤 및 중성 지방 등이 축적 된 것으로 사료된다. 간 무게가 AY 섭취군들에서 유의적으로 감소하였다. 고지방식이의 섭취로 인한 지방조직의 중량 증가는 지방조직에 중성지방이 축적되어 발생하며 복부지방 함량이 증가할수록 대사성 질환 위험 역시 증가된다고 알려져 있다¹⁴). 중성지방의 저장고인 부고환 지방조직의 무게를 살펴보면 정상군에 비하여 HF군이 유의적으로 증가하였으며, AY 섭취군들에서는 유의적으로 감소하였다.

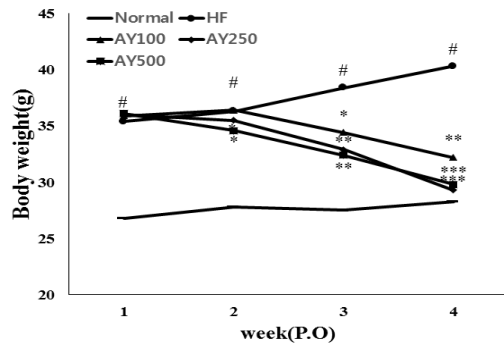


Fig. 4. Effects of AY on body weight change in mice fed a high-fat-diet. The values are expressed as the means \pm S.D. # P < 0.05 versus CON group. * P < 0.05 versus HF group, ** P < 0.01 versus HF group, and *** P < 0.001 versus HF group.

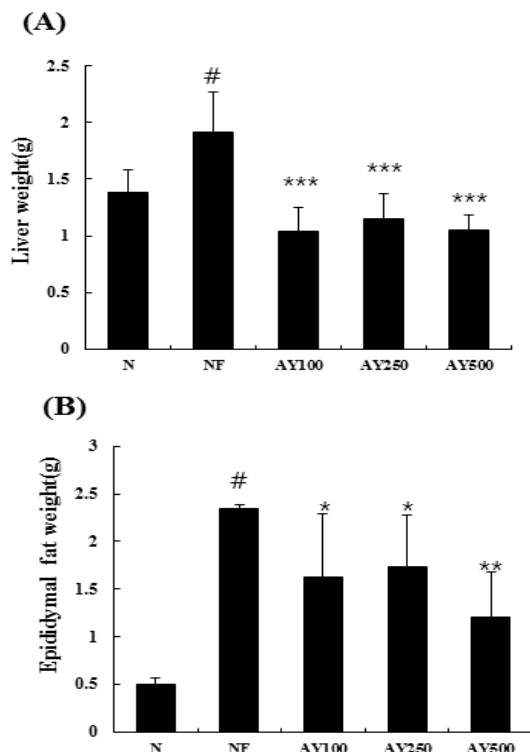


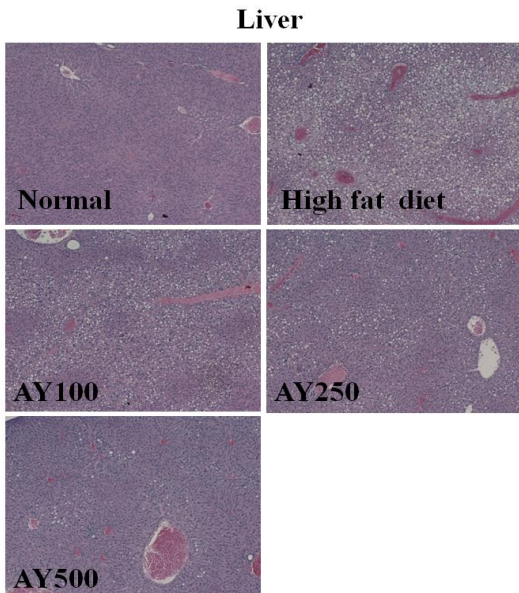
Fig. 5. Effects of AY on liver weight (A) and epididymal fat weight (B) in mice fed a high-fat-diet. The values are expressed as the means \pm S.D. # P < 0.05 versus CON group. * P < 0.05 versus HF group, ** P < 0.01 versus HF group, and *** P < 0.001 versus HF group.

6. 고지방식으로 유도된 비만 모델의 장기조직 세포에 미치는 AY의 영향

AY의 섭취가 mouse의 지질대사 조절 기관에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 간 조직의 H&E (Hematoxylin and Eosin) staining을 진행하였다(Fig. 6). 실험 결과 정상식이군 의 간 조직에 비해 고지방식이군 (HF)의 간 조직에서 더 크고 많은 lipid droplet의 흔적들을 확인할 수 있었다. 이들은 비만으로 인하여 간에 축적된 droplet으로, HF군과 비교하여 AY을 투여한 군의 간에서 감소하였고 특히 AY500에서는 droplet이 현저하게 감소한 것을 확인했다. 간의 조직학적 변화로 포화지방산을 대량 포함하고 있는 콜레스테롤의 함량이 높은 고지방사료를 섭취시킨 HF군의 간은 지방의 축적이 광범위하고 명확하게 관찰되었으나, AY의 투여에 의해 지방축적의 감소를 보여 AY이 간조직의 재생과 지방의 배출효과가 있음을 확인하였다. 부고환지방 조직에서도 HF군의 지방세포 크기가 일반식이군의 지방세포 크기보다 큰 것을 확인할 수 있다. AY을 투여한 경우 지방세포의 크기가 감소하는 것을 확인하였다.

7. 고지방식으로 유도된 비만모델에서 혈중 지질함량 및 혈중 콜레스테롤 수치에 미치는 AY의 영향

혈액내의 지질 농도 분석 결과는 Table 1에 나타내었다. 혈청 내 TG 함량은 고지방식이에 의해 가장 큰 영향을 받는데 고지방식이만을 섭취한 HF군에 비해 AY500에서 혈청 TG 함량이 유의적으로 감소하였다. HDL 콜레스테롤은 혈액 중의 동맥경화를 일으키는 저분자 콜레스테롤을 제거하여 간으로 이동시키는 역할을 하는 좋은 콜레스테롤로 알려져 있다¹⁷⁾. 본 연구에서는, HDL-C의 함량은 HF군과 시료 섭취군에서는 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 AY섭취가 전체 콜레스테롤 중 HDL-C의 비율을 증가시킴으로써 혈중 콜레스테롤 농도 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 결과적으로 AY의 섭취는 전체 콜레스테롤 중 HDL-C의 비율을 증가시키고 TG함량을 낮춤으로써 고지방식으로 유도된 고지혈증에 개선에 효능이 있는 것으로 판단된다.



Epididymal fat

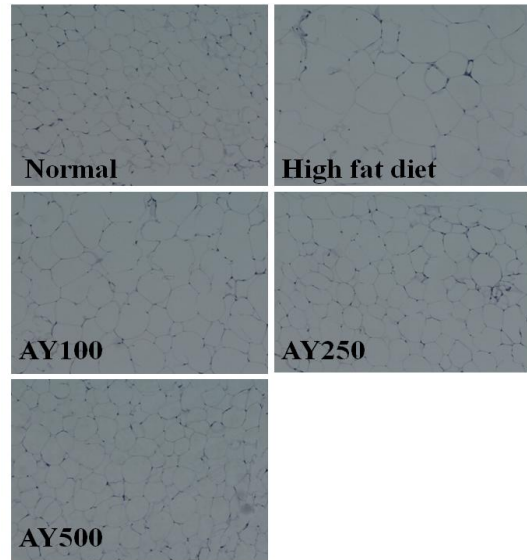


Fig. 6. Histologic Observations of Liver and Epididymal Fat Tissues in AY Treated HF-Induced Mice Hematoxylin and eosin (H & E) staining (× 100).

Table 1. Effect of AY on plasma biomarkers in mice fed a high-fat-diet

	Normal	HF	AY100	AY250	AY500
TG (mg/dL)	113.3±11.98 ^a	143.11±3.96 ^c	133.31±5.41 ^{bc}	133.44±3.12 ^{bc}	123.76±2.53 ^b
TC (mg/dL)	151.81±9.65 ^a	222.91±20.18 ^c	206.8±0.22 ^{bc}	179.64±5.37 ^b	169.54±28.67 ^b
HDL-C (mg/dL)	75.18±2.42 ^a	117.24±1.19 ^c	116.51±3.55 ^c	112.58±7.88 ^{bc}	114.06±9.71 ^{bc}

Mean ± SD. a-cMeans 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.

고찰

비만은 시대적 상황으로 보았을 때, 과거에는 미용 목적으로 비만을 해소하려 했거나 또는 비만자체를 질병으로 인식하여 치료하려던 부분은 별로 없었다. 다만 과거에도 뚱뚱함은 마른 것에 미치지 못한다고 하였으며 현재에는 비만을 각종 성인병과 기타 질병의 원인으로 보고, 비만을 성인병에 귀속시켜 중요 질병으로 인식하고 있다. 우리나라는 경제발전으로 식생활이 서구화되고 일상에서 과거와 비교해 운동량이 줄어들면서 비만 발생률이 늘어나고 있는 추세이다¹⁸⁾. 비만증은 과도한 지방조직의 축적이며 이에 많은 원인 및 병리학적, 생리학적 기전이 작용하게 되는데, 결국 과도한 열량 섭취나 체내 에너지 소비 감소 혹은 양자 간의 복합적인 원인에 의해 비만증이 기인하게 된다. 의학계에서는 비만의 원인으로 식이의 문제, 내분비 장애, 유전적 요인, 심리적 요인, 시상하부의 이상 및 약물의 부작용 등으로 인해 비만증이 초래되는 것으로 보고 있으나 대부분의 경우 특별한 원인 없이 식이적인 문제 또는 운동부족으로 인해 발생하는 단순성 비만이 비만 발생의 90%이상을 차지하고 있다. 지방축적은 지방세포의 과형성과 지방축적에 의한 지방세포의 비대에 의한 결과라고 할 수 있다. 지방세포의 과형성은 지방 전구세포의 증식과 분화에 의해 조절되며, 지방세포의 비

대는 지방의 합성과 지방분해의 균형에 의해 조절된다¹³⁾. 또한, 지방세포의 분화에 따라 중성지방의 합성이 증가하며 지방세포의 크기를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 즉, 지방세포의 과형성, 비대 또는 크기 증가는 식자조절로는 억제 할 수 없으므로 비만의 근본적 치료 또는 억제를 제어하기 위해서는 지방세포의 분화과정을 조절하여, 지방축적을 억제하는 것이 중요하다¹⁹⁾. 지방세포 형성 (adipogenesis) 과정에 관여하는 중요한 인자로는 peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ)가 있다²⁰⁾. PPAR- γ 는 adipogenesis과정을 조절하는 전사인자로서 이 인자의 발현은 adipogenicgene의 발현을 조절함으로써 지방조직에서 지방산 합성을 증가 시키고 중성지방을 생산한다^{21,22)}. 따라서, adipogenesis 조절에 중요한 점은 PPAR- γ 발현을 억제하는 것이다.

썩부쟁이는 항염증 효과²³⁾, 암세포증식 억제⁵⁾ 등에 관한 연구가 진행되었고 그에 따른 효능이 있다고 알려져 있다. 또한 지방부에는 8종의 테르페노이드 성분을 함유하고 있어 중요한 식물자원으로서 사용할 수 있다고 보여 진다²⁴⁾. 지방전구세포인 3T3-L1 cell을 이용하여 MTS assay를 수행한 결과 썩부쟁이 에탄올 추출물을 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 군에서 96.1%의 높은 생존율을 보였다. 이에 근거하여 농도를 50, 100, 250 그리고 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 설정하고 실험을 진행하였다. 3T3-L1 cell을 이용한 지방분화유도 실험에서 Oil-Red O staining을 한 결과 육안으로 확인 가능할 정도로 지방 축적이 감소되었으며 isopropanol을 이용해 염색을 제거한 후 흡광도를 측정한 결과에서도 adipocyte를 100% 기준으로 잡았을때 preadipocyte는 49.3%, AY-E70을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 군에서는 85.6%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 군에서는 65.1%, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 군에서는 58.3%, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 군에서는 57.9%까지 감소하여 농도 의존적으로 지방축적이 확연히 감소한 것을 확인할 수 있다. 이를 바탕으로 AY가 지방전구세포의 분화를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. PPAR- γ , Fatty acid synthase (FAS)의 유전자 발현을 확인하였다. 지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 과정은 많은 종류의 지방세포분화 관련 전사인자들의 단계적인 조절에 의하여 유발되며, 새로운 비만치료제들은 이러한 전사인자들을 조절하여 분화를 억제하는 기전을 주요한 타겟으로 가진다²⁵⁾. AY에 의한 지방축적 감소가 어떤 분자생물학적 메커니즘에 의해 유도되는지 확인하기 위해 qRT-PCR에서는 Adipogenesis의 핵심조절인자 PPAR- γ 와 adipocyte expressed genes인 FAS의 발현량을 확인하였다. 확인 결과 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 군에서는 PPAR- γ 와 FAS 모두 발현량이 감소하지 않았으나 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 유의적으로 발현량이 감소하는 것을 확인하였다. 고지방식으로 비만을 유도한 마우스 모델은 일반식이군 (Normal), 고지방식이군(HF), AY 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 투여군(AY100), AY 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 투여군(AY250), AY 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 투여군(AY500)으로 나누어 각각 5마리씩 사육하여 실험에 사용하였다. 투여가 끝난 후 12시간 동안 절식 시킨 다음 안와채혈을 통해 공복혈액을 채혈하였다. 채혈 후 바로 회복하여 간 및 부고환지방 조직을 채취하였으며 H&E staining을 통해 조직을 관찰하였다. 비만과 내장지방의 축적은 혈중 지질함량을 변화시키고 지방조직에서의 adipokine의 분비에 영향을 주게 되며 이는 인슐린 저항성 및 비알코올성 지방

간 등에 영향을 줄 수 있다²⁶⁾. 관찰결과 일반식이군의 간 조직에 비해 고지방식이군의 간조직에 더 크고 많은 lipid droplet의 흔적을 발견했으며 이는 지방간이 정상적으로 유도되었음을 보여준다. 약물을 처리한 군들의 경우 고지방식이군에 비하여 lipid droplet이 농도 의존적으로 감소하였으며 특히 AY500군에서는 상당부분이 감소된 것을 확인 할 수 있다. 부고환지방조직 또한 고지방식이군에 비하여 약물처리군 지방구의 크기가 현저히 감소된것을 확인하였다.

혈중 총 콜레스테롤의 함량이 높아지면 관상 동맥질환이나 지방대사에 이상이 생긴 것으로 간주 될 수 있다²⁷⁾. 채취한 혈액을 이용해 혈청을 분리하여 TG, TC, HDL-C의 농도를 확인한 결과 고지방식이군의 중성지방, 총콜레스테롤, 고밀도 콜레스테롤이 일반식이군에 비하여 유의성 있게 늘어난 것을 볼 수 있으며 이는 비만이 정상적으로 유도되었음을 보여준다. 고지방식이군과 약물처리군의 총콜레스테롤 및 고밀도콜레스테롤 수치 확인결과 총콜레스테롤의 양은 농도 의존적으로 줄었지만 고밀도 콜레스테롤의 양은 미약하게 줄어든 것을 확인 할 수 있는데 이는 결과적으로 체내에 고밀도 콜레스테롤이 많이 남아 HDL-C의 비율을 증가시키고 TG 함량을 낮춤을 나타낸다. HDL 콜레스테롤은 혈액 중의 동맥경화를 일으키는 저분자 콜레스테롤을 제거하여 간으로 이동시키는 역할을 하는 좋은 콜레스테롤로 알려져 있어 AY의 섭취가 혈중 콜레스테롤 농도 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 썩부쟁이 에탄올 추출물은 지방축적 및 그에 관여하는 Cytokine을 억제하여 비만치료 및 예방에 도움을 줄 것으로 보여지며 나아가 고지혈증 및 콜레스테롤 개선에도 효과가 있을 것으로 판단된다. 따라서 이러한 결과는 추후 비만연구에 썩부쟁이가 가지는 항비만 반응의 메커니즘 분석에도 매우 중요한 기초자료가 될 것이다.

결론

본 연구에서는 썩부쟁이 에탄올 추출물이 체지방 축적에 미치는 영향을 확인하기 위하여 지방전구세포인 3T3-L1 cell과 고지방식으로 비만을 유도한 C57/BL6 마우스를 통해 실험을 진행하였으며 이에 대한 다음과 같은 결론을 얻었다.

3T3-L1 cell에 AY를 다양한 농도로 처리한 뒤 MTS assay를 수행한 결과 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 군에서 96.1%의 높은 생존율을 보였다.

지방분화를 유도하여 농도별로 AY를 처리한 뒤 Oil-Red O staining을 하여 염색 시킨뒤 다시 염색을 제거해 그 용액의 흡광도를 측정하였다. 측정결과 AY를 처리하지 않은 adipocyte에 비해 AY를 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 군에서는 85.6%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 군에서는 65.1%, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 군에서는 58.3%, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 군에서는 57.9%까지 농도 의존적으로 지방축적을 감소시키는 것을 확인하였다.

C57/BL6 마우스를 고지방식이를 5주간 투여해 비만을 유도하였고. 일반식이군, HF군, AY100, AY250, AY500으로 군을 나누고 각 군당 5마리씩 실험에 사용하였다. AY의 투여는 매일 1회 경구

투여로 4주간 진행하였으며 마지막투여 이후 12시간 절식시킨 뒤 혈액과 장기를 채취하였다. 간과 부고환지방 조직에 H&E stain을 수행하여 관찰한 결과 HF군에 비해 AY를 투여한 군의 간조직은 lipiddroplet이 확연히 줄어든 것을 확인하였다. 부고환지방 조직 또한 AY를 처리한 경우 지방구의 크기가 줄어든 것을 확인하였다. 혈액을 이용하여 TG, TC, HDL-C의 수치를 검사하였다. 검사결과 HF군에 비하여 AY를 투여한 군은 TG, TC의 농도가 확연히 감소하였으며 HDL-C의 밀도가 증가한 것을 확인하였다. 이로 인해 고지방식으로 유도된 체중을 감소시키고 더불어 이상지질혈증에도 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2016년도 정부(농림축산식품부)의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업(NO.116035-32-2-HD020)의 지원을 받아 수행되었다.

References

1. Keffe EB, Adesman PW, Stenzel P, Palmel RM. Steatosis and cirrhosis in an obese diabetic. Resolution of fatty liver by fattening. *Dig Dis Sci* 1987;32:441-5.
2. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1983;May;67(5):968-77.
3. Lee, CB. Coloured flora of Korea. pp. 322. Hyangmoon-sa, Seoul, Korea. 2006.
4. Hotta, MK, Ogata, A, Nitta, K, Hosokawa, M, Yanagi and K.Yamazaki. 1989. Useful Plants of the World. Heibonsha, Tokyo, Japan. p. 125-7.
5. Jung BM, Lim SS, Park YJ, Bae SJ. Inhibitory effects on cell survival and quinone reductase induced activity of Aster yomena fractions on human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutri*.2005;34:8-12.
6. Chon SU, Kim DI, Choi YS. Assessments on insecticidal and fungicidal activities by aerial part extracts from several compositae plants. *Kor J Weed Sci*. 2003;23:81-91.
7. Sim MO, Ham JR, Lee HI, Seo KI, Lee MK. Long-term supplementation of umbelliferone and 4-methylumbelliferone alleviates high-fat diet induced hypertriglyceridemia and hyperglycemia in mice. *Chem Biol Interact*. 2014 Jun 5;216:9-16.
8. Hou J, Wang L, Long H, Wu H, Wu Q, Zhong T, Chen X, Zhou C, Guo T, Wang T. Hypoxia preconditioning promotes cardiac stem cell survival and cardiogenic differentiation in vitro involving activation of the HIF-1 α /apelin/APJ axis. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):215
9. Kraus NA, Ehebauer F, Zapp B, Rudolphi B, Kraus BJ, Kraus D. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. *Adipocyte*. 2016;5(4):351-8.
10. Sim MO, Lee HI, Ham JR, Seo KI, Lee MK. Long-term supplementation of esculetin ameliorates hepatosteatosis and insulin resistance partly by activating AdipoR2-AMPK pathway in diet-induced obese mice. *J. Fuct. Foods*. 2015.15:160-71.
11. Anghebem-Oliveira MI, Martins BR, Alberton D, Ramos EAS, Picheth G, Rego FGM. Type 2 diabetes-associated genetic variants of FTO, LEPR, PPAR γ , and TCF7L2 in gestational diabetes in a Brazilian population. *Arch Endocrinol Metab*. 2017;61(3):238-8.
12. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008Mar;22(3):659-61.
13. Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, Baile CA. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci*. 2008 May 7;82(19-20):1032-9.
14. Xu J, Wang X, Cao K, Dong Z, Feng Z, Liu J. Combination of β -glucan and *Morus alba* L. Leaf Extract Promotes Metabolic Benefits in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*. 2017;12:9(10).
15. Hamm JK1, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBP β in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):18464-71.
16. Jung HJ, Park JH, Kim MJ. Ethanol extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaves inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J. Plant Res*. 2015;28:582-590(in Korean).
17. Schriffler AJ, Schrlmerich and C. Bchler. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol*. 2005;6:273-80.
18. Kim S, Jin SH, Kim TH. A Study on etiological factors, symptoms of a disease, and treatments of obesity based on Dong-Yi Bo Gam. *Journal of Oriental Medical Classics*. 1998:125-36.
19. Nagai H, Tanaka T, Goto T, Kusudo T, Takahashi N, Kawada T. Phenolic compounds from leaves of *Casimiroa edulis* showed adipogenesis activity. *Biosci*

- Biotechnol Biochem. 2014;78(2):296-300
20. Roncari DA, Lau DC, Kindler S. Exaggerated replication in culture of adipocyte precursors from massively obese persons. *Metabolism*. 1981 May;30(5):425-7.
 21. Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr*. 2000 Dec;130(12):3116S-3121S.
 22. Rosen ED, Macdougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2006;7:885-96.
 23. Kang HJ, Jeong JS, Park NJ, Go GB, Kim SO, Park C, Kim BW, Hong SH, Choi YH. An ethanol extract of *Aster yomena* (Kitam.) Honda inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages. *Biosci Trends*. 2017;11(1):85-94.
 24. Min YD, Choi SJ, Lee KN. Terpenoids from the Aerial Parts of *Aster glehni*. *Yakhak Hoeji*. 2004;48:65~69
 25. Ryu HJ, Um MY, Ahn JY, Jung CH, Huh D, Kim TW, Ha TY. Anti-obesity effect of *Hypsizigus marmoreus* in high fat-fed mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 2011;40:1708-14.
 26. Soukas AP, Cohen ND, Succi JM, Friedman. Leptin specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev*. 2000;14:963-80.
 27. Park YM, Lim JH, Seo EW. Anti-obesity effect of by-product from soybean on mouse fed a high fat diet. *Korean J. Plant Res*. 2015;28:168-77.