

비알코올성 지방간 세포 모델에서 곤포의 효능과 기전 연구

김소연^{1,2}, 권정남^{1,2}, 이 인^{1,2}, 홍진우^{1,2}, 최준용^{1,2}, 박성하^{1,2}, 권민정¹, 주명수¹, 한창우^{1,2}
¹부산대학교 한의학전문대학원, ²부산대학교한방병원 한방내과

Research on Anti-lipogenic Effect and Underlying Mechanism of *Laminaria japonica* on Experimental Cellular Model of Non-alcoholic Fatty Liver Disease

So-yeon Kim^{1,2}, Jung-nam Kwon^{1,2}, In Lee^{1,2}, Jin-woo Hong^{1,2}, Jun-yong Choi^{1,2}
Seong-ha Park^{1,2}, Min-jung Kwun¹, Myung-soo Joo¹, Chang-woo Han^{1,2}

¹School of Korean Medicine, Pu-san National University,

²Dept. of Internal Medicine, Korean Medicine Hospital, Pu-san National University

ABSTRACT

Objectives : We tried to uncover the anti-lipogenic effect and underlying mechanism of *Laminaria japonica* on an experimental cellular model of non-alcoholic fatty liver disease.

Methods : Ethanol extract of *Laminaria japonica* (LJ) was prepared. Intracellular lipid content of palmitate-treated HepG2 cells was evaluated with or without LJ treatment. We measured the effects of LJ on liver X receptor α (LXR α) and sterol regulatory element-binding transcription factor-1c (SREBP-1c) expression, transcription level of lipogenic genes, including acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1), and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activation in HepG2 cells.

Results : LJ markedly attenuated palmitate-induced intracellular lipid accumulation in HepG2 cells. LJ suppressed LXR α -dependent SREBP-1c activation, and SREBP-1c mediated induction of ACC, FAS, and SCD-1. Furthermore, LJ activated Nrf2, which plays an important cytoprotective role in non-alcoholic fatty liver disease.

Conclusions : Our study suggests that LJ has the potential to alleviate hepatic lipid accumulation, and this effect was mediated by inhibiting the LXR α -SREBP-1c pathway that leads to hepatic steatosis. In addition, the anti-lipogenic potential may, at least in part, be associated with activation of Nrf2.

Key words : *Laminaria japonica*, non-alcoholic fatty liver disease, LXR α , SREBP-1c, Nrf2

1. 서론

지방간이란 간조직에 지방이 과다 축적되어 간 무게의 5% 이상을 차지하는 경우를 말하여, 지방 섭취 증가, 간 내 지방 축적 및 합성 증가, 또는 간

에서의 지방 배출이 감소하는 하는 경우 발생하게 된다¹. 지방간의 주요 원인은 비만, 2형 당뇨, 이상 지질혈증(dyslipidemia), 과도한 음주, 일부 약물, C형 간염, Wilson's disease 등이 있으며, 이 중에서 음주, 약물이나 특정 질환에 의해 속발하는 경우, 또는 선천적 대사 장애 등에 의한 경우는 제외하고, 비만, 2형 당뇨, 이상지질혈증 등의 대사 이상 상태에 의해 발생한 경우를 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease)이라고 한다².

· 교신저자: 한창우 경상남도 양산시 물금읍 부산대학로 49
부산대학교 한의학전문대학원
TEL: 055-360-5957 FAX: 051-510-8420
E-mail: hancw320@pusan.ac.kr

치료를 위해서는 일차적으로 체중 감량과 운동이 요구되며, 생활 습관의 개선과 더불어 insulin sensitizing agents, lipid lowering agents, antioxidants 등 매우 다양한 약물들의 사용되고 있으나, 아직 표준 치료로 인정되어지고 있는 치료제는 없는 실정이다³. 한편, 최근 발표된 연구에 따르면 insulin sensitizers, lipid lowering agents, antioxidants, ursodeoxycholic acid 등을 복용한 환자에 비하여, 한약을 복용한 환자에서 간효소치(alanine aminotransferase)가 정상화되고 영상검사 상의 지방간 정도가 감소되는 효능이 더 우수한 것으로 나타났다⁴.

곤포(昆布)는 우리나라 전해안에 광범위하게 분포하는 해조류 중의 하나로 독특한 맛과 향으로 인해 다양한 음식의 조미재료로써 많이 사용되고 있으며, 고혈압, 동맥경화, 갑상선종, 신장염 등에 효과가 있고, 암세포 증식 억제 및 노화 예방 효과가 있는 건강장수식품으로 알려져 있다⁵. 곤포는 또한 지방간 및 관련 질환에 대해서도 효능이 있는 것으로 알려져 있으며⁶, 《東醫寶鑑(外形篇卷三·肉)》에는 하기(下氣) 작용이 있어, 오래 섭취하면 체중을 감량시켜주는 효능이 있는 것으로 기록되어져 있다⁷.

이에 저자는 본 연구에서 곤포를 대상으로 비알코올성 지방간 질환에서의 그 효능 및 작용 기전을 확인해 보고자, lipogenesis를 유발하는 주요 신호체계인 LXR α -SREBP-1c pathway⁸와 비알코올성 지방간 질환의 key regulator로 최근 주목받고 있는 Nrf2⁹에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료와 방법

1. 곤포 에탄올 추출물 제조

곤포는 (주)음니허브로부터 구매하여 사용하였다. 제분기로 분쇄하여 파우더로 만든 곤포 200 g을 에탄올 600 ml에 담그고, 60 °C에서 8시간 동안 추출 후 용매를 분리 여과하였다. 동일한 양의 에탄올로 동일한 조건에서 한 번 더 추출한 다음, 추출액을

모아 감압 농축하고, 동결 건조 과정을 통해 22.14 g의 추출물을 얻었다(수율 11%).

2. 재 료

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), palmitate, Nile Red, T0901317, sulforaphane은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. SREBP-1 antibody, Nrf2 antibody, Lamin A/C antibody 및 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

3. 세포 배양

HepG2 cell은 human hepatocellular carcinoma cell 기원 세포로서 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 및 10% heat-inactivated fetal bovine serum을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 이용하여, 37 °C, 5% CO₂ 에서 배양하였다.

4. MTT assay

MTT assay를 통해 세포 활성도를 측정하였다. 96-well plate에 10⁴ cells/well의 밀도로 HepG2 Cell을 seeding하였다. 다음 날 곤포 에탄올 추출물 10, 50, 100, 500 µg/ml를 투약하고 16시간 배양하였다. 각 well에 MTT 500 µg/ml를 처리하고 4시간 뒤, 세포들이 MTT를 환원하여 생성한 formazan crystal을 측정하기 위해, DMSO를 이용하여 용해한 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 지방증(steatosis) 유도

HepG2 cell에 지방증(steatosis)을 일으키기 위해 palmitate를 처리하였다. 1% bovine serum albumin을 함유한 DMEM을 배양액으로 사용하여, palmitate 0.5 mM 투여하고 24시간 배양하였다. paraformaldehyde

4%로 상온에서 15분간 고정한 다음, PBS로 세척하고, Nile Red 100 ng/ml로 상온에서 5분간 세포 내 중성 지방을 염색하였다. Olympus FV-1000 confocal laser scanning microscope(Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하고, Image J 1.48 software로 정량화하였다.

6. Western blot analysis

Total cell lysate는 Protease inhibitor Cocktail(Roche, Indianapolis, IN, USA)를 포함한 radioimmunoprecipitation assay(RIPA) buffer(50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS)로 추출하였다. Nuclear protein은 NE-PERTM nuclear extraction kit(Thermo Scientific, IL, USA)로 추출하였다. Bradford assay로 정량, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 영동한 다음, Polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane에 전사하였다. 5% skim milk를 포함한 Tris-buffered saline(TBS)로 상온에서 1시간 blocking한 다음, 각각의 specific primary antibody를 처리하고 4 °C에서 하룻밤 반응시켰다. Horseradish peroxidase(HRP)가 결합되어 있는 2차 항체와 상온에서 1시간 반응시킨 다음, SuperSignal® chemiluminescence detection kit(Thermo Scientific, IL, USA)로 band를 검출하였다.

7. semi-quantitative RT-PCR

Lipogenesis 관련 유전자 발현을 측정하기 위하여 semi-quantitative RT-PCR을 시행하였다. RNeasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)로 total RNA를 추출한 다음, M-MLV Reverse Transcriptase(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 추출된 total RNA를 역전사하여 cDNA를 합성하였다. TaqPCRx DNA Polymerase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 각각의 primer(Bioneer)를 사용하여 합성된 cDNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA를 1.2% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide으로 염색 후 자외선

으로 band를 확인하였다.

각각의 primer는 다음과 같다. LXRα는 5'-ACA ACTGGGCATGATCGAGA-3' 및 5'-AAGCCGGG TAGCTGTTTAGC-3'; SREBP-1c는 5'-CAGTGG AGGGAACACAGACG-3' 및 5'-AAAGACTGGGC TGTCAGGCT-3'; ACC는 5'-GGAACAGTGTGC GGTGAAAC-3' 및 5'-TCACTAGTGATCCGAGCAGC-3'; FAS는 5'-GACATCGTCCATTCGTTTTGTG-3' 및 5'-GTTGACATTGTACTCGGCGG-3'; SCD-1는 5'-GCCCCCTACTTGGGAAGACG-3' 및 5'-CGA GCTTTGTAAGAGCGGTG-3'; GAPDH는 5'-AAGGTCATCATCTCTGCC-3' 및 5'-GTGATGG CATGGACTGTGGT-3'이다.

8. 통계 분석

통계에는 IBM SPSS statistics 21K(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 그래프에서 각각의 측정값은 평균±표준오차로 나타내었다. Student's t-test와 One-way analysis of variance(ANOVA) test로 그룹 간 평균을 비교하여, $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. 곤포 에탄올 추출물이 HepG2 cell의 활성도에 미치는 영향

곤포 추출물이 HepG2 cell에 대하여 세포 독성을 나타내지 않는 안전 농도 범위를 측정하기 위해 농도를 증가시키며 MTT assay를 시행하였다. 곤포 추출물을 10, 50, 100, 500 µg/ml 농도로 처리한 배지에서 HepG2 cell을 16시간 배양한 다음 MTT assay를 시행하였다. 곤포 추출물은 시험한 농도 내에서는 세포 활성도에 통계적으로 의미 있게 영향을 주지 않았다(Fig. 1). 따라서 곤포 추출물은 500 µg/ml 이하의 농도에서는 세포 독성을 유발하지 않는 것으로 판단하였다.

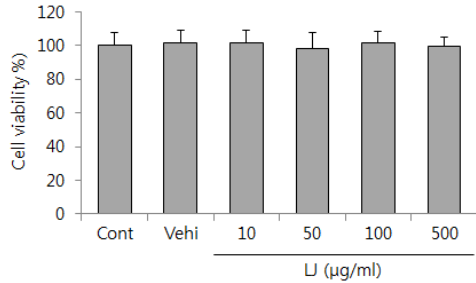


Fig. 1. Effect of ethanol extract of *Laminaria japonica* (LJ) on cell viability.

To measure cytotoxic effect of LJ on HepG2 cells, MTT assay was conducted. The cells were treated with various concentration of LJ for 24h prior to MTT assay. Data are presented as the mean \pm SEM (n=3).

2. 곤포 에탄올 추출물이 HepG2 cell의 steatosis에 미치는 영향

HepG2 cell에 palmitate로 지방증을 유도할 때, 곤포 추출물을 함께 투여하며 세포 내 지질 축적의 변화를 관찰하였다. HepG2 cell을 palmitate 0.5 mM 함유 배지에서 24시간 배양한 다음, 축적된 세포 내 지방을 Nile Red를 이용하여 염색하였다. 곤포 투여 군에는 곤포 추출물 100 µg/ml을 staining 16시간 전 처리하였다. 세포 내 지질은 Nile Red에 의해 붉은 색으로 염색되어 관찰되는데, 곤포 추출물을 함께 투여할 경우 세포 내에서 붉게 관찰되는 지질의 양이 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

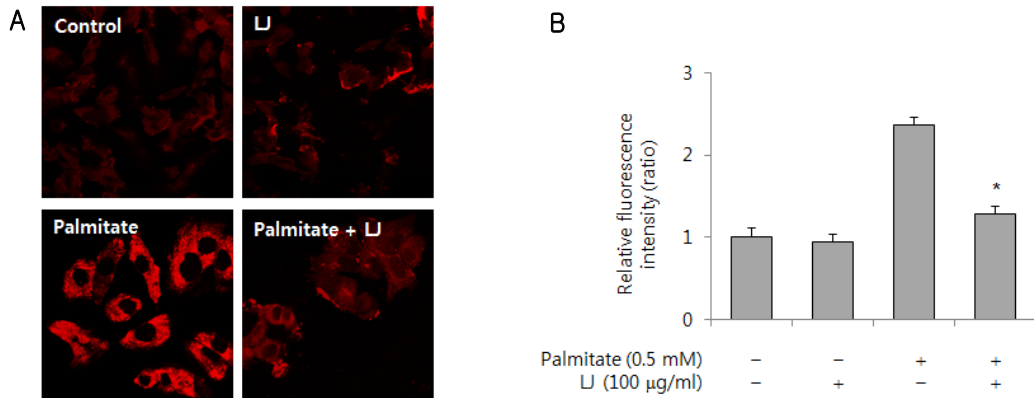


Fig. 2. Effects of LJ on intracellular lipid accumulation in HepG2 cells.

Palmitate were administered to HepG2 cells for 24 h, with or without LJ during last 16 h. After incubation, the cells were stained with Nile red. (A) Intracellular lipid droplets were viewed by fluorescence microscopy (original magnification $\times 400$). (B) Cellular steatosis was quantified for each condition using four random low power fields of view. The fluorescence intensity was expressed as the means \pm SEM (n=3). * $P < 0.05$, compared to palmitate treated cells.

3. 곤포 에탄올 추출물이 LXR α , SREBP-1c에 미치는 영향

LXR α 는 SREBP-1c의 발현을 유도하며, SREBP-1c는 lipogenesis를 조절하는 주요 전사 인자이다⁸. 본 실험에서는 LXR α agonist T0901317로 LXR α 을 통해, SREBP-1c의 발현을 유도하고, 곤포 추출물 투

여 시 LXR α 및 SREBP-1c의 변화를 관찰하였다. HepG2 cell에 T0901317 10 µM을 24처리하였으며, 곤포 투여군에는 마지막 16시간 동안 곤포 추출물을 함께 처리하였다. 곤포 추출물의 처리 농도는 지질 축적 완화 효과가 뚜렷하게 관찰된 농도(100 µg/ml)와 그 보다 낮은 단계의 농도 중 한 농도(50

μg/ml)를 임의로 설정하였다. HepG2 cell에 T0901317을 처리하면 LXRα mRNA의 발현이 증가되었고, SREBP-1c mRNA 및 protein의 발현이 유도되었다. 곤포 추출물을 투여한 세포에서는 T0901317에

의한 LXRα mRNA 발현 증가가 억제되었으며, 결과적으로 SREBP-1c mRNA 및 protein의 발현도 유의하게 억제되었다(Fig. 3).

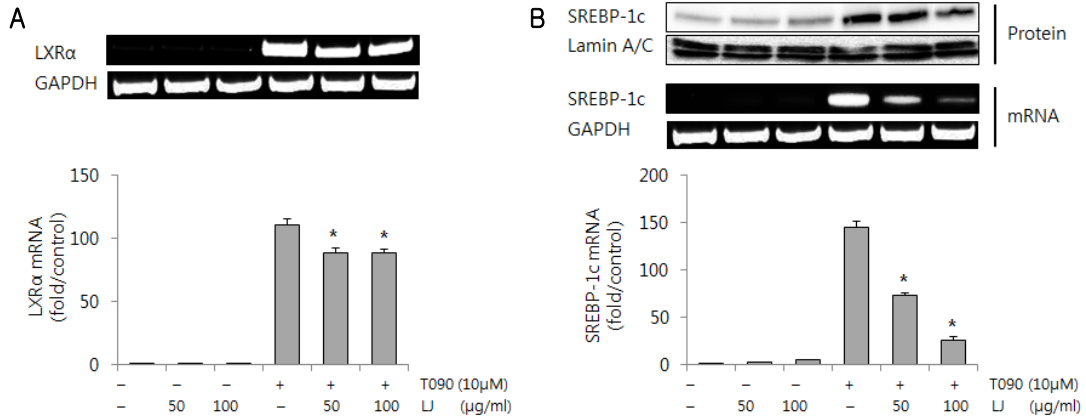


Fig. 3. Effect of LJ on LXRα mediated SREBP-1c expression in HepG2 cells.

The effect of LJ on the expression level of LXRα mRNA (A), and SREBP-1c protein and mRNA (B). The intensity of each PCR band was measured by densitometric analysis (ImageJ), and relative expression of each gene was calculated over GAPDH. Data are presented as the mean ± SEM (n=3). *P<0.05, compared to palmitate treated cells.

4. 곤포 에탄올 추출물이 ACC, FAS, SCD-1에 미치는 영향

ACC, FAS, SCD-1은 SREBP-1c에 의해 발현이 증가하여 중성 지방의 합성에 관여하는 효소들이다¹⁰. HepG2 cell에 T0901317을 처리하면 SREBP-1c이 발현되면서 ACC, FAS, SCD-1 mRNA 또한 증가한다. 위에서 기술한 것과 동일한 방법으로 HepG2 cell에 T0901317과 곤포 추출물을 처리하였다. 곤포 추출물을 함께 처리할 경우 T0901317에 의한 ACC, FAS, SCD-1 mRNA의 발현이 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

5. 곤포 에탄올 추출물이 Nrf2에 미치는 영향

Nrf2는 비알코올성 지방간 질환에서 활성화되어 LXRα-SREBP-1c pathway에 의한 lipogenesis를 억제하는 것으로 알려져 있다¹¹. 곤포 추출물이 Nrf2 활성화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 HepG2 cell에 곤포 추출물 50, 100 μg/ml를 투여하고 8, 16시간 배양한 다음, Nrf2 protein의 변화를 western blot으로 측정하였다. 양성 대조군에는 sulforaphane 10 μM을 처리하였다. 곤포 추출물은 sulforaphane과 같이 Nrf2 protein level을 뚜렷하게 증가시켰다(Fig. 5).

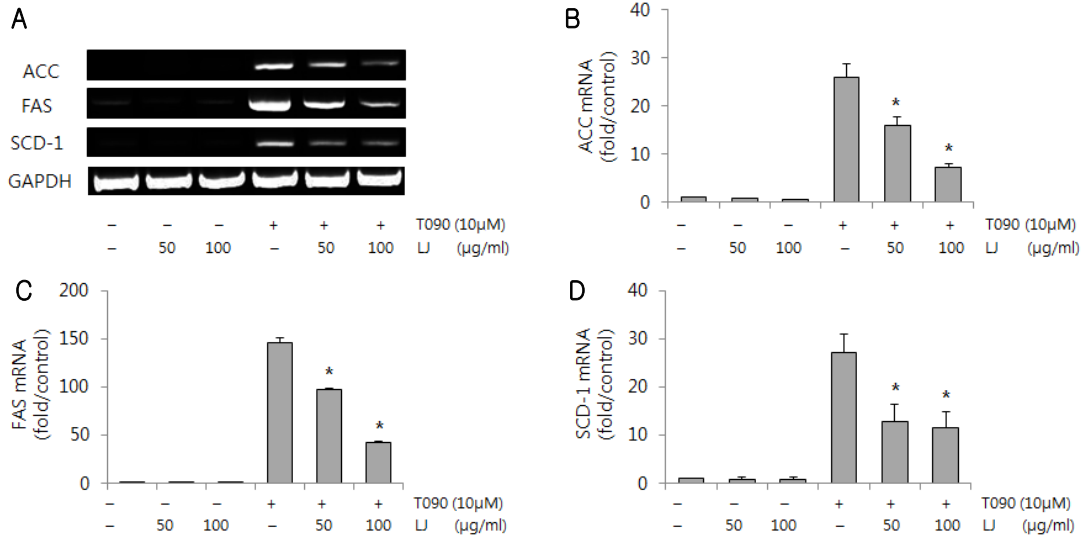


Fig. 4. Effect of LJ on expression of lipogenic genes in HepG2 cells.

Expression of lipogenic genes were determined by semi-quantitative RT-PCR (A), and relative mRNA levels of ACC (B), FAS (C), SCD-1 (D) was represented on each bar graph. Data are presented as the mean \pm SEM (n=3). * P <0.05, compared to palmitate treated cells.

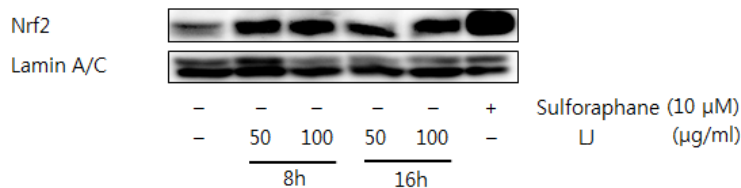


Fig. 5. Effect of LJ on Nrf2 activation in HepG2 cells.

LJ was administered to HepG2 cells for 8 or 16h, and sulforaphane was used as a positive control. Nrf2 was measured by western blot analysis. Lamin A/C was measured as an internal control.

IV. 고찰

비알코올성 지방간 질환은 발병 과정은 복잡한 다단계의 반응으로 구성된다. 처음에는 비만, 당뇨, 고지혈증 등으로 인해 insuline resistance가 유발되고 이로 인해 간내 지질 축적이 증가한다. 증가한 지방산은 mitochondria, peroxisome 및 endoplasmic reticulum에서 대사 과정을 거치며 산화적 스트레스를 유발한다. 증가한 산화적 스트레스는 ATP 및 NAD 고갈, DNA 손상, 각종 단백질과 세포막 손상을 유발

하고, kuffer cell을 활성화시켜 각종 inflammatory cytokines를 증가키시며, stellate cell을 활성화시켜 fibrosis를 유발한다¹².

치료제로는 insulin resistance를 개선하는 metformin, thiazolidinediones; 고지혈증을 개선하는 Statins ezetimibe; 항산화제로 작용하여 산화적 스트레스를 완화시키는 vitamin E, betaine 및 NAC; inflammation을 매개하는 TNF- α 를 억제하는 pentoxifylline; fibrosis를 매개하는 TGF- β 를 억제하는 tranilast 등의 약물에 대한 연구가 진행되어 왔으나, 아직 이들 약물

중 표준 치료로 인정되어지고 있는 치료제는 없는 실정이다³.

곤포(昆布)는 다시마과(Laminariaceae) 다시마 *Laminaria japonica* Areschoung의 엽상체를 말하며, 한의학에서는 《名醫別錄》에 처음 수록되었다¹³. 《東醫寶鑑(外形篇卷三·肉)》에는 “하기(下氣) 작용이 있어, 오래 섭취하면 체중을 감량해주며, 국이나 무침으로 자주 섭취하는 것이 좋다”라고 기록되어 있고⁷, 현대 연구를 통해서도 비만^{14,15}, 당뇨^{16,17}, 고지혈증^{18,19}에 대한 효능이 밝혀져 있다. 본 연구에서는 palmitate에 의해 증가한 세포 내 지질량이 곤포 추출물에 의해 유의하게 감소하는 것을 확인하여, 곤포가 비알코올성 지방간 질환에서 지방증을 완화시키는 효능이 있음을 확인하였다.

SREBP-1c는 간에서 지질 합성 효소들의 발현을 조절하는 주요 전사 인자(transcription factor)이다. SREBP-1c가 증가되면 ACC, FAS, 및 SCD-1과 같은 유전자들의 발현이 증가하여 간 내 지방 합성이 증가한다¹⁰. LXRa는 핵수용체의 하나로 말초 조직에서 간으로 콜레스테롤을 운반하는 단백질 발현을 증가시키고, 간 내에서는 지방산과 중성지방의 합성이 증가되도록 SREBP-1c의 발현을 유도한다^{20,21}. 본 실험에서는 HepG2 cell에 LXRa agonist T0901317을 처리하여 SREBP-1c를 증가시켰으므로, ACC, FAS, SCD-1의 발현을 유도하였는데, T0901317과 함께 곤포 추출물을 처리한 경우에는 T0901317에 의한 SREBP-1c와 ACC, FAS, SCD-1의 발현이 억제되었다. 따라서, 곤포 추출물이 지방증을 완화시키는 작용은 LXRa-SREBP-1c pathway를 차단하여 지질 합성을 저해함으로써 이루어질 가능성이 높다고 판단된다.

Nrf2(NF-E2-related factor 2)는 유해자극에 대응하여 인체의 방어 작용을 유발시키는 전사 인자이다. 세포질 내에서 Keap1(Kelch like-ECH-associated protein 1)과 결합 상태로 존재하는 Nrf2는, 유해자극에 반응하여 Keap1과 분리되어 핵 내로 이동한 후 Maf 단백질과 함께 ARE(Antioxidant Response

Element) 부위에 결합하여 detoxification enzymes, antioxidant proteins, xenobiotic transporters 등의 발현을 유도함으로써, 유해 자극으로부터 생체를 보호하는 역할을 담당한다²². Nrf2는 간에서도 다양한 유해 자극으로부터 간세포를 보호하는 역할을 하는데, Nrf2^{-/-} mice에서 비알코올성 지방간 질환을 유도할 경우 병리 소견들이 더욱 심하게 나타나는 현상이 관찰되었으며²³, 최근 연구에서는 Nrf2가 비알코올성 지방간 질환의 병리 과정 중 triglyceride 축적 억제, SOD and catalase 활성 증가를 통한 산화적 스트레스 감소, NF-κB 억제를 통한 염증 완화, TGF-β 억제를 통한 섬유화 완화 등의 작용을 동시에 나타냄으로써 비알코올성 지방간 질환을 완화시킨다는 사실이 밝혀졌다⁹.

본 연구에서는 곤포 추출물의 anti-lipogenic effect가 Nrf2에 의해 매개되는지를 확인해보기 위해, HepG2 cell에 곤포 추출물을 투여하고 Nrf2의 변화를 관찰하였다. 그 결과 곤포 추출물은 Nrf2 발현을 증가시키는 것이 확인되었으며, 따라서 곤포 추출물의 anti-lipogenic effect가 최소한 부분적으로는 Nrf2 활성화를 통해 이루어지는 것으로 판단할 수 있다. 또한, 상기한 바와 같이 Nrf2는 발병 초기 단계인 지질 축적에서부터, 핵심 병리 기전인 산화적 스트레스 발생, 이에 수반하는 염증과 섬유화 단계에 이르기까지 복합적으로 작용하기 때문에 곤포 추출물은 기존의 비알코올성 지방간 치료제에 비하여 보다 효과적인 약리 활성을 가질 것으로 추정되며 향후 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

이상의 결과를 요약하면, 곤포 추출물은 palmitate로 유도한 비알코올성 지방간 질환 세포 모델에서 지방증을 완화시키는 효능을 나타내며, 이러한 효능은 LXRa-SREBP-1c pathway을 통한 지질 합성 효소들의 발현을 저해함으로써 나타나는 것으로 생각된다. 또한, 이러한 효능이 최소한 부분적으로는

Nrf2를 통해 매개될 것으로 생각되며, Nrf2는 다양한 cytoprotective response에 관여하므로 곤포의 간 세포 보호 작용에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Sourianarayanan A, Pagadala MR, Kirwan JP. Management of non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2013;59(1):69-87.
2. Masuoka HC, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging threat to obese and diabetic individuals. *Ann NY Acad Sci* 2013; 1281:106-22.
3. Beaton MD. Current treatment options for nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Can J Gastroenterol* 2012;26(6):353-7.
4. Shi KQ, Fan YC, Liu WY, Li LF, Chen YP, Zheng MH. Traditional Chinese medicines benefit to nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39(10):9715-22.
5. Kim YS, Kang CO, Kim MH, Cha WS, Shin HJ. Contents of water extract for *laminaria japonica* and its antioxidant activity. *KSBB Journal* 2011; 26(2):112-8.
6. Hasani-Ranjbar S, Jouyandeh Z, Abdollahi M. A systematic review of anti-obesity medicinal plants - an update. *J Diabetes Metab Disord* 2013;12(1):28.
7. Huh J. Donguibogam. Seoul: Beobin Press; 1999, p. 745.
8. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2000;14(22):2819-30.
9. Bataille AM, Manautou JE. Nrf2: a potential target for new therapeutics in liver disease. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92(3):340-8.
10. Pettinelli P, Obregon AM, Videla LA. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Hosp* 2011;26(3):441-50.
11. Kay HY, Kim WD, Hwang SJ, Choi HS, Gilroy RK, Wan YJ, Kim SG. Nrf2 inhibits LXRα-dependent hepatic lipogenesis by competing with FXR for acetylase binding. *Antioxid Redox Signal* 2011;15(8):2135-46.
12. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114(2):147-52.
13. Wu JN. An illustrated Chinese materia medica. New York: Oxford University Press; 2005, p. 368-9.
14. Miyata M, Koyama T, Kamitani T, Toda T, Yazawa K. Anti-obesity effect on rodents of the traditional Japanese food, tororokombu, shaved *Laminaria*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73(10):2326-8.
15. Shirotsaki M, Koyama T. *Laminaria japonica* as a food for the prevention of obesity and diabetes. *Adv Food Nutr Res* 2011;64:199-212.
16. Li X, Yu Z, Long S, Guo Y, Duan D. Hypoglycemic Effect of *Laminaria japonica* Polysaccharide in a Type 2 Diabetes Mellitus Mouse Model. *ISRN Endocrinol* 2012;2012:507462.
17. Jin DQ, Li G, Kim JS, Yong CS, Kim JA,

- Huh K. Preventive effects of *Laminaria japonica* aqueous extract on the oxidative stress and xanthine oxidase activity in streptozotocin-induced diabetic rat liver. *Biol Pharm Bull* 2004;27(7):1037-40.
18. Li C, Gao Y, Li M, Shi W, Liu Z. [Effect of *Laminaria japonica* polysaccharides on lowering serum lipid and anti-atherosclerosis in hyperlipemia quails]. *Zhong Yao Cai* 2005;28(8):676-9.
19. Yuan ZZ, Cheng KM, Huang W, Dilshat, Feng DR. [Study on industrialized extraction technology and function of hyperlipidemic regulating of *Laminaria japonica* polysaccharides]. *Zhong Yao Cai* 2010;33(11):1795-8.
20. Laffitte BA, Chao LC, Li J, Walczak R, Hummasti S, Joseph SB, Castrillo A, Wilpitz DC, Mangelsdorf DJ, Collins JL, Saez E, Tontonoz P. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(9):5419-24.
21. Lee EK, Park YJ. Metabolic regulation of nuclear receptors. *EnM* 2008;23(3):155-64.
22. Copple IM. The Keap1-Nrf2 cell defense pathway—a promising therapeutic target? *Adv Pharmacol* 2012;63:43-79.
23. Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, Dinkova-Kostova AT, Walsh SV, Tsujita T, Dillon JF, Ashford ML, Hayes JD. Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2010;48(2):357-71.