pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 5, pp. 389~398 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.5.389

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

고려엉겅퀴 주정 추출물을 함유하는 임상시험제품의 항비만 활성 평가

조봉연 · 최선일 · 최승현 · 심완섭 · Han Xionggao · 라문진[1] · 김선영[1] · 강일준[2] · 한경찬[3] · 이옥환*
강원대학교 식품생명공학과, [1]홍천메디칼허브연구소, [2]한림대학교 식품영양학과, [3](주)하티

Anti-obesity Activities of *Cirsium setidens* Nakai Ethanolic Extract

Bong-Yeon Cho, Sun-Il Choi, Seung-Hyun Choi, Wan-Sup Sim, Han Xionggao, Moon-Jin Ra[1], Sun-Young Kim[1], Il-Jun Kang[2], Kyoung-Chan Han[3], and Ok-Hwan Lee*
Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea
[1]Hongcheon Institute of Medicinal Herb, Hongcheon, Korea
[2]Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon, Korea
[3]HATTI Co., Ltd., Hongcheon, Korea
(Received May 14, 2018/Revised June 10, 2018/Accepted June 25, 2018)

ABSTRACT - The purpose of this study was to evaluate anti-obesity activity of *Cirsium setidens* Nakai test material (CNTM) in 3T3-L1 adipocytes and obese C57BL/6J mice fed with a high-fat diet using various obesity-related *in vitro* experiments. During adipocyte differentiation, CNTM significantly inhibited lipid accumulation and ROS production compared to controls. To evaluate whether CNTM could exert glycerol release effects on mature 3T3-L1 adipocytes, we treated cells with various concentrations of CNTM for 1 h. Treatment of mature adipocytes with 160-320 μg/mL of CNTM increased the release of glycerol, but not in a significant dose-dependent manner. Anti-adipogenic and anti-lipogenic effects of CNTM seemed to be mediated by the inhibition of PPARγ and C/EBPα. Moreover, CNTM stimulated fatty acid oxidation in an AMPK-dependent manner. CNTM-treated groups of C57BL/6J mice showed reduced body weights and adipose tissue weight with improving serum lipid profiles and adiponectin protein expression in obese C57BL/6J mice fed with a high-fat diet. These results suggest that CNTM might have anti-obesity effect on adipogenesis and lipid metabolism *in vitro* and *in vivo.* This presents the possibility of developing a treatment for obesity using nontoxic natural resources.

Key words : Antiobesity, *C. setidens* Nakai ethanolic extract, 3T3-L1, C57BL/6J mice

비만은 신체 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인해 체지방이 과잉 축적되어 발생되는 현상으로 심혈관계 질환, 제 2형 당뇨, 고혈압, 고지혈증 등 만성 질환의 발생 가능성을 증가시키는 주요 요인 중 하나로 볼 수 있다[1]. 비만을 치료하기위해서 다양한 비만관련치료제가 출시되고 있으나 지방 변, 두통, 메스꺼움 등의 부작용이 발생한다고 보고된 바 있다[2,3]. 따라서 비만치료에 있어 부작용은 적지만 우수한 효과를 기대할 수 있는 천연물을 활용한 항비만 소재 개발이 요구되는 실정이다[4,5].

지방세포는 에너지의 항상성 유지 및 지질대사에 중요한 역할을 하며 지방전구세포인 3T3-L1은 여러 호르몬과 다양한 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되면서 세포내에 중성지방을 축적한다고 알려져 있다. 이러한 지방세포 형성 과정에 관여하는 중요한 전사인자에는 PPARγ와 C/EBPα가 있다고 알려져 있다[6,7]. Adipogenesis라고 불리는 지방세포형성과정은 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 과정이며 초기, 중기, 후기의 각 단계별로 중요한 분화 조절 전사인자들이 관여한다고 알려져 있으며, 이 중 C/EBPβ와 δ는 지방전구세포가 분화유도물질 등의 분화 인자에 노출되었을 때 분화 초기에 가장 먼저 작용하는 전사 인자로 C/EBPβ는 Dexamethasone (DEX)에, C/EBPδ는 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)에 의해 활성이 유도되는 것으로 알려져 있다[8,9]. 그와 반면에 C/EBPα와 PPARγ는 분화 후기에 발현되어 지방세포에 특이적인 유전자의 발현을 활성화시킴으로써 분화를 더욱 촉진시켜 분화 과정을 완성시키며 지방세포로의 분화를 위해 인슐린 감수성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다[10,11]. 따라서 지방

*Correspondence to: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: 82-33-250-6454, Fax: 82-33-259-5561
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

세포 분화에 관여하는 주요 전사인자들의 발현 조절 유무는 지방 축적 억제능 및 그 작용 기전을 판단하는 주요지표 중 하나라고 볼 수 있다.

국화과(Asteraceae)에 속하는 고려엉겅퀴(*Cirsium setidens* Nakai)는 다년생의 초본으로 항산화 성분인 페놀성 화합물을 비롯하여 지표성분으로서 pectolinarin과 비배당체 형태인 pectolinarigenin이 함유 되어있다고 알려져 있다[12]. Yoo 등[13]은 D-galactosamine으로 유도된 간 손상 모델에서 고려엉겅퀴 추출물 혹은 pectolinarin의 투여에 따라 농도 유의적으로 간 손상 지표인 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase) 농도가 유의적으로 감소함을 보고한 바 있다. 또한 엉겅퀴 속 자생식물 중에 들어있는 silymarin은 간 보호 효과를 비롯해 알코올성 간경화 보호 효과 등에 생리활성이 있는 것으로 보고된 바 있다[14]. Lee 등[15]은 CCl_4 (carbon tetrachloride)에 의해 유도된 쥐의 간 독성에 대해 고려엉겅퀴 추출물과 양성대조군으로 silymarin을 처리하였을 때 간 보호효과를 관찰하였으며, glutathione peroxidase 1 (GPO1), glutathione peroxidase 3 (GPO3), superoxide dismutase (SOD1)의 유전자 발현 수준이 증가함으로써 간 독성 발생 작용기전에서 활성 산소종의 활성을 감소시켜 간 보호효과를 나타내었음을 확인한 바 있다. 이러한 고려엉겅퀴는 예로부터 한방에서는 지상부 또는 지하부를 대계라 하여 약용으로 이용하였으며, 지상부는 개화기에 베고 뿌리는 가을철에 채취하고 말려 경혈, 지혈, 소종의 효능으로 대하, 간염 및 고혈압 등의 치료에 사용한다고 보고된 바 있다[16,17]. 이처럼 고려엉겅퀴가 갖는 여러 생리활성에 대한 연구가 많이 진행되었으나 항비만 활성에 대한 연구는 많이 이루어지지 않아 본 연구진은 고려엉겅퀴 열수추출물이 3T3-L1 지방세포에서 adipogenesis 관련 유전자 억제 및 고려엉겅퀴의 지표성분인 pectolinarin에 의한 항비만 효과를 규명하여 보고한 바 있다[18]. 또한 본 연구진은 고려엉겅퀴 주정 추출물(*Cirsium setidens* Nakai ethanolic extract, CSE)과 가르시니아 캄보지아 추출물의 항비만 활성을 비교하여 고려엉겅퀴 주정 추출물이 adipogenesis 관련 유전자 억제와 더불어 AMPK의 활성화와 그 하위인자들의 발현을 통하여 지질대사를 관여한다는 결과를 확인한 바 있다[19].

따라서 본 연구에서는 고려엉겅퀴 주정추출물의 항비만 효과를 기반으로 한 건강기능식품을 개발하기 위하여 인체적용시험용 시료(CNTM, test material of *Cirsium setidens* Nakai)를 제작하였으며, 본 시료의 인체적용시험 전 비임상효력을 확인하기 위하여 항비만 효과를 평가하고자 하였다. 또한, 본 인체적용시험 시료의 항비만 효과를 비만유도 동물모델에서 평가하여 인체적용시험 전의 효력을 확인하고자 하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

본 연구에 사용한 고려엉겅퀴 주정추출물과 임상 시험용 제품(CNTM)의 제조는 각각 ㈜하티(Hongcheon, Korea), ㈜팜크로스(Chuncheon, Korea)에서 진행하였으며 이를 제공받아 사용하였다. 고려엉겅퀴 주정추출물의 제조는 건조된 고려엉겅퀴 10 kg에 40% 주정에탄올(w/w, 시료의 25배)을 사용하여 70°C에서 2시간 가압 순환추출을 진행하였고, 이를 감압농축한 뒤 동결건조기를 이용하여 고려엉겅퀴 주정 추출물(CSE)을 제작하였다. 고려엉겅퀴 주정추출물 내 pectolinarin의 함량은 53.35 mg/g으로 분석되었다[19]. 임상 시험용 제품의 제조는 고려엉겅퀴 주정추출물 62.5%와 부형제(결정셀룰로오스, 이산화규소, 스테아린산마그네슘 등) 37.5%를 혼합하여 800 mg tablet 제형의 본 시험시료를 제작하였으며 이를 다시 분말화하여 본 실험에 사용하였다. 3T3-L1 세포배양 및 분화에 사용된 시약으로 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였으며 *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), insulin, dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), nitroblue tetrazolium (NBT), Oil Red O (ORO), isopropanol은 Sigma (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), bovine serum (BS), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S), phosphate-buffered saline (PBS) 및 trypsin-EDTA는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양

3T3-L1 지방세포의 분화 과정 중, 임상시험용 제품에 의한 지방세포 분화를 관찰하기 위해 사용된 마우스 유래 3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, CL-173, Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 사용하였다. 3T3-L1 전지방세포를 실험목적에 따라 24-well plate에 각각 5×10^6 cell 농도로 seeding한 후, 10% BS 및 1% P/S를 함유한 DMEM (89%)에서 100% confluence 될 때까지 배양하였다. 이로부터 2일 후에, 지방세포 분화유도 물질(1 μg/mL insulin, 1 μM DEX, 0.5 mM IBMX)과 10% FBS 및 10% P/S를 함유한 DMEM으로 전구지방세포를 지방세포로 분화 유도하였다. 지방세포 분화(Day 0)시 DMEM에 고려엉겅퀴 주정추출물의 농도가 100, 200 μg/mL 농도로 처리되도록 CNTM 시료를 각각 160 그리고 320 μg/mL로 처리하였고, 이때 CNTM의 효과를 관찰하기 위하여 negative control에는 아무것도 처리하지 않았다. 지방세포의 분화는 분화유도 물질을 처리한 후, 2일마다 지속적으로 1 μg/mL insulin, 1% P/S, 10% FBS가 함유된 배지에 각각의 시료를 처리하였다.

세포독성평가(XTT assay)

3T3-L1 지방세포에 대한 CNTM 시료의 세포 독성평가는 Kim 등[20]의 방법에 따라 XTT {2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt} assay Kit WelGene, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 3T3-L1 세포는 2×10^6 cell 농도로 96-well plate에 seeding하고 BS (10%) 및 P/S (1%)를 함유한 DMEM (89%)에서 100% confluence 될 때까지 배양하였다. 이로부터 2일 후에, 지방세포 분화유도 물질(1 μg/mL insulin, 1 μM DEX, 0.5 mM IBMX)과 FBS (10%) 및 P/S (10%)를 함유한 DMEM으로 전지방세포를 지방세포로 분화유도 하였다. 지방세포 분화(day 0)시 각각의 시료를 80, 160 및 320 μg/mL 농도로 처리하였다. 분화 6일차가 되었을 때 1 mL의 XTT reagent와 20 μL PMS reagent (*N*-methylphenazonium methyl sulfate)를 혼합하여 working solution을 준비하여 놓고, pipet을 이용하여 96-well medium 부피의 20% 되는 양 만큼 취하고 각각의 well에 조심스럽게 첨가하여 plate를 바닥에 붙인 상태로 가볍게 흔들면서 혼합하였다. 4시간 동안 CO_2 incubator에서 배양한 후, microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm 흡광도 값에서 690 nm의 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포 독성을 계산하였다.

Oil red O staining 및 NBT assay를 통한 지질축적, ROS 생성억제 효능평가

분화 과정에 따른 3T3-L1 세포 내 지방축적량을 측정하고자 각각의 시료를 처리하여 24-well에서 6일 동안 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후, 10% formalin 용액 500 μL을 첨가하여 5분간 실온에서 방치한 뒤 제거하였다. 그 후 동량의 formalin 용액으로 분화된 3T3-L1 세포 1시간 이상 실온에서 방치한 후, formalin을 제거하고 60% isopropanol 용액 500 μL로 세척하여 세포를 완전히 건조시켰다. 완전히 건조된 세포들은 미리 제조해 둔 ORO working solution (oil red O:DDW = 6:4)으로 세포 내 축적된 지방성분들을 충분히 염색 한 후, 증류수를 이용하여 세포를 3~4회 세척하고, 완전히 건조시켰다. 세포 내 축적된 지방 성분과 결합한 Oil red O는 100% isopropanol을 이용하여 모두 용출시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분화과정에 따른 지방세포 내 ROS 생성량을 측정하기 위하여 먼저 24-well에 배양 및 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후 멸균된 PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4)를 이용하여 2회 세척하고 0.2% NBT 용액 200 μL을 첨가하여 CO_2 incubator안에서 90분간 반응시킨 뒤 KOH solution (DMSO:1N KOH = 7:3)을 이용하여 dark blue formazan을 모두 용출시킨 후 동량의 증류수를 첨가하여 잘 섞어준 후 microplate reader 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Glycerol release assay

3T3-L1 지방세포 분화 후 방출된 glycerol의 양은 lipolysis assay kit (Biovision, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 분화된 3T3-L1 지방세포를 lipolysis wash buffer를 이용하여 2회 세척한 뒤 lipolysis assay buffer에 시료를 첨가하여 1시간 동안 반응 시키고 96 well plate에 배양액 50 μL과 0~10 nM 농도의 glycerol 표준물질 50 μL 그리고 glycerol reagent 50 μL을 넣고 1시간동안 반응시킨 뒤 570 nm에서 측정하고 glycerol 표준물질의 흡광도를 바탕으로 표준검량곡선을 작성한 뒤 배양액 내 glycerol의 방출정도를 계산하였다.

동물실험 및 비만 유도

5주령의 수컷 C57BL/6J mice를 ㈜중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 1주일 동안 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 정상식이군을 제외한 모든 군은 비만 유도를 위하여 총 칼로리의 60%가 지방인 고지방식이(HFD; 60% kcal fat; Research Diet, Inc., No. D12492)를 공급하여 2주간 비만 유도를 하였으며 정상식이군은 총 칼로리의 10%가 지방인 일반식이(ND; 10% kcal fat; Research Diet, Inc., No. D12450B)를 공급하였다. 실험동물은 무작위로 정상식이군(ND; n = 10), 고지방식이군(HFD; n = 10), 고지방식이에 *Cirsium setidens* Nakai Tablet Material (CNTM) 을 주정추출물 함량이 100 mg/kg/day 농도가 되도록 투여한 군(HFD+CNTM 160; n = 10), 고지방식이에 CNTM을 주정추출물 함량이 200 mg/kg/day 농도가 되도록 투여한 군(HFD+CNTM 320; n = 10)으로 총 4군으로 나누어 실험을 진행하였다. CNTM은 균질화하여 증류수에 녹여 사용하였으며 총 8주간의 경구투여를 실시하였다. 실험기간 동안 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 주 1회 식수섭취량, 식이섭취량을 산출하였다. 실험동물의 무게는 주 1회 측정하였다.

실험 환경은 온도 24 ± 5°C, 습도 55 ± 5%로 유지하고, 밤낮을 12시간 주기로 조절하였고, 실험의 전 과정은 한림대학교 실험동물운영위원회 및 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 실시되었다(승인번호: Hallym 2017-34).

간 및 혈중 지질 농도 측정

사육이 끝난 실험동물은 12시간 절식시킨 후 2,2,2-tribromoethanol (Sigma-Aldrich)와 2-methyl-2-buthanol (Sigma-Aldrich)에 의해 마취시켜 혈액을 채취하였으며 12,000 g, 4°C에서 10분간 원심분리 후 혈청을 분리하였다. 분석 전까지 혈청은 -70°C에 보관하였으며 혈청에서 간 기능의 지표인 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)의 분석과 지질함량의 지표인 Glucose (GLU), trigly-

ceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)의 함량을 Automated Clinical Chemistry Analyzer (FUJI DRI-CHEM NX500i; Fujifilm, Japan)를 사용하여 분석하였다.

혈청 중 유리지방산(NEFA: non-esterified fatty acid) 농도는 ACS-ACOD법을 활용한 NEFA-HR(2) reagent (Wako, Osaka, Japan)를 사용하여 분석하였다. 96-well plate의 각 well에 혈청 시료와 표준 시료를 5 μL씩 분주한 후, Color Reagent Solution A를 200 μL씩 분주하고 37°C에서 5분 동안 반응시킨 다음 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하고, Color Reagent Solution B를 100 μL씩 분주한 다음 37°C에서 5분 동안 반응시킨 후 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 표준 시료의 흡광도와 비교하여 계산하였다.

Western blot analysis

3T3-L1 세포 및 부고환지방조직을 PRO-PREP protein extraction solution을 사용하여 균질화 시킨 후 12,000 g, 4°C에서 30분간 원심분리 하여 상등액을 얻고, BCA protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 단백질을 정량한 후 실험에 사용하였다. 단백질을 2×, 5× sample buffer와 혼합 후 95°C에서 5분간 열을 가하였고, 100 V로 90분 동안 10% SDS-PAGE를 이용하여 size 별로 분리하였다. 120 V로 60분 동안 semi-dry transfer system을 이용하여 PVDF membrane (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)에 이동시킨 후 5% skim milk를 포함한 blocking buffer (0.5% skim milk, 1× TBST)를 1시간 동안 처리하고, primary antibody를 4°C에서 overnight 반응시킨 후 1× TBST로 10분 간격으로 5번 washing, secondary antibody를 실온에서 2시간 반응시킨 후 1× TBST로 10분 간격으로 5번 washing 하였고, ECL reagent를 이용해 발색한 후 Chemi Doc imaging system (Bio-Rad)과 X-ray 필름에 감광시켰다. 밴드의 강도는 Image J를 이용하여 정량화한 뒤 수치화하였다.

통계처리

항비만 활성 결과 값의 통계처리는 SAS version 9.4 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분석하였다. 유의성 분석은 one-way ANOVA 검정을 실시하였으며 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

Results and Discussion

추출물 및 임상 시험제품 제작 결과

동결 건조한 고려엉겅퀴 주정추출물을 감압 농축하여 동결건조 시킨 뒤 얻은 추출물 분말에 부형제를 첨가하여 임상 시험제품(CNTM)을 제작하였다. 본 임상시험제품에 대한 인체적용시험 전에 세포와 동물실험 모델에서 효능이 유지되는지 여부를 평가하기 위하여 본 임상시험제품을 다시 분말화 하여 본 시험을 진행하였다.

임상시험 제품의 세포독성평가

3T3-L1에 대한 CNTM의 세포독성은 Fig. 1(A)과 같다. 고려엉겅퀴 주정추출물의 농도를 50, 100 및 200 μg/mL 농도로 처리하기위해 CNTM을 80, 160 및 320 μg/mL의 농도로 처리한 결과 위 농도에서 세포독성을 나타내지 않았으며, 현미경상에서 morphology의 변화도 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 CNTM을 160 및 320 μg/mL의 농도로 지방전구세포에 처리하여 지방세포 분화억제 및 ROS 생성 저감 효능 등의 항비만 활성을 평가하였다.

임상시험 제품의 지방세포 분화 억제, ROS 저감효과 및 지방분해 효과

임상시험제품이 3T3-L1 세포 분화 억제에 미치는 효과를 확인하기 위하여 중성지방만을 특이적으로 붉은 색으로 염색하는 Oil red O 염색법을 통해 지방세포 내 생성된 중성지방의 양을 측정한 결과는 Fig. 1(B)과 같다. CNTM을 처리하지 않은 대조군에 비하여 CNTM 160, 320 μg/mL 농도에서 지방축적 억제정도는 각각 22, 34%로 CNTM 처리 시 농도 유의적으로 지방축적량의 감소치를 나타내었다. 임상시험 제품의 지방세포 분화 억제 효과는 고려엉겅퀴 주정추출물과 열수추출물의 항비만 효과를 평가한 이전 연구결과와 유사하게 농도 유의적으로 지방생성이 억제된 연구결과를 보였으며 이는 지방세포 분화 및 지방축적과 관련한 유전인자들을 조절함으로써 나타난 결과로 사료되었다[18,19].

NBT assay는 NBT 용액이 지방세포 내 축적된 ROS와 반응하여 dark blue formazan을 생성하게 되며, 이를 용출하여 세포 내 ROS의 생성량을 알 수 있는 실험방법이다. 3T3-L1 세포에 분화유도 물질을 처리하여 세포 분화 동안 생성된 ROS를 측정하기 위하여 NBT assay를 측정한 결과는 Fig. 1(C)와 같다. 대조군에 비하여 CNTM 160, 320 μg/mL 처리농도에서 ROS 생성량은 각각 17, 22% 정도 감소하는 것으로 나타났다. 고려엉겅퀴의 열수추출물의 항비만 활성을 평가한 Lee 등[18]의 연구결과와 유사하게 CNTM의 처리는 세포내 ROS 생성량을 농도 유의적으로 시켰으며 이는 CNTM 처리에 의해 ROS 생성과 관련한 G6PDH 유전자 및 NADPH를 이용하여 ROS를 생성하는 NADPH oxidase 4 (NOX4) 등의 유전인자들을 조절함으로써 나타난 결과로 판단되었다[21,22].

CNTM이 지방세포분화를 억제할 뿐만 아니라 생성된 지방의 제거에도 효과적으로 반응을 하는지 판단하기위해 지방세포 내 중성지방 제거능을 lipolysis assay kit를 통하

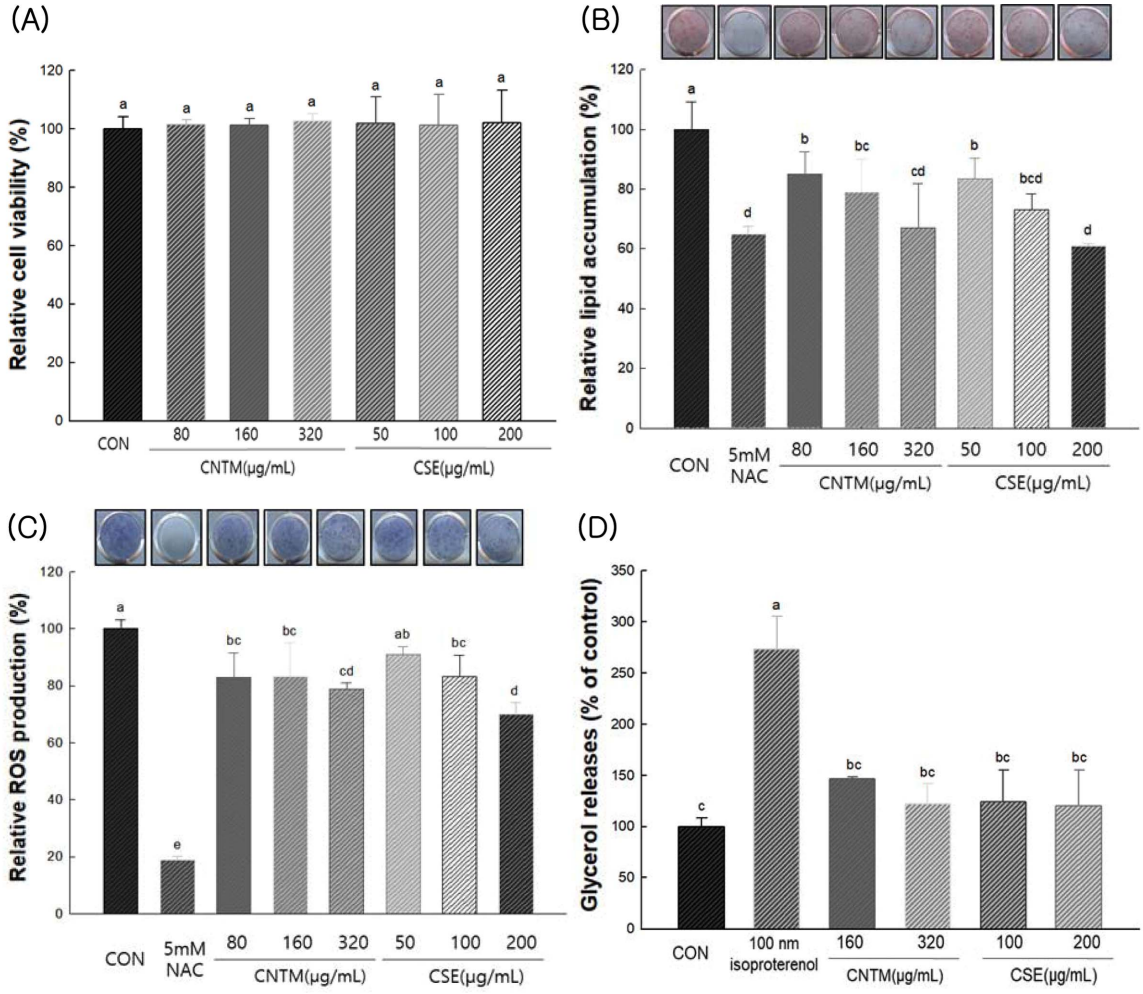

Fig. 1. Effects of *Cirsium setidens* Nakai Test Material (CNTM) cell viability, lipid accumulation, ROS production and glycerol release from 3T3-L1 adipocytes. (A) Postconfluent 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate in the absence or presence of CNTM (added on day 0 of differentiation) for 6 days. After 6 days, XTT reagent was added to the medium. After 4 h of incubation, the absorbance was read at 570 nm. (B) Postconfluent 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate in the absence or presence of CNTM (added on day 0 of differentiation) for 6 days. Stained lipids were extracted and quantified by measuring absorbance at 570 nm. (C) Postconfluent 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate in the absence or presence of CNTM (added on day 0 of differentiation) for 6 days. Dark-blue formazan (ROS production) was dissolved and the absorbance was determined at 570 nm (D) Mature adipocytes were treated with CNTM for 1 h. The glycerol release assay was quantified by measuring absorbance at 570 nm. Each values are the means ± SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

여 분석하였다. 그 결과는 Fig. 1(D)과 같이 MDI로 분화시킨 지방세포에 CNTM을 처리한 결과 세포 내 축적되어 있던 중성지방의 분해로 인하여 배지로 방출된 glycerol의 양이 증가된 것으로 나타났으나 CNTM 처리에 따른 glycerol 방출정도는 농도 유의적으로 효과를 보이지 않았다. Ursolic acid를 primary rat adipocyte에 처리하여 glycerol의 방출정도를 측정한 Li 등[23]의 연구결과에 따르면 glycerol의 방출기작은 cAMP-dependent PKA pathway 통하여 조절됨을 보고한 바 있다. 본 연구에서 지방세포로부터 발생한 glycerol 방출정도는 CNTM 처리에 의해 cAMP-dependent PKA 작용기전을 조절함으로써 나타난 결과로 판단되었다.

임상시험제품이 adipogenesis 및 fatty acid 대사관여 단백질 발현에 미치는 효과

CNTM이 갖는 지방축적억제능이 지방세포 형성 억제 작용기전과 어떤 연관성이 있는지 확인하기 위하여 CNTM 처리를 통하여 adipogenesis에 관여하는 주요 핵심 유전인자인 C/EBPα와 PPARγ의 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과는 Fig. 2와 같다. 대조군에서 두 인자의 단백질 발현을 확인한 결과 유의적으로 증가되었으며 C/EBPα의 경우 CNTM 160, 320 μg/mL 처리농도에서 단백질발현은 유의적 차이가 없는 것으로 확인되었으며, PPARγ의 경우에는 CNTM 160, 320 μg/mL 처리농도에서

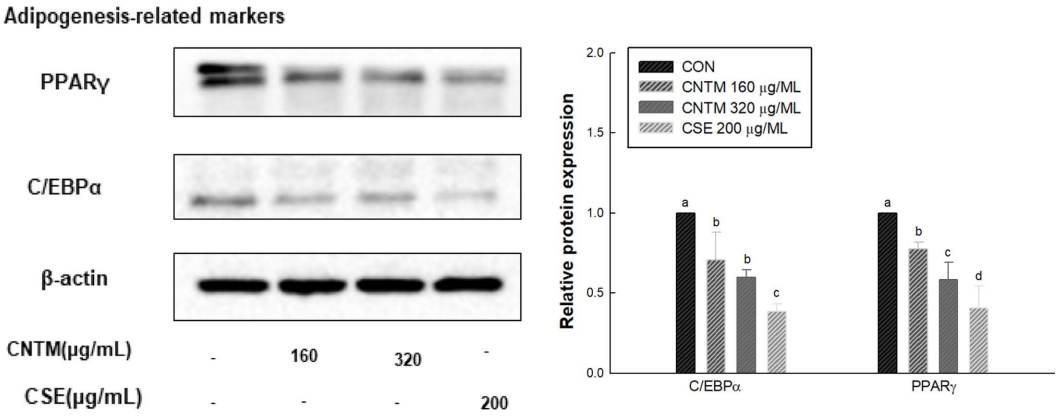

Fig. 2. Effect of *Cirsium setidens* Nakai Test Material (CNTM) on adipogenesis related gene and protein expressions. Modulation of adipogenesis related protein expressions by CNTM was evaluated by Western blot analysis. β-actin was used as an internal control. Each values are the means ± SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

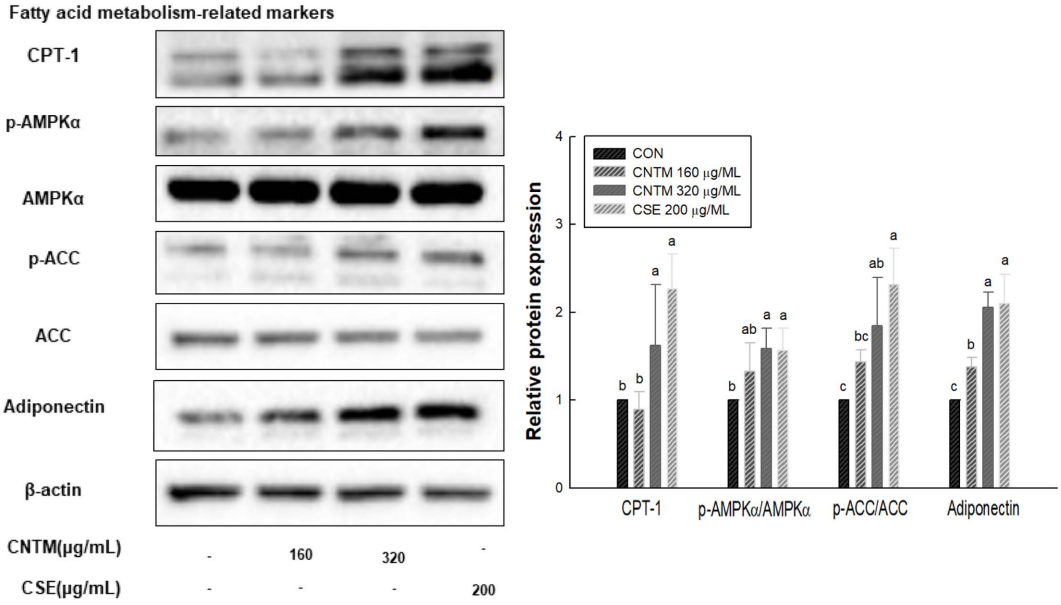

Fig. 3. Effect of *Cirsium setidens* Nakai Test Material (CNTM) on fatty acid metabolism-related markers protein expressions. Modulation of fatty acid metabolism related protein expressions by CNTM was evaluated by Western blot analysis. β-actin was used as an internal control. Each values are the means ± SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

농도 유의적으로 단백질 발현이 감소되었다. 이러한 결과를 바탕으로 CNTM이 갖는 지방축적 억제능이 adipogenesis에 관여하는 핵심 인자의 단백질 발현 저해를 통해 나타나며 특히 C/EBPα, PPARγ 발현 조절을 통해 나타날 수 있다는 가능성을 확인하였다.

CNTM의 지방 생성 및 분해와 관련된 단백질 발현과의 연관성을 확인하기 위해 western blot을 이용하여 AMPKα, ACC, CPT-1, adiponectin의 발현량을 측정하였으며 그 결과는 Fig. 3과 같다. CNTM을 농도별로 처리한 후 p-AMPKα, p-ACC, CPT-1, adiponectin 발현을 측정한 결과 대조군과 비교하였을 때 유의성 있는 변화를 나타내었다. AMPK는 세포 내의 에너지 항상성 유지 역할을 하는 효소로 지방의 대사조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[24]. Adiponectin은 지방 조직으로부터 특이적으로 분비되는 adipokine 가운데 하나로, 특이 수용체인 AdipoR1과 AdipoR2를 통해 AMPK를 활성화 시켜 인슐린 저항성을 개선하며, 복부지방 감소를 비롯해 혈중 HDL의 농도를 증가시키는 것으로 알려져 있다[25,26]. AMPK는 ATP가 고

갈되어 AMP/ATP 비율이 증가하는 경우 인산화를 통해 활성화되고 이후 지방산 산화를 증가시키며 지방 합성을 억제한다고 보고되었다[27]. 활성화된 AMPK는 SREBP-1c, PPARγ 및 FAS와 같은 지방세포화 인자 및 지질합성에 관계된 유전자의 발현을 억제함으로써 지방 합성을 억제시키고 ACC의 인산화를 통한 비활성화와 CPT-1의 활성화를 통해 미토콘드리아 내막으로 지방산 이동을 증가시켜 β-oxidation을 촉진시킨다고 알려져 있다[24,28,29]. 이러한 연구 결과를 바탕으로 CNTM의 처리는 adiponectin의 발현을 조절 및 AMPK 활성화를 통해 에너지 항상성 유지 및 지방 대사 조절에 관여하는 것으로 사료되었다.

체중증가량 및 식이효율

실험동물의 비만을 유도하기 위해 2주간 고지방식이를 공급하였으며, 각 군의 체중증가량 및 식이효율은 Table 1과 같다. Initial body weight에는 그룹별로 유의한 차이를 나타내지 않았으나 final body weight에는 그룹별 유의한 차이를 나타냈다. 고지방식이군(HFD)이 정상식이군(ND)에 비하여 체중이 유의하게 증가되어 고지방식이로 인한 비만이 유도되었음을 알 수 있으며 고지방식이군과 비교 시 임상시험용 시료(CNTM)를 처리함에 따라 체중 증가량이 유의적으로 감소하였다. 8주 동안의 식이 섭취량 또한 각 군별로 유의한 차이가 없었으며 칼로리 섭취량은 일반 식이를 공급한 정상식이군을 제외한 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 식이 효율의 경우에도 고지방식이군이 정상식이군 보다 유의하게 높았으나, 임상시험용 시료를 처리함에 따라 유의하게 낮은 결과를 보였다.

장기무게

각 군의 간과 신장, 비장, 부고환 지방 그리고 내장 지방조직의 상대무게는 각 기관의 무게(g)에 100을 곱한 후, 마우스의 체중으로 나눈 값으로 Table 2에 나타난 바와 같다. 간과 비장조직의 상대 무게는 고지방식이군(HFD)과 비교 시 임상시험제품 투여 군에서 유의적으로 감소하였으며 신장 조직의 상대무게는 정상식이군(ND)을 제외하고는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 부고환지방조직과 내장지방조직의 상대무게는 ND군에 비해 HFD군에서 유의적으로 증가하였으며 HFD+CNTM160 특히, HFD+CNTM320군에서 유의적으로 감소하였다. 따라서 임상시험제품을 처리한 군에서의 부고환지방조직 및 내장지방조직의 축적량이 고지방식이군에 비해 유의적으로 감소한 것으로 나타나 임상시험제품이 장기 내부에 지방이 축적되는 것을 억제하는 효과가 있을 것이라 사료되었다.

혈액생화학 분석

혈중 지질 농도 및 간독성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 간독성을 조사하기 위해 AST와 ALT를 측정하였으며 혈액의 지질 농도를 조사하기 위해 GLU, TG, TC, HDL-

Table 1. Effects of *Cirsium setidens* Nakai Test Material on body weight and Food efficiency ratio in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice

Parameters	Groups			
	ND	HFD	HFD+CNTM 160	HFD+CNTM 320
Initial body weight (g)	20.13 ± 0.99^{a}	20.16 ± 0.81^{a}	20.07 ± 0.53^{a}	20.01 ± 0.59^{a}
Final body weight (g)	29.43 ± 1.79^{d}	45.02 ± 3.72^{a}	41.74 ± 3.55^{b}	38.13 ± 4.02^{c}
Body weight gain (g)	9.31 ± 1.46^{d}	24.86 ± 3.70^{a}	21.68 ± 3.63^{b}	18.12 ± 4.09^{c}
Food intake (g/day)	3.49 ± 0.26^{a}	3.93 ± 0.84^{a}	3.72 ± 0.25^{a}	3.71 ± 0.64^{a}
Calorie intake (kcal/day)	13.42 ± 1.01^{b}	20.58 ± 4.39^{a}	19.52 ± 1.29^{a}	19.47 ± 3.37^{a}
Water intake (g/day)	4.03 ± 0.55^{a}	3.54 ± 0.22^{a}	3.41 ± 0.08^{a}	3.76 ± 0.58^{a}
Food efficiency ratio (%)	2.40 ± 1.78^{c}	8.88 ± 1.28^{a}	7.88 ± 2.33^{ab}	6.25 ± 0.95^{b}

Each values are the means ± SD of samples (n = 10). Values with different superscripts indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

Table 2. Effects of *Cirsium setidens* Nakai Test Material on relative weight in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice

Relative weight (g)	Groups			
	ND	HFD	HFD+CNTM 160	HFD+CNTM 320
Liver	3.29 ± 0.33^{a}	2.91 ± 0.31^{b}	2.36 ± 0.25^{c}	2.52 ± 0.19^{c}
Kidney	1.16 ± 0.10^{a}	0.83 ± 0.07^{b}	0.83 ± 0.05^{b}	0.88 ± 0.03^{b}
Spleen	0.20 ± 0.04^{a}	0.16 ± 0.02^{b}	0.14 ± 0.02^{c}	0.15 ± 0.02^{bc}
Epididymis fat	1.32 ± 0.39^{c}	6.42 ± 0.73^{a}	5.32 ± 1.24^{ab}	4.45 ± 2.13^{b}
Visceral fat	0.33 ± 0.16^{d}	2.61 ± 0.60^{a}	1.74 ± 0.65^{b}	1.09 ± 0.63^{c}

Each values are the means ± SD of samples (n = 10). Values with different superscripts indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

Table 3. Effects of *Cirsium setidens* Nakai Test Material on serum biochemical analysis in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice

Parameters	Groups			
	ND	HFD	HFD+CNTM 160	HFD+CNTM 320
AST (U/L)	67.00 ± 5.26[b]	77.75 ± 9.25[a]	75.75 ± 8.45[a]	74.75 ± 5.95[a]
ALT (U/L)	36.25 ± 8.70[a]	43.38 ± 13.86[a]	40.13 ± 9.93[a]	39.75 ± 8.29[a]
Glucose (mg/dL)	148.63 ± 13.15[c]	281.75 ± 22.94[a]	259.75 ± 26.24[ab]	238.38 ± 23.22[b]
TG (mg/dL)	53.50 ± 3.34[b]	83.50 ± 13.93[a]	77.13 ± 9.48[a]	75.50 ± 8.96[a]
TC (mg/dL)	100.38 ± 5.76[c]	169.50 ± 13.15[a]	145.75 ± 10.33[b]	138.25 ± 8.80[b]
HDL-C (mg/dL)	70.63 ± 4.10[b]	106.00 ± 13.32[a]	101.63 ± 6.09[a]	99.88 ± 9.83[a]
LDL-C (mg/dL)	19.05 ± 5.52[c]	46.80 ± 3.57[a]	28.70 ± 9.13[b]	23.28 ± 6.66[bc]
NEFA (mEq/L)	0.86 ± 0.02[b]	0.90 ± 0.04[a]	0.88 ± 0.02[ab]	0.87 ± 0.03[b]

Each values are the means ± SD of samples (n = 10). Values with different superscripts indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.
AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglyceride. NEFA, non esterified fatty acids.

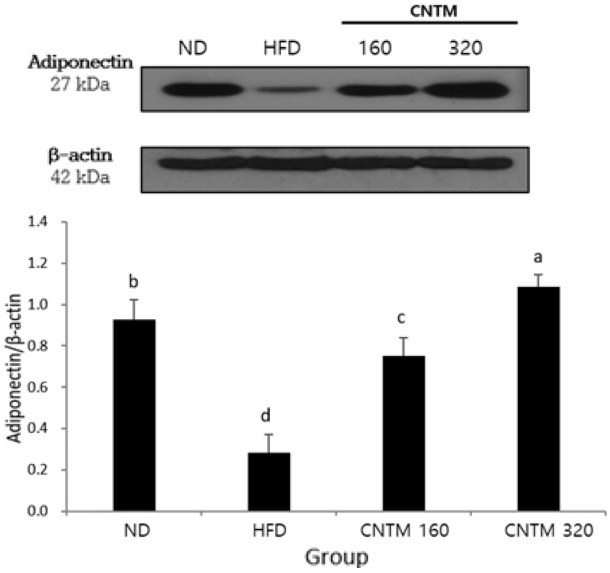

Fig. 4. Effects of *Cirsium setidens* Nakai Test Material on the expression level of adiponectin in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. β-actin was used as an internal control. Each values are the means ± SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

C, LDL-C, NEFA를 측정하였다. 임상시험용 시료 투여 군의 AST, ALT의 수치는 HFD군과 비교 시 유의적인 차이를 나타내지 않아 8주간의 경구투여가 독성에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다. HDL-cholesterol (HDL-C)은 HFD군과 임상시험용 시료 투여군 간의 유의한 차이를 나타내지 않았으나 total cholesterol (TC)은 HFD군에 비해 임상시험제품 투여 군에서 유의적으로 감소하여 HDL-C/TC에 대한 비율은 임상시험제품 투여 군에서 유의적으로 증가하였다. LDL-cholesterol (LDL-C)은 HFD군에 비하여 HFD+CNTM160군, 특히 HFD+CNTM320군에서 유의적으로 감소하였으며 glucose (GLU)에서도 HFD군에 비해 임상시험용 시료를 처리함에 따라 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한, non-esterified fatty acid (NEFA)의 수치에서도 HFD군에 비해 임상시험용 시료를 처리함에 따라 유의적으로 감소하였으며 이는 임상시험용 시료가 혈중 유리지방산 농도를 감소시키며 혈중 콜레스테롤 상승을 억제시키고 혈당을 감소시키는 효과가 있는 것으로 사료되었다.

Western blot

임상시험용 시료가 adipogenesis의 adipocyte specific genes이며 lipogenesis를 억제하고 lipolysis를 촉진하는 주요한 바이오 마커인 adiponectin의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 부고환 지방조직으로부터 단백질을 추출하여 western blot을 통해 분석하였다(Fig. 4). Adiponetin의 발현 정도는 ND군에 비해 HFD군에서 유의적으로 감소하였으며 임상시험용 시료(CNTM)를 처리함에 따라 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 임상시험용 시료가 지방세포 분화를 억제하여 지방산 합성을 억제하고 분해를 촉진하여 체지방감소에 효과가 있을 것이라 사료되었다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성사업”(과제번호 R00004762) 으로 수행된 연구결과 입니다.

국문요약

본 연구는 고려엉겅퀴 주정추출물을 가지고 제작된 임상시험용제품(CNTM)이 3T3-L1 지방세포 및 고지방식이로 유도된 비만 쥐에 미치는 항비만 효능 관찰을 통하여

체지방 개선 기능성식품을 개발하기위하여 인체적용시험 시료를 제작한 후, 인체적용시험전에 그 효력이 유지됨을 확인하기위해 수행되었다. 본 연구에 사용된 시료 CNTM은 80~320 μg/mL 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았으며, 지방 축적억제 효능 및 지방세포 분화, 지질대사 관련 유전인자들을 유의적으로 변화시키는 것으로 확인되었다. 또한 동물실험에서 CNTM 처리에 의하여 체중의 감소를 확인하였으며 혈중지질 성분 가운데 HDL-C/TC의 비율은 유의적으로 증가하며 LDL-cholesterol (LDL-C)과 non-esterified fatty acid (NEFA)의 비율은 유의적으로 감소하여 혈중 유리지방산 농도를 감소시키며 혈중 콜레스테롤 상승을 억제시키고 혈당을 감소시키는 효과가 있는 것으로 평가되었다. 따라서 고려엉겅퀴 주정추출물이 함유된 인체적용시험시료(CNTM)는 체지방 개선에 우수한 효과가 있는 것으로 확인되었다.

References

1. Spiegelman, B.M., Flier, J.S.: Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.,* **104**, 531-543 (2001).
2. Ballinger, A., Peikin, S.R.: Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur. J. Pharmacol*., **440**, 109-117 (2002).
3. Rodgers, R.J., Tschop, M.H., Wilding, J.P.: Anti-obesity drugs: past, present and future. *Dis. Model. Mech*., **5**, 621-626 (2012).
4. Cheung, B.M.Y., Cheung, T.T., Samaranayake, N.R.: Safe of antiobesity drugs. *Ther. Adv. Drug. Saf.,* **4**, 171-181 (2013).
5. Lee, T.K., Lee, W.S., Hwang, J.T., Kwon, D.Y., Surh, Y.J., Park, O.J.: Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPKalpha-PPAR-gamma in 3T3-L1 adipocytes and anti-proliferatory effect through AMPKalpha-COX-2 in cancer cells. *J. Agric. Food Chem.,* **57**, 305-310 (2009).
6. Jang, M.H., Piao, W.L., Kim, J.M., Kwon, S.W., Park, J.H.: Inhibition of cholinesterase and amyloid-beta aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. *Phytother Res*., **22**, 544-549 (2008).
7. Rosen, E.D., Spiegelman, B.M.: Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 145-171 (2000).
8. Attie, A.D., Scherer, P.E.: Adipocyte metabolism and obesity. *J. Lipid Res.,* **50**, 395-399 (2009).
9. Kim, H.J., Kang, C.H., Kim, S.K.: Anti-adipogenic effect of *Undaria pinnatifida* extracts by ethanol in 3T3-L1 adipocytes. *J. Life Sci.,* **22**, 1052-1056 (2012).
10. Ntambi, J.M., Kim, Y.C.: Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.,* **130**, 3122-3126 (2000).
11. Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., Spiegelman, B.M.: Cross-regulation of C/EBPα and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell.,* **3**, 151-158 (1999).
12. Park, H.Y., Lim, B.K.: Manufacturing optimization of wet noodle added with leaf powder of freeze-dried *Cirsium setidens* Nakai. *Food Eng. Prog.,* **18**, 130-139 (2014).
13. Yoo, Y.M., Nam, J.H., Kim, M.Y., Choi, J., Park, H.J.: Pectolinarin and pectolinarigenin of *Cirsium setidens* prevent the hepatic injury in rats caused by D-galactosamine via an antioxidant mechanism. *Biol. Pharm. Bull.,* **31**, 760-764 (2008).
14. Rauen, H.M., Schriewer, H.: The antihepatotoxic effect of silymarin on liver damage in rats induced by carbon tetrachloride, d-galactosamine and allyl alcohol. *Arzneimittelforschung.,* **21**, 1194-1201 (1971).
15. Lee, S.H., Heo, S.I., Li, L., Lee, M.J., Wang, M.H.: Antioxidant and hepatoprotective activities of *Cirsium setidens* Nakai against CCl_4-induced liver damage. *Am. J. Chin. Med.,* **36**, 107-114 (2008).
16. Ishida, H., Umino, T., Tsuji, K., Kosuge, T.: Studies on antihemmorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VII. On the antihemorrhagic principle in *Cirsium* japonicum DC. *Chem Pharm Bull(Tokyo).,* **35**, 861-864 (1987).
17. Kang, I.J., Ham, S.S., Chung, C.K., Lee, S.Y., Oh, D.H., Choi, K.P., Do, J.J.: Development of fermented soysauce using *Cirsium setidens* Nakai and comfrey. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **26**, 1152-1158 (1997).
18. Lee, Y.J., Lee, J.H., Kim, Y.H., Kim, J.H., Yu, S.Y., Kim, D.B., Lee, J.S., Cho, M.L., Cho, J.H., Kim, B.K., Lee, B.Y., Lee, O.H.: Assessment of the pectolinarin content and the radical scavenging-linked antiobesity activity of *Cirsium setidens* Nakai extracts. *Food Sci. Biotechnol*., **24**, 2235-2243 (2015).
19. Cho, B.Y., Park, M.R., Lee, J.H., Ra, M.J., Han, K.C., Kang, I.J., Lee, O.H.: Standardized *Cirsium setidens* Nakai ethanolic extract suppresses adipogenesis and regulates lipid metabolisms in 3T3-L1 adipocytes and C57BL/6J mice fed high-fat diets. *J Med Food*., **20**, 763-776 (2017).
20. Kim, D.J., Jung, J.H., Kim, S.G., Lee, H.K., Lee, S.K., Hong, H.D., Lee, B.Y., Lee, O.H.: Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from *Cheonnyuncho (Opuntia humifusa)*. *Kor. J. Food Preserv.,* **18**, 366-373 (2011).
21. Sampson, N., Koziel, R., Zenzmaier, C., Bubendorf, L., Plas, E., Jansen-Dürr P., Berger, P.: ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma. *Mol. Endocrinol.*, **25**, 503-515 (2011).
22. Basuroy, S., Tcheranova, D., Bhattacharya, S., Leffler, C.W., Parfenova, H.: Nox4 NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, via endogenous carbon monoxide, promote survival of brain endothelial cells during TNF-α-induced apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **300**, 256-265 (2011).
23. Li, Y., Kang, Z., Li, S., Kong, T., Liu, X., Sun, C.: Ursolic acid stimulates lipolysis in primary-cultured rat adipocytes. *Mol Nutr Food Res.,* **54**, 1609-1617 (2010).
24. Assifi, M.M., Suchankova, G., Constant, S., Prentki, M., Saha, A.K., Ruderman, N.B.: AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.,* **289**, E794-800 (2005).

25. Wang, Y., Lam, K.S., Yau, M.H., Xu, A.: Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J.,* **409**, 623-633 (2008).
26. Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H., Xu, L.Y., Lam, K.S., Cooper, G.J.: The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J. Clin. invest.,* **112**, 91-100 (2003).
27. Hardie, D.G.: AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.,* **8**, 774-785, (2007).
28. Woods, A., Azzout-Marniche, D., Foretz, M., Stein, S.C., Lemarchand, P., Ferŕe, P., Foufelle, F., Carling, D.: Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol. Cell. Biol*., **20**, 6704-6711 (2000).
29. Foretz, M., Carling, D., Guichard, C., Ferŕe, P., Foufelle, F.: AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.,* **273**, 14767-14771, (1998).