

추출조건에 따른 차전초 추출물이 3T3-L1 세포의 지방 축적에 미치는 영향

정미진^{1#}, 김소영¹, 김유진¹, 이은탁², 추성태², 김한혁³, 김미려^{1*}

1: 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2: 농업회사법인(주) 이비채,
3: 경북테크노파크 첨단메디컬융합섬유센터

The effect of *Plantaginis asiaticae Folium* on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes by extraction conditions

Mi-Jin Jeong^{1#}, So-Young Kim¹, Yoo-Jin Kim¹, Eun-Tag Lee², Sung-Tae Choo²
Han-Hyuk Kim³, Mi Ryeo Kim^{1*}

1 : Department of Herbal Pharmacology, Daegu Hanny University, Daegu 42158, Korea

2 : Ebiche co. Ltd., Youngchun 38819, Korea

3 : Medical Convergence Textile Center Reaserch & Certification Team, Gyeongbuk Technopark Foundation,
Gyeongsan 38415, Korea

ABSTRACT

Objectives : *Plantaginis asiaticae Folium* (PA) has been widely used in Korean medicine for treatment of liver disease, stomach troubles and inflammation. We investigated the effect of PA on lipid accumulation in 3T3-L1 according to extraction conditions.

Methods : The MTT assay was employed to evaluate the cytotoxicity of PA extracted by different solvents (water, 50% ethanol, and 95% ethanol) on 3T3-L1 preadipocytes. Oil red O staining was used to identify intracellular lipid accumulation in 3T3-L1. 3T3-L1 adipocytes were treated with PA at concentration ranging in 0.1, 0.2 and 0.4 mg/ml. PA was extracted by different extraction conditions such as extraction solvents, extraction time, and extraction temperature. In addition, UPLC analysis was used for determination of candidates of active ingredients in PA.

Results : 3T3-L1 preadipocytes were treated with PA extracted by different solvents (water, 50% ethanol, and 95% ethanol) and there was no cytotoxicity. Oil red O staining was employed to identify the effect of PA on lipid accumulation in 3T3-L1. In the present study, PA water extraction at 70°C for 6 hours decreased greatly in lipid accumulation. The range of concentrations was 0.1, 0.2 and 0.4 mg/ml. Concentration at 0.2 mg/ml was the most effective one among them. Candidates of active ingredients in PA were shown plantamajoside and acteoside through UPLC.

Conclusions : These results suggest that the effect of PA water extraction at 70°C on lipid accumulation in 3T3-L1 is superior to other extraction conditions. We suppose that plantamajoside and acteoside may be candidates of active ingredients in PA.

Key words : *Plantaginis asiaticae Folium*, Lipid accumulation, 3T3-L1 cell, Cell viability, Water extract, Extraction conditions.

*Corresponding author : Mi Ryeo Kim, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University
· Tel : +82-53-770-2361 · Fax : +82-53-770-2241 · E-mail : mrkim@dhu.ac.kr

#First author : Mi-Jin Jeong, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University
· Tel : +82-53-770-2241 · Fax : +82-53-770-2241 · E-mail : cherryletters@hotmail.com

· Received : 10 February 2018 · Revised : 28 February 2018 · Accepted : 15 March 2018

I. 서 론

현대의 우리나라는 사회 및 경제적 발전으로 인하여 식생활이 점차 서구화 되어가고, 생활환경 변화에 따른 영양소의 과다 섭취와 신체활동량의 감소로 인한 비만 인구가 점차 증가하고 있는 추세이다. 비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인하여 단순히 몸무게가 증가하는 현상을 넘어 체내에 지방이 과도하게 축적 되는 현상을 의미한다^{1,2)}. 특히 비만은 당뇨, 고지혈증, 심혈관계 질환 및 동맥경화증 등, 각종 대사성 질환의 원인이 될 뿐만 아니라, 외형적인 변화로 인한 정신적 스트레스 증가, 우울감의 증가로 삶의 질도 저하시키는 것으로 나타났다^{3,4)}.

체내의 지방 축적은 전지방세포 (preadipocyte)에서 지방세포 (adipocyte)로 분화되는 과정에서 지방세포 크기가 커지고 지방세포의 수가 증가함으로 인하여 지방조직의 축적이 일어난다⁵⁾. 특히, 본 실험에서 사용된 3T3-L1은 적절한 배양 조건에서 전지방세포에서 지방세포로 분화하는 지방세포형성 (adipogenesis) 과정이 잘 알려져 있는 세포주로서 지방세포의 분해과정을 이해하는 항비만 활성의 비교 모델로 널리 사용되고 있다^{6~9)}.

질경이 (*Plantago asiatica* L.)는 우리나라를 비롯하여 중국과 일본에 흔히 볼 수 있는 식물로 전국에 야생하며 풀밭이나 길가 또는 빈터 등에서 흔히 자란다. 부이 (茆苳), 차과로초 (車過路草) 라고도 불리는 질경이는 질경이과에 속하는 다년생 초본식물로서 6월~8월에 백색 꽃이 피며, 10월에는 6~8개 정도의 흑색종자 열매를 맺는다. 질경이 전초의 구성성분으로 플라본의 배당체인 plantagoside, acetoside, plantagin, homoplantagin을 함유하고 있고, iridoid 배당체인 aucubin, geniposidic acid와 그 외에 β -sitosterol, choline, palmitic acid, stigmasterol, vitamin B13 및 vitamin C 등의 성분이 함유되어 있다^{10~12)}. 민간에서는 질경이의 어린 잎을 식용으로 사용하며, 한방에서는 잎을 차전초 (*Plantaginis asiaticae* Folium, 車前草), 종자를 차전자 (*Plantaginis Semen*, 車前子)로 명칭한다^{13,14)}. 예로부터 다양한 생리적 활성으로 인해 잎인 차전초는 청열, 양혈, 이뇨, 건위, 부인병, 녹막염 등을 치료하는 약재로 사용되어 왔고, 종자인 차전자는 소염 및 이뇨 작용의 치료를 위해 오랫동안 사용되었다¹⁵⁾. 최근 연구에 의하면, 차전초 추출물은 항산화 효능이^{12,16)} 좋을 뿐만 아니라 간 기능을 보호해주는 역할을 하고, 지질대사와 관련하여 혈중 콜레스테롤의 함량을 낮추어 줌으로써 동맥경화증의 예방과, 심혈관계 질환의 위험을 저하시킬 수 있다는 다양한 연구가 발표되었다^{15,17~19)}.

따라서 본 연구에서는 추출 용매, 추출 시간, 추출 온도의 추출 조건을 다르게 한 차전초 추출물을 3T3-L1 세포에 처리하여 지방축적 억제 효과를 확인하였고, 차전초 지표 성분의 후보군을 설정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재 및 추출방법

본 실험에 사용된 차전초 (*Plantaginis asiaticae* Folium)의 산지는 영천산으로 농업회사법인(주) 이비채 (영천, 대한민국)에서 제공받은 것을 대구한의대 본초학교실에서 감별 받아 사용하였다. 추출 용매별로 차전초의 효능을 확인하기 위해 600g의 차전초에 물 (H_2O), 50%에탄올 (50% Ethanol), 95%에탄올 (95% Ethanol)의 용매를 각각 5L씩 가하여 추출하였고 8.83~16.9%의 수득률을 얻었다. 또한 추출 시간에 따른 효능을 관찰하기 위해 6시간과 72시간으로 추출 시간을 달리하여 차전초를 추출하였다. 마지막으로 추출 온도별 효능을 관찰하기 위해서 70℃, 80℃, 95℃로 온도를 다르게 하여 차전초의 효능을 관찰하였다.

2) 시약 및 기기

3T3-L1 세포 배양을 위해 사용된 배지는 bovine calf serum (BCS), fetal bovine serum (FBS) 및 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하고 Hyclone사 (Logan, UT, USA)에서 제품을 구입하였다. 3T3-L1 세포 분화를 유도하기 위한 penicillin/streptomycin (P/S), insulin, dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylanthine (IBMX), cacodylate는 Sigma Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 세포 독성 측정을 위한 3-[4,5-dimethyl thiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 및 지방구 염색에 사용된 시약인 Oil red O 용액은 Sigma Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 또한 dimethyl sulfoxide (DMSO), $CaCl_2$ 는 덕산약품 (안산, 경기도, 한국) 제품을 사용하였으며, formaldehyde, isopropyl alcohol은 Junsei chemical (Tokyo, Japan) 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양 및 분화유도

3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, CL-173TM)에서 구입하여 본 실험에 사용하였으며, 세포는 1%의 P/S가 포함된 10%의 BCS를 DMEM 배지에 37℃, 5% CO_2 배양기 (MCO-15AC, SANYO, Japan)에서 8일간 배양시킨 후, 배양액을 분화유도 배양액 (10% FBS, 5 μ g/ml insulin, 2uM DEX, 111 μ g/ml IBMX)으로 바꾸고 2일간 배양한다. 2일 후, 분화유도 배양액 (10% FBS, 5 μ g/ml insulin)이 포함된 DMEM 배지로 교환해 주어 2일간 배양시킨 뒤, 마지막으로 insulin을 첨가하지 않은 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 배양하였다. 차전초 추출물의 각각의 농도는 (0.1, 0.2, 0.4 mg/ml) 배지 교체시기마다 함께 처리하였다.

2) 세포생존율 (MTT) 측정

차전초 추출물이 3T3-L1 세포생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 96well plate에서 차전초 추출물을 각 농도 (0.1, 0.2, 0.4 mg/ml)별로 처리하여 MTT분석법을 이용하였다. 세포에 차전초 추출물을 처리하고 24시간 배양 후, MTT 용액 60 μ l를 넣어서 암실에서 2시간 반응시킨 뒤, DMSO를 200 μ l

를 가하였다. 흡광도는 ELISA reader (Sunrise, TECAN, Grodig, Austria)에, 570nm에서 흡광도를 측정하였으며, 모두 3개의 well의 평균값을 이용하여 평가하였다.

3) Oil red O 염색

3T3-L1 세포에서 지방 축적에 차전초 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 Oil red O 염색을 수행하였다. 세포분화 중에서 차전초 추출물을 각각의 농도 (0.1, 0.2, 0.4 mg/ml)로 이틀에 한번씩 배지를 교환하며 처리 하였다. 8일 후 세포배양액 제거 후 DPBS로 3회 세척하고 cacodylate buffer (pH 7.2)로 4℃에서 세포를 2시간 고정시킨 후, 증류수로 세척하여 지방구를 Oil red O 염색시약으로 염색하였다. 40% Isopropyl alcohol로 3회 세척을 하고 현미경(CK2, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 염색된 지방세포의 지방함량 측정을 위해 건조시킨 후, 100% isopropyl alcohol로 지방을 추출하여 510nm 파장에서 분광광도계 (Sunrise, TECAN, Grodig, Austria)로 흡광도를 측정한 다음, 처리군의 지방함량을 측정하였다.

4) UPLC분석

차전초의 주요성분인 plantamajoside 및 acteoside의 분석을 위해 각 시료를 4.0mg씩 측정하여 HPLC용 acetonitril 1.0ml에 녹이고 이것을 stock solution으로 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0 mg/ml의 농도로 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 분석용 column은 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 X 100mm, 1.7 μ m)를 사용하였고, 검출기는 UV 280nm, 이동상으로는 acetonitrile과 물을 사용하여 gradient profile로 하였고, 유속은 0.25 m/min으로 하였다.

5) 통계처리

본 결과의 통계처리는 IBM SPSS Statistics 22 (Statistical package for the social sciences, SPSS Inc., Chicago)를 사용하여 산출하였고 Student's t-test로써 군간 차이를 분석하였다. 각 군당 평균의 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test를 사용하여 검증하였고 유의수준은 0.05 이하로 정하였다.

III. 결 과

1. 차전초 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향

차전초 추출물이 세포의 독성에 영향을 미치는지 확인하기 위해서 각각의 시료 농도 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml로 3T3-L1 전지방세포에 처리하였다. 농도뿐만 아니라 서로 다른 용매로 추출한 차전초 추출물의 세포독성 효과를 확인하기 위하여 물 (W), 50% 에탄올 (50%E), 95% 에탄올 (95%E)의 용매로 추출한 차전초 시료를 3T3-L1 전지방세포에 처리하였다. 본 실험에서 양성대조군으로 35 μ M의 농도의 fenofibrate (FF)를 3T3-L1 전지방세포에 처리하였다. 그 결과, 차전초의 물 추출물 (W)과 95% 에탄올 (95%E) 추출물에서는 시료의 농도에 의존적으로 세포 생존율이 감소하는 것으로 나타났다. 또한

95% 에탄올 (95%E) 추출물 0.4 mg/ml 농도를 처리한 군을 제외한 나머지 군에서는 모두 세포 생존율이 80% 이상을 나타내었다.

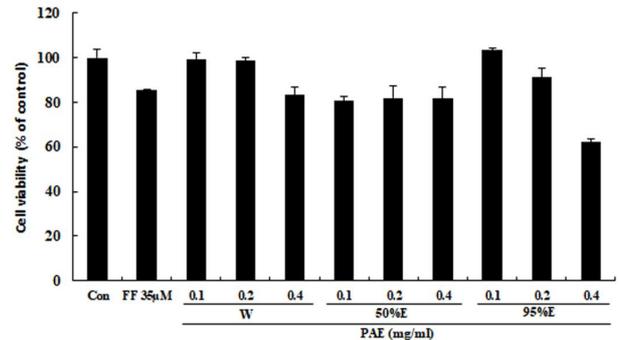


Figure 1. Cytotoxicity of 3T3-L1 preadipocyte against PA (Plantaginis asiaticae Folium) extracted by three solvents (water, 50% ethanol, and 95% ethanol). Data are presented as mean \pm S.E of triplicate tests.

PAE : Plantaginis asiaticae Folium extract; Con : control; FF : fenofibrate; W: water; 50%E : 50% ethanol; 95%E : 95% ethanol.

2. 추출 용매별 차전초 추출물이 3T3-L1세포 지방축적에 미치는 영향

추출 용매에 따른 차전초 추출물이 3T3-L1 세포의 지방축적에 미치는 효과를 확인하기 위해, 물 (W), 50% 에탄올 (50%E), 95% 에탄올 (95%E)의 용매로 차전초를 추출한 시료를 각각의 농도 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml로 각 군에 처리한 후, 세포 내 지방 함량의 정도를 확인하였다. 50% 에탄올 (50%E) 추출물의 시료군 0.2 mg/ml와 0.4 mg/ml의 농도를 제외한 나머지 군에서 지방 축적의 정도가 대조군에 대해 감소한 것으로 관찰 되었다. 용매 중에서는 차전초의 물 추출물 (W)이 지방 축적의 정도가 가장 낮게 나타났으며 물 추출물 (W)에서 농도에 따른 세포내 지방함량은 대조군에 대하여 58%, 63%, 25%가 감소한 것으로 나타났고, 세농도 중, 0.2 mg/ml의 농도에서 가장 지방억제효능이 효과적으로 나타났다.

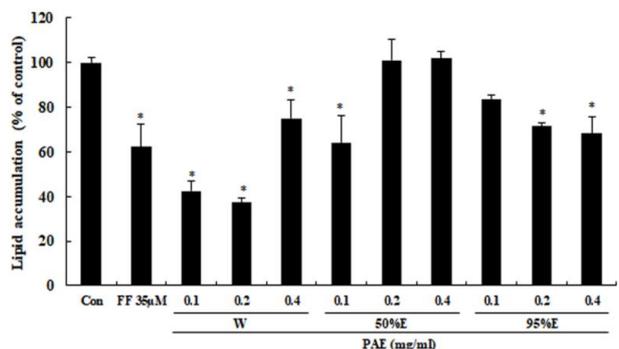


Figure 2. The effect of PA (Plantaginis asiaticae Folium) extracted by three different solvents (water, 50% ethanol, and 95% ethanol) on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Data are presented as mean \pm S.E of triplicate tests. * p < 0.05 vs control.

PAE : Plantaginis asiaticae Folium extract; Con : control; FF : fenofibrate; W : water; 50%E : 50% ethanol; 95%E : 95% ethanol.

3. 추출 시간별 차전초 추출물이 3T3-L1 세포 지방축적에 미치는 영향

추출 시간에 따른 차전초 추출물이 3T3-L1 세포 지방축적에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 물 (W), 50% 에탄올 (50%E), 95% 에탄올 (95%E)의 각 용매를 이용하여 6시간 동안 추출한 차전초 추출물의 시료를 3T3-L1 세포 각 군마다 처리하였고, 95% 에탄올 (95%E)의 용매를 이용하여 72시간 동안 추출한 차전초 추출물의 시료를 3T3-L1 세포에 처리하여 결과를 확인하였다. 추출 시간을 다르게 한 결과, 6시간 추출한 차전초 추출물을 처리한 대부분의 군에서 72시간 추출한 차전초 추출물을 처리한 군보다 3T3-L1 세포에 축적된 지방 함량이 더 적었다.

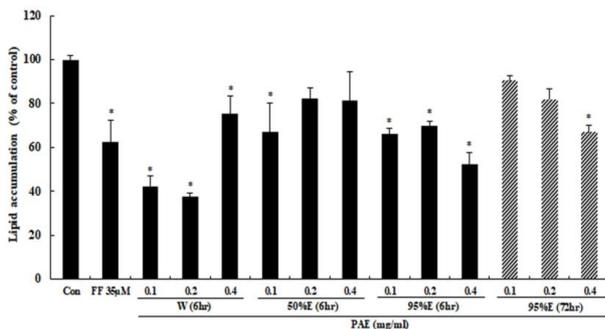


Figure 3. The effect of PA (Plantaginis asiaticae Folium) extracted by different time (6hr and 72hr) on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Data are presented as mean \pm S.E of triplicate tests. * $p < 0.05$ vs control. PAE : Plantaginis asiaticae Folium extract; Con : control; FF : fenofibrate; W : water; 50%E : 50% ethanol; 95%E : 95% ethanol.

4. 추출 온도별 차전초의 물 추출물이 3T3-L1 세포 지방축적에 미치는 영향

추출 용매별, 추출 시간별 실험 결과를 통해 차전초를 6시간 물로 추출한 차전초 추출물이 지방축적억제 효과가 가장 좋게 나타났다. 차전초 물 추출물에서 추출 온도의 차이가 3T3-L1 세포의 지방축적에 미치는 영향을 관찰하였다. 추출 온도는 70°C, 80°C, 95°C로 서로 다르게 하였고, 그 결과 세 가지 추출 온도별 차전초 물 추출물을 처리한 대부분 군에서 대조군에 대하여 지방 축적의 정도가 낮게 나타났다. 추출 온도 70°C에서 추출한 차전초 물 추출물이 가장 좋은 지방억제 효과를 보였으며, 시료의 농도는 0.2 mg/ml에서 지방 축적 억제 정도가 가장 뛰어났다.

5. 차전초의 성분관찰

차전초 추출물의 함유성분 중 지표성분 후보군의 설정을 위해 초고속액체크로마토그래피 (UPLC)를 이용하여 흡광도 280nm의 검출파장으로 함유성분을 분석하였다. 그 결과 차전초의 지표성분의 후보로 plantamajoside와 acteoside를 확인하였다. Fig. 5A는 plantamajoside의 분자구조를 나타낸 것이고 Fig. 5B는 acteoside의 분자구조를 나타낸 것이다.

Plantamajoside와 acteoside 모두 phenylethanoide glycoside의 구조를 나타내고 있다. 크로마토그램에서 (a) plantamajoside의 peak는 약 9.3~9.4분대, (b) acteoside는 9.6분대에서 peak가 검출되었다.

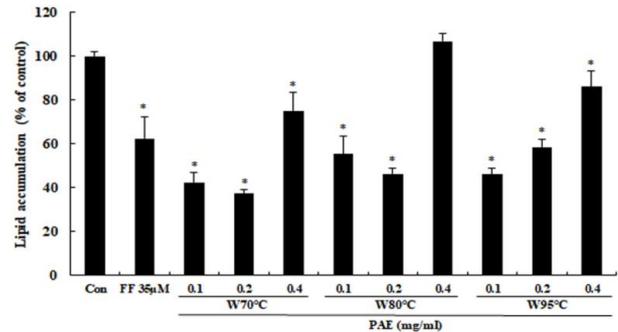


Figure 4. The effect of PA (Plantaginis asiaticae Folium) extracted in water with three different temperatures (70°C, 80°C, and 95°C) on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Data are presented as mean \pm S.E of triplicate tests. * $p < 0.05$ vs control. PAE : Plantaginis asiaticae Folium extract; Con : control; FF : fenofibrate; W : water.

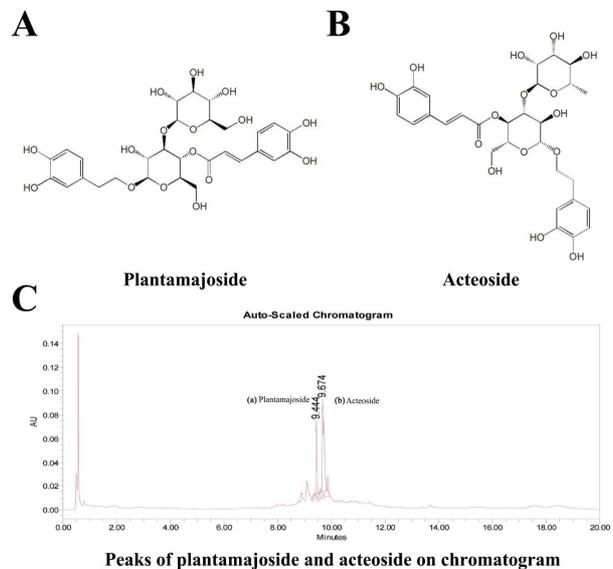


Figure 5. Structures of plantamajoside, acteoside and UPLC chromatogram of standard solution. (A) Structure of plantamajoside, (B) Structure of acteoside, and (C) Two peaks of plantamajoside and acteoside on UPLC chromatogram.

IV. 고찰

오늘날의 현대 사회는 여러 가지 문화들이 발전하고 사람들은 삶의 질을 높여려는 가치의 변화를 가져왔다. 음식 문화와 더불어 well-being 문화가 발달함에 따라 여러 음식들을 접할 수 있는 기회들이 많아지고, 사람들은 건강한 삶을 유지하기 위해 건강한 음식들에 시선을 돌리고 있다. 이러한 노력에도 불구하고 바쁜 현대인들의 삶은 과잉의 섭취량에 비해 운동의 부족으로 인한 비만이 점차적으로 증가되고 있는 실정이다.

1975년 이후, 전세계적인 비만인구의 수는 점차적으로 증가

하고 있다. 2016 자료에는 현재 비만인구의 수는 1975년도에 비해 거의 3배가 증가된 것으로 나타난다. 2016년 비만인구의 통계적 수치는 과체중으로 나타나는 성인이 약 19억명에 이르고 과체중의 인구 중에 약 6억 5천만명 정도가 비만 인구가 나타났다. 즉, 전세계 성인의 약 39%가 과체중으로, 약 13%가 비만인구로 측정된다는 것이다. 비만의 연령도 낮아지면서 5세 이하의 과체중 또는 비만 어린이가 약 4천 백만명으로 집계된다²⁰⁾. 비만인구가 증가함에 따라 이에 관련된 여러 가지 의약품이 개발되고 있는 실정이다. 그러나 비만치료제로 시판되었거나 시판되고 있는 의약품은 심장판막손상의 가능성이 있거나, 복통, 저혈당, 두통, 피로 등의 여러 가지 부작용들의 한계를 가지고 있다. 그리하여 현재는 천연물을 이용한 비만치료제와 기능성식품개발이 지속적으로 성장해 가고 있고 천연물을 소재로 하는 연구도 많이 이루어지고 있다.

차전초는 예로부터 부인병, 늑막염, 변비, 소염 및 이뇨작용에 효과가 있어 약초로 사용되었고, 현재 연구에 따르면 차전초는 항산화에 효과적일 뿐만 아니라, 간조직을 보호하고 당뇨와 지질 개선에 효과적인 것으로 나타나 있다^{12,15~18)}. 본 실험에서 차전초가 가지는 여러 가지 효능 중, 항비만 효과의 가능성을 확인하였다. 항비만 효능을 가지는 기능성 소재로써 가장 효과적인 추출 조건을 확인하기 위해 각 추출물에 대한 세포 독성검사를 마친 후, 추출 용매별, 추출 시간별, 추출 온도별로 지방생성 및 지방세포분화 억제에 미치는 영향을 관찰하였다. 추출 용매별 지방억제 효능은 물이 가장 뛰어났으며, 95% 에탄올 추출물의 지방억제 정도는 이전 논문과 비슷한 결과를 나타내고 있다¹⁹⁾. 추출 시간별 지방억제 효과는 6시간의 추출시간이 72시간의 추출시간보다 더 효과적인 것으로 나타났다. 두 가지 결과를 종합하여 볼 때, 차전초를 6시간 물 추출하는 것이 지방축적 억제에 가장 큰 효과를 나타내고 있다. 차전초 물 추출물에 대한 온도별 효과를 관찰했을 때, 70℃ 물 추출물에서 지방세포의 지방축적이 가장 적게 나타나면서, 이는 항비만에 가장 효과적일 것으로 사료된다. 추출물의 처리 농도 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml 중에서 차전초 시료의 처리 농도 0.2 mg/ml가 모든 추출조건에서 효과적인 지방축적억제의 결과를 나타내었고 이는 가장 항비만에 효과적인 농도로 사료된다.

차전초는 flavonoid를 비롯하여 tannin, aucubin, plantagin, ursolic acid 등의 여러성분들을 포함하고 이들은 생리적 약리적 활성을 가지고 이노작용에 있어 신우염, 방광염, 요로염 등 염증성 질환에 사용된다¹³⁾. 본 실험에서 차전초로부터 유효 및 지표 성분의 후보군을 분석하였고, 그 결과 plantamajoside와 acteoside를 확인하였다. Plantamajoside와 acteoside는 여러 생물학적 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. Plantamajoside는 당화반응을 억제하여 노화나 당뇨로 일어나는 여러가지 합병증과 동맥경화 등의 발생을 낮추어줄 뿐만 아니라 항염증과 항산화 작용에도 관여하는 것으로 알려져 있다^{21~23)}. Acteoside도 항염증과 항산화 작용에 관여하고 lipase 작용을 억제하여 지질 흡수에 영향을 주어 항비만에 도움을 준다^{24~26)}. 그리하여 본 실험을 통하여 plantamajoside와 acteoside가 항비만에 영향을 주는 물질이 될 것이라 예상된다. 그러나 항비만 효능과 관련될 것이라 추측되는 이들 성분에 대한 연구는 후속 연구를 통해서 밝혀져야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 차전초 (*Plantaginis asiaticae Folium*)의 추출조건에 따른 3T3-L1 세포 지방 축적에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실험을 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 용매별 차전초 추출물은 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml의 처리 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다.
2. 추출 용매별 차전초 추출물의 Oil red O 염색 결과, 물 추출물에서 가장 큰 지방축적 억제 효과를 보였으며, 특히 0.2 mg/ml 처리농도에서 가장 뛰어난 효과를 보였다.
3. 추출 시간별 차전초 추출물의 Oil red O 염색 결과, 6시간 추출한 추출물에서 지방축적 억제에 대한 좋은 효과를 보였다.
4. 추출 온도별 차전초 추출물의 Oil red O 염색 결과, 차전초 물 추출물의 70℃ 온도조건에서 가장 큰 지방축적 억제 효과를 보였으며, 특히 0.2 mg/ml 처리농도에서 가장 뛰어난 효과를 보였다.
5. UPLC 분석을 이용한 차전초의 지표성분 후보군으로는 plantamajoside와 acteoside를 확인할 수 있었다.

따라서, 본 연구에서 시도한 차전초의 여러 추출방법 중 70℃에서 물을 용매로 사용한 추출액이 다른 방법의 추출액보다 지방세포 내에서 지방 함량의 더 큰 감소를 가져오므로써, 지방세포 분화 및 지방합성의 억제와 관련된 항비만에 더 효과적인 작용을 할 것으로 추측된다. 또한 차전초의 UPLC 성분분석 결과 plantamajoside와 acteoside의 두 성분이 확인됨으로써 이 성분들이 지표 물질로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 연구개발특구진흥재단-기술이전사업화 사업(No. 2016DG0001 / 차전초 추출물을 이용한 기능성 원료 및 다이어트 음료 개발) 및 한국연구재단 (No.17-220-023) 지원을 받아 수행된 연구이다.

References

1. Haslam DW, James WPT. Obesity. Lancet. 2005 ; 366 : 1197-209.
2. Peng Y, Yu S, Li H, Xiang H, Peng J, Jiang S. MicroRNAs: Emerging roles in adipogenesis and obesity. Cell signal. 2014 ; 26 : 1888-96.
3. Rhee YS, Han IY. Psychosocial Risk Factors Among Obesity Clinic Patients. J Obes Metab Syndr. 2010 ;

- 19(4) : 137-47.
4. Park JB, Lee HS, Hwang SY, Hong SB, Kim HD, Yun CY. Effect of combined plant extracts on anti-obesity in rats fed a high-fat diet. *Kor J Aesthet Cosmetol*. 2011 ; 9 : 25-34.
 5. Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*. 1996 ; 87(3) : 377-89.
 6. Green H, Kehinde O. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*. 1974 ; 1 : 113-6.
 7. Chin HS, Pack KJ, Pack SH, Kim JK. The effects of Herbal Extract Mixture on Anti-Obesity. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2009 ; 38(1) : 32-8.
 8. Kim DJ, Jung JH, Kim SG, Lee HK, Lee SK. Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from Cheonnyuncho (*Opuntis humifus*). *Korean J. Food Preserv*. 2011 ; 18 : 366-73.
 9. Jeon YS, You YH, Jun WJ. Anti-obesity Effects of Extracts from Young *Akebia quintata* D. Leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2014 ; 43(2) : 200-6.
 10. Park CH. A taxonomic and systematic study of genus *plantago* in Korea. MS Thesis. 1996.
 11. Park JH, Lee CK. The encyclopedia of medicinal plants. Shin-Il Books Comp. 2000 : 394-5.
 12. Jeong CH, Bae YI, Shim KH, Choi JS. DPPH Radical Scavenging Effect and Antimicrobial Activities of Plantain (*Plantago asiatica* L.) Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2004 ; 33(10) : 1601-5.
 13. Yoon MY, Han YS. Effect of Anti-oxidant Activity and the skin Whitening Action on *Plantago asiatica* L. Root Extract. *KSBB Journal*. 2014 ; 29(3) : 199-204.
 14. Hong SH, Kim OJ. Anti-Toxoplasmosis Effect of the Herbal Extracts *Plantago asiatica* L. *Korean J. Plant Res*. 2016 ; 29(1) : 26-31.
 15. Lee JJ, Lee JH, Jeong CJ, Choi HS, Lee MY. Effects of Ethylacetate Fraction of *Plantago asiatica* L. on Hypercholesterolemia Induced by High Cholesterol Diet in Rats. *Korean J. Food Preserv*. 2005 ; 12(6) : 624-30.
 16. Park SJ, Shin EH, Kim CA. Component Analysis and Antioxidant Activity of *Plantago asiatica* L. *Korean J Food Preserv*. 2011 ; 18(2) : 212-8.
 17. Yoon SH, Ha H. Hepatoprotective and Hypolipidemic Activity of *Plantaginis Herba* Extracts in Diabetic Model. *KOR. J. ENVIRON. TOXICOL*. 2001 ; 16(3) : 127-31.
 18. Park SJ, Kim NY, Kim CA. Effects of *Plantago asiatica* L. on antioxidative activities and lipid levels in hyperlipidemic Sprague-Dawley(SD) rats. *Korean J Food Preserv*. 2011 ; 18(3) : 383-9.
 19. Jeon SY, Park JY, Shin IS, Kim SO, An HD, Kim MR. Ethanol extract of *Plantago asiatica* L. controls intracellular fat accumulation and lipid metabolism in 3T3-L1 Adipocytes. *Kor. J. Herbology*. 2014 ; 29(4) : 77-82.
 20. Obesity and overweight. WHO 2017 updated report. Available from : URL : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
 21. Choi SY, Jung SH, Lee HS, Park KW, Yun BS, Lee KW. Glycation inhibitory activity and the identification of an active compound in *Plantago asiatica* extract. *Phytother Res*. 2008 ; 22(3) : 323-9.
 22. Nishibe S. The plant origins of herbal medicines and their quality evaluation. *Yakugaku Zasshi*. 2002 ; 122(6) : 363-79.
 23. Hong CO, Hong ST, Koo YC, Yang SY, Lee JY, Lee YH, Ha YM, Lee KW. Protective effect of *Plantago asiatica* L. extract against Ferric Nitritotriacetate (Fe-NTA) induced renal oxidative stress in Wist rats. *J Food Hyg Saf*. 2011 ; 26(2) : 107-13.
 24. Chiou WF, Lin LC, Chen CF. Acteoside protects endothelial cells against free radical-induced oxidative stress. *J Pharm Pharmacol*. 2004 ; 56(6) : 743-8.
 25. Lee JY, Woo ER, Kang KW. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation. *J Ethnopharmacol*. 2005 ; 97(3) : 561-6.
 26. Wu X, He W, Zhang H, Li Y, Liu Z, He Z. Acteoside: a lipase inhibitor from the Chinese tea *Ligustrum purpurascens* kudingcha. *Food Chem*. 2014 ; 142 : 306-10.