

차전초 잎의 물 추출물이 고지방식으로 비만이 유도된 C57BL/6 생쥐에서 지질대사 단백질 발현에 미치는 영향

김소영^{1#}, 정미진¹, 김유진¹ 이은탁², 추성태², 김미려^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 농업회사법인 (주)이비체

Effect of *Plantaginis asiaticae* Folium water extract on expression of lipid-related protein expression metabolism in high fat-induced obese C57BL/6 mice

So Young Kim^{1#}, Mi Jin Jeong¹, Yoo Jin Kim¹, Un-Tak Lee²
Sung-Tae Choo², Mi Ryeo Kim^{1*}

1 : Dept. of Herbal Pharmacology, Coll. of Korean Medicine, Daegu Haany Univ., Daegu, Korea

2 : Ebiche co., Ltd, Yeongheon, Gyeonbuk, Korea

ABSTRACT

Objective : Previous studies showed that water extract of *Plantago asiatica* (*Plantaginis asiaticae* Folium, PAF) significantly controlled in body weights, adipose tissue weights and blood lipid profiles in obese C57BL/6 mice. To investigate the mechanism of anti-obesity action of PAF, expressions of obesity-related proteins were identified such as p-AMPK and p-ACC in hypothalamus, UCP-1 in brown adipose tissue, p-AMPK, p-ACC, SREBP-1c, PPAR γ , HMGCR and CPT-1 in liver.

Method : Five-weeks old male C57BL/6 mice were divided into 5 groups; ND (normal diet + 0.9% saline), HFD (high-fat diet + 0.9% saline), PC (high-fat diet+Garcinia cambogia 500 mg/kg), PAF 100 and 300 (high-fat diet + PAF 100 or 300 mg/kg). PAF was treated orally for 6 weeks. The protein expression of AMPK, p-AMPK, ACC, p-ACC, PPAR γ , SREBP-1c, HMGCR, CPT-1 and UCP-1 were identified by expression levels of proteins through western blot analysis.

Result : The results showed that protein expressions on hypothalamic p-AMPK and p-ACC did not differ between the HFD and PAF groups. In addition, PAF did not affect the increase of UCP-1 in brown adipose tissue. The protein expression levels of hepatic p-AMPK, p-ACC and CPT-1 increased in PAF groups compared to HFD group. And those of PPAR γ , SREBP-1c and HMG-CoA decreased in PAF groups compared to HFD group.

Conclusion : These results suggest that the PAF administration induce weight loss via inhibition of lipid metabolism-related protein expressions in hepatic tissues. Therefore, PAF could be used as a potent material of anti-obesity products for prevention and treatment of obesity.

Key words : *Plantago asiaticae* Folium, anti-obesity, protein expression

I. 서 론

최근 식생활의 서구화로 인해 일일 섭취 칼로리가 점점 증가하는데 반해 운동량이 감소하면서 비만인구가 증가하는 추세다.

비만은 에너지 소모량에 비해 섭취량이 많아 체내에 지방이 과도하게 축적된 상태로 유전적, 환경적, 정신적 여러 요인이 복합적으로 작용하여 발생한다¹⁾. 한국 질병관리 본부에서 발표한 '한국 보건 통계'에 의하면 1998년, 2001년, 2010년 및

*Corresponding author : Mi Ryeo Kim, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Daegu, Korea.

· Tel : +82-53-770-2241 · E-mail : mrkim@dhu.ac.kr

#First author : So Young Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Daegu, Korea.

· Tel : +82-53-770-2241 · E-mail : un7849@naver.com

· Received : 11 April 2018 · Revised : 10 May 2018 · Accepted : 25 May 2018

2013년의 일일 섭취 칼로리 추세는 각각 2152 kcal, 2107 kcal, 2360 kcal 및 2386 kcal로 지속적인 증가를 보이고 있다²⁾. 비만 유발을 또한 국내성인 남성에서 체질량 지수가 25 kg/m² 이상인 비만율은 1998년 25.7%에서 2014년 37.9%로 증가하였고, 체질량 지수가 30 kg/m² 이상인 비만율은 남, 여 모두 증가하였다³⁾. 이러한 비만율의 증가는 단순한 체중 증가 외에 동맥 경화, 비 알코올성 지방간 및 제 2형 당뇨병 등의 성인병 유발을 증가시키며, 뇌졸중, 심근경색 및 심혈관 질환과도 직접적인 연관성이 있다⁴⁾. 비만 치료의 방법은 크게 '에너지 흡수 (energy intake) 억제' 또는 '에너지 소비 (energy expenditure) 증가'의 두 가지로 나눌 수 있다⁵⁾. 최근에는 에너지의 섭취를 조절하는 중추신경계 및 에너지 소비 증가에 관여하는 갈색지방 등 에너지 소모의 기전에 있어서 많은 연구가 이루어지고 있다⁶⁾. 그러나 비만 치료제 중에서 에너지 소비를 증가시키는 효능을 가진 약물은 거의 발견되지 않았다. 현재 시판되고 있는 비만 치료제는 중추 신경에 작용하여 식욕을 억제시키거나 위장관에서 지방의 체내 흡수를 억제하는 약물이다⁷⁾. 특히 식욕억제제의 경우, amphetamine은 남용 가능성, 심혈관계 부작용, 뇌출혈 위험성 등을 이유로 비만치료에 더 이상 사용되지 않고 있으며, phentermine은 교감신경흥분 작용 때문에 고혈압, 빈맥, 초조, 불면 등의 부작용이 있을 수 있고, 이론적으로 의존, 내성의 위험성이 있다⁸⁾. 이러한 문제점들로 인해 보다 안전한 천연 소재를 활용한 비만 치료약에 대한 연구들이 진행되고 있으며, 지질흡수 감소, 에너지 섭취 감소 및 에너지 소비 증가, 전지방 세포 분화 감소, 지방 생성 감소 기능을 갖는 소재 등이 보고된 바 있다^{9,10)}.

차전초(*Plantago asiatica* L.)는 Plantaginaceae계열에 속하는 다년생 식물로 항염증, 거담 및 이뇨제등 많은 질병의 치료에 오랫동안 사용되어왔으며 많은 아시아 및 유럽 국가에서 의약품 및 식품으로 사용되며 건강식품 원료로 승인되었다¹¹⁾. 또한 예로부터 독성이 낮아 생잎을 씹을 싸 먹거나 나물로 데쳐 먹기도 하였다. 차전초의 성분인 plantamajoside 및 acteoside에 관한 연구로는 항박테리아¹²⁾, 항산화¹³⁾ 및 항염증¹⁴⁾ 등의 작용이 보고되어 있으나, 차전초 잎의 비만억제 작용에 관한 연구는 아직까지 미미한 실정이다. 따라서 저자 등은 비만이 유도된 C57BL/6 생쥐에서 차전초 잎의 열수 추출물(*Plantaginis asiaticae* Folium, PAF) 투여 시에 체중, 지방 조직 및 혈액의 지질 감소에 대한 유의한 효과가 있음을 보고하였으며¹⁵⁾, 본 연구에서는 PAF의 항비만 기전을 규명하고자 고지방식이로 비만이 유발된 생쥐에 PAF를 투여 한 후 지방대사 관련 단백질의 변화들을 관찰하여 얻은 유의한 결과에 대해 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 제조

본 실험에 사용된 영천산 차전초 잎 추출물 및 양성대조군인 *Garcinia cambogia*는 농업회사법인 (주)이비체(Yeongcheon, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 차전초의 잎을 증류수로 깨끗하게 세척한 후 이물질을 제거한 다음 70°C에서 6시간

동안 물로 추출한 후 동결 건조하였으며, 건조물 추출 수율은 16.9%였다. 동결 건조된 약물과 양성대조군은 냉동 보관하면서 실험 직전 증류수에 녹여 적정 농도로 제조한 후 1일 1회 동물에 경구 투여 하였다.

2. 실험동물 및 식이

5주령의 C57BL/6 수컷 마우스를 (주)오리엔트(Seoul, Korea)에서 구입하여 본 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육은 12시간 간격의 light/dark cycle과 온도 23±2°C, 상대 습도 50±10%를 유지하면서 사육하였다. 1주간 적응 기간을 거친 후 난괴법에 따라 정상식이군(ND), 대조군(HFD), 양성대조군(*Garcinia cambogia*, PC), 시료군(PAF 100, 300)으로 구분한 후 물과 식이를 자유급식 하면서 실험을 진행하였다. 실험에 사용된 정상식이 및 고지방식은 각각 AIN-76A (D10001, Research Diets, USA) 및 45% kcal% fat (D12451, Research Diets, USA)를 사용하였다. 정상식이군(ND)과 대조군(HFD)에는 동량의 0.9% saline을 경구로 투여하였으며, 양성대조군(*Garcinia cambogia*, Korea)은 500 mg/kg을 투여하였으며, 시료군에는 차전초 잎 추출물 동결건조 분말(PAF)을 각각 100, 300 mg/kg을 매일 일정한 시간에 1일 1회 6주간 경구로 투여하였다. 실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 승인(DHU2016-093)을 얻었으며 동물 관리 과정을 준수하였다.

Table 1. Diet composition for animal experiment.

Ingredient	ND ¹⁾ (g)	HFD ²⁾ (g)
Casein, 30 Mesh	200	233
DL-Methionine	3	
L-Cystine		3
Corn Starch	150	84.8
Maltodextrin 10		117
Sucrose	500	201.4
Cellulose, BW 200	50	58
Soybean Oil		29
Lard*		206.8
Corn Oil	50	
Mineral Mix S10026		12
DiCalcium Phosphate		15
Calcium Carbonate		6.4
Potassium Citrate, 1 H2O		19.5
Mineral Mix S10001	35	
Vitamin Mix V10001	10	12
Choline Bitartrate	2	2
FD&C Red Dye #40		0.06
Total (g)	1000	1000

¹⁾ND; AIN-76A diet.

²⁾HFD; high fat diet (Rodent Diet with 45% kcal% fat)

3. 실험 조직의 적출

6주 후 실험동물을 12시간 동안 절식시키고 isoflurane (JW pharmaceutical, Korea)를 사용하여 흡입 마취시킨 후 단백질 발현 분석에 필요한 시상하부, 갈색지방 및 간 조직을 적출하였다. 적출 즉시 생리식염수로 수차례 헹군 후 표면의 수분을 제거한 뒤 액체질소로 급속 냉동시킨 후 실험분석 전까지 -80℃에 보관하였다.

4. 단백질 발현 분석

실험동물에서 적출한 조직 0.1 g을 RIPA buffer 1 ml을 넣어 균질화 시킨 다음 13,000 rpm, 4℃에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 분리한 추출액을 Bradford법을 사용하여 단백질을 정량한 뒤 25 µg을 12% Sodium dodecyl sulfate (SDS, BIO-RAD, USA)-PAGE에서 전기영동을 시킨 후 전개시킨 gel을 PVDF membrane (0.45mm, Millipore, USA)으로 transfer하였다. 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk 처리하여 비 특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시한 후 SREBP-1, PPARγ, p-ACC, ACC, p-AMPK, AMPK (1:1000; dilution, Cell Signaling, USA), HMG-CoA (1:1000; dilution, Santa-Cruz Biotechnology, USA), CPT-1 (1: 1000; dilution, abcam, USA) 및 β-actin (1:3000; dilution, Santa-Cruz Biotechnology, USA) 등의 단백질 항체를 4℃에서 각각 overnight 반응 처리하여 phosphate-buffered saline (PBS)에 0.1%의 Tween 20을 함유시킨 PBS-T로 세척 후 각각의 단백질 항체에 알맞은 2차 항체로 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 PBS-T로 수차례 세척 후 ECL (GE Healthcare, UK)시약을 처리하여 Lugen™ Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Scim Inc., Korea)을 이용하여 western band를 검출하였다.

5. 통계 처리

모든 실험 결과의 통계처리는 SPSS program (v. 23.0)을 이용하여 산출되었으며, mean ± S.E. (standard error)로 표시하였다. 유의성 검정은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였고, Duncan's multiple range test에 의해 p<0.05 이상의 수준에서 사후검정을 실시하였다.

III. 결 과

1. PAF 투여가 시상하부의 AMPK, ACC에 미치는 영향

식이 및 체중 조절의 중추적 조절기능을 담당하는 시상하부에서 비만 및 에너지 대사의 표적 단백질인 AMPK와 ACC의 활성을 확인하기 위해 고지방식으로 비만 유발된 생쥐의 시상하부에서 PAF가 AMPK, ACC의 인산화에 미치는 영향을 확

인한 결과는 Fig.1과 같다. HFD군과 비교하여 PAF군 모두에서 유의적으로 AMPK 및 ACC의 인산화가 나타나지 않았으나 감소하는 경향이 나타났다.

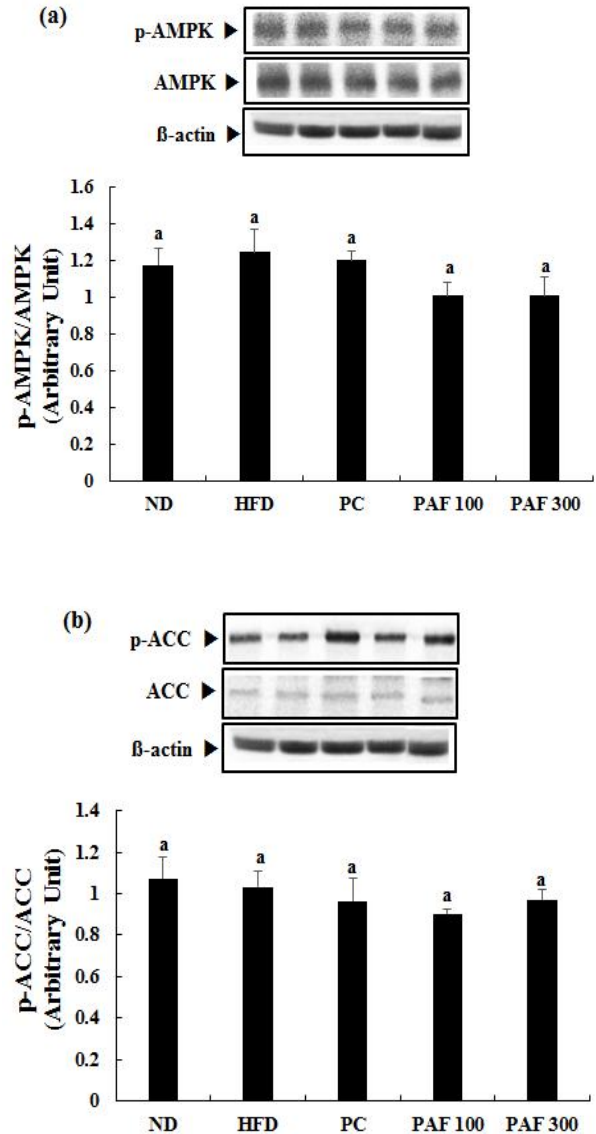


Fig.1. Effects of PAF on hypothalamus protein expressions of AMPK, ACC in C57BL/6J mice fed high-fat diet. Data are presented as mean ± S.E. (n=10). Values not sharing common letter are significantly different among groups at p<0.05. ND; normal diet group, HFD; high fat diet group, PC; *Garcinia cambogia* (500 mg/kg), PAF 100, 300; PAF treated group (100 and 300 mg/kg).

2. PAF 투여가 갈색 지방 조직의 UCP-1에 미치는 영향

고지방식으로 비만 유발된 생쥐의 갈색 지방 조직에서 PAF가 열 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 UCP-1 발현을 확인한 결과는 Fig.2와 같다. ND군에 비해 HFD군에서 UCP-1이 유의적으로 증가하였으며 PAF군 모두에서 HFD군에 비해 감소하는 경향이 나타났다.

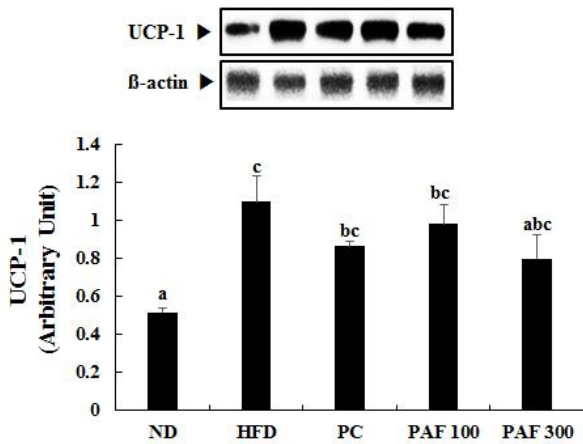


Fig.2. Effects of PAF on UCP-1 expressions of brown adipose tissue in C57BL/6J mice fed high-fat diet. Data are presented as mean \pm S.E. (n=10). ^{abc}Values not sharing common letter are significantly different among groups at $p < 0.05$. ND; normal diet group, HFD; high fat diet group, PC; *Garcinia cambogia* (500 mg/kg), PAF 100, 300; PAF treated group (100 and 300 mg/kg).

3. PAF 투여가 간의 지방 대사관련 단백질 발현에 미치는 영향

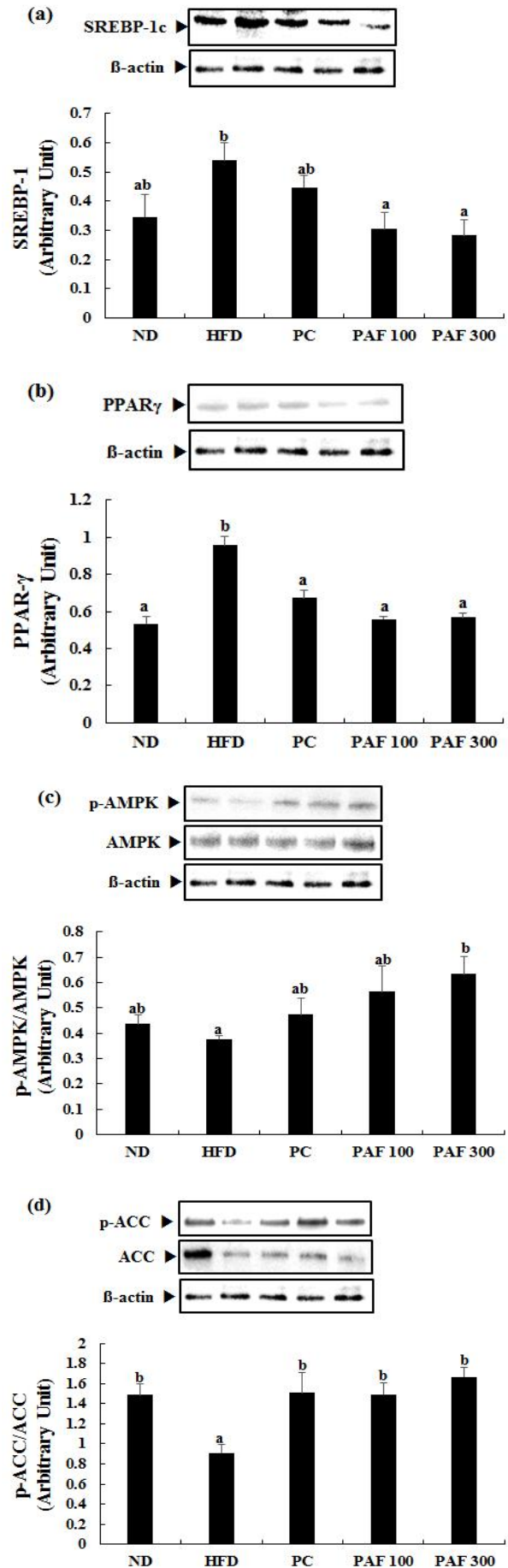
고지방식이로 비만 유발된 생쥐의 간 조직에서 비만관련 인자인 AMPK, ACC, SREBP-1, PPAR γ , HMGCR 및 CPT-1의 단백질 발현에 대해 PAF 조절 효과를 확인하기 위해 단백질 발현을 분석한 결과는 Fig.3과 같다.

지방산 및 콜레스테롤 합성 관련 인자인 SREBP-1c의 단백질 발현을 분석한 결과, ND군에 비해 HFD군에서 SREBP-1c의 단백질 발현이 크게 증가하였고, PAF군 모두에서 HFD군에 비해 SREBP-1c의 단백질 발현도가 유의적으로 감소하였다.

지방세포에서 지방세포 분화조절에 크게 관여하는 전사인자인 PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ)의 단백질 발현은 ND군에 비해 HFD군에서 크게 증가하였으며, PAF 모든 군에서 HFD군에 비해 PPAR γ 의 발현도가 유의적으로 감소하였다.

지질과 포도당 대사의 조절인자이며, 에너지 항상성을 유지하는 핵심인자인 AMPK (AMP-activated protein kinase)의 활성을 측정하기 위해, AMPK 단백질의 인산화 수준을 조사한 결과, ND군에 비해 HFD군에서 AMPK 인산화가 감소하였으며, PAF군에서 HFD군에 비해 AMPK의 인산화가 유의적으로 증가하였다.

지방산 합성을 유도하는 효소인 ACC (acetyl CoA carboxylase)의 인산화는 HFD군에서 ND 군에 비해 감소하였고, HFD 군에 비해 PAF 군에서 유의하게 증가하였다. 게다가 콜레스테롤 생합성 제한 효소인 HMGCR (HMG-CoA reductase)의 발현은 HFD군에 비해 PAF 300군에서 유의하게 억제되었으며, 지방산 산화에 관여하는 CPT-1 (carnitine palmitoyl transferase-1) 단백질발현은 HFD군에 비해 PAF 모든 군에서 유의적으로 증가하였다.



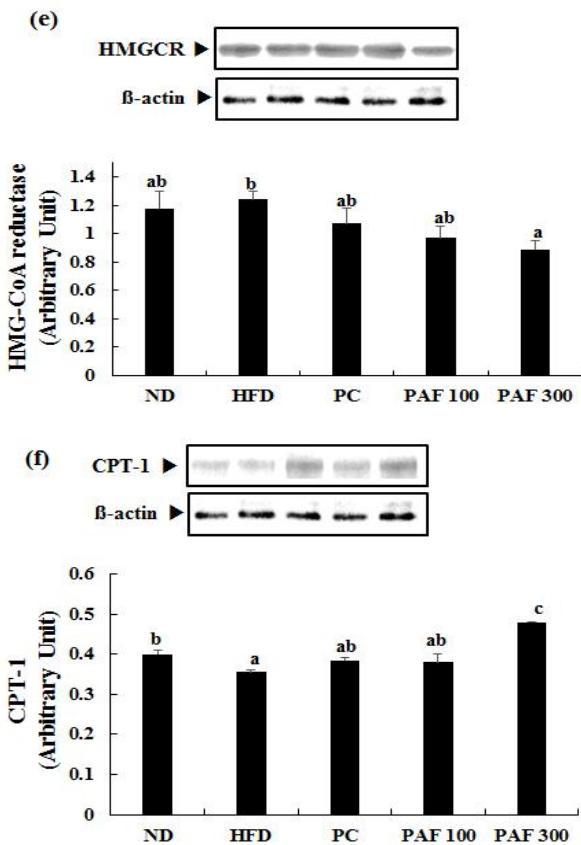


Fig.3. Effects of PAF on lipid-related protein expressions of liver in C57BL/6J mice fed high-fat diet. Data are presented as mean \pm S.E. (n=10). ^{abc}Values not sharing common letter are significantly different among groups at $p < 0.05$. ND; normal diet group, HFD; high fat diet group, PC; *Garcinia cambogia* (500 mg/kg), PAF 100, 300; PAF treated group (100 and 300 mg/kg).

IV. 고찰

한방에서 차전초(*Plantago asiatica* L.)는 약성 및 부위에 따라 차전자와 차전초로 구분하고 있으며, 차전초에 대해 간 보호 및 항염증¹⁶⁾, 항산화¹⁷⁾ 등의 효능이 보고되어 있다. 또한 차전자는 지질대사¹⁸⁾, 면역¹⁹⁾ 및 항산화²⁰⁾ 등의 효능이 보고되어 있으며, 차전초 성분에 대한 연구로는 plantamajoside 및 acteoside에 대해 항박테리아¹²⁾, 항산화¹³⁾ 및 항염증¹⁴⁾의 연구가 보고되어 있다. 그러나 차전초 잎 추출물에 관한 체계적인 항비만 연구는 부족한 실정이었으므로 본 연구자들은 선행 연구에서 고지방식으로 비만을 유도한 생쥐에 차전초 잎의 물 추출물(PAF)을 경구 투여한 후, 혈액생화학적 검사 및 지질 양상을 분석하였으며, 체중 및 조직 무게의 감소, 혈액 및 간에서의 지질 축적 억제, 췌장 lipase의 억제를 통한 체내 중성 지방 배출 증가에 대한 유의적인 결과를 나타낸 것을 확인하였다. 이에 더 나아가 PAF의 항비만 소재로서의 작용기전을 규명하기 위해 에너지 및 지질대사 관련 지표들을 확인하였다.

AMPK-activated protein kinase (AMPK)는 serine/threonine protein kinase로써, 세포의 대사와 에너지 균형을 유지하는데 중요한 역할을 한다²¹⁾. AMPK는 α , β 및 γ 의 3개의

소단위로 구성된 heterotrimeric 단백질로 모든 조직에 존재한다. 각각의 소단위는 $\nu 1$, $\nu 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ 및 $\gamma 3$ 의 여러 유전자가 존재하며, 조직 특이적 방식으로 표현되는 12개의 heterotrimer 조합의 표현이 가능하다²²⁾. 이중 α 소단위의 N-말단에 있는 측쇄부위에 172번 threonine (Thr-172)가 인산화 되는 것이 활성화되는 것으로 알려져 있다²³⁾. 활성화된 AMPK는 지방 조직, 간, 근육 및 시상하부 등 수많은 조직에서 다양한 경로에 관련된 하류 표적 유전자의 인산화 및 조절을 유도 한다²⁴⁾. 위의 조직 중 시상하부의 신경 세포는 다양한 신경 내분비 및 신진 대사 신호에 반응하여 에너지 섭취량과 에너지 소비 변화에 대한 신체의 반응을 조절 한다²⁵⁾. Andersson 등은 시상 하부에서 leptin, peptide YY (3-36) 및 ghrelin과 같은 말초 호르몬에 의해 AMPK 활성을 조절하는 것을 보고하였다²⁶⁾. 특히 시상하부에서 leptin 및 인슐린은 AMPK 활성화를 억제하는 것으로 보고되어 있다²⁷⁾. 본 실험의 연구결과 HFD군에서는 ND군보다 AMPK 발현이 증가하였는데 이는 말초 지방조직에서 분비되는 leptin에 대한 시상하부 조직의 저항성으로 인해 오히려 AMPK 발현이 증가한 것으로 보이며, HFD군에 비해 PAF군에서 시상하부의 AMPK 발현이 통계적으로 유의성은 없었지만 감소하는 경향을 보였다.

지질 대사 측면에서 AMPK 활성화는 지방산 합성을 유도하는 acetyl CoA carboxylase (ACC) 인산화를 통해 불활성화 시킴으로써 간접적으로 HMG-CoA reductase을 억제시키고, CPT-1을 활성화시켜 체내 지질 생성을 방해하기 때문에 중요하다²⁸⁾. 콜레스테롤 생합성 제한 효소인 HMG-CoA reductase는 3-hydroxy methyl glutaryl coenzyme A (HMG-CoA)가 mevalonate로 전환되는 반응을 촉매 함으로써 콜레스테롤 생합성 경로를 조절하며²⁹⁾, 미토콘드리아 내막에 존재하는 carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1)은 에너지원으로 쓰일 지방산을 다른 조직으로 이동시켜 지방산의 β -oxidation을 촉진시키는데 필수적인 carnitine을 미토콘드리아 내막으로 이동시켜 지방축적을 예방한다³⁰⁾. Clouet 등³¹⁾의 보고에서 비만 유도한 zucker rat에서 간 비대 및 중성지방 축적이 증가되었으며, 이는 CPT-1의 활성저하로 인해 미토콘드리아 내로 지방산 이동이 감소한 것으로 추측하였다. 본 연구 또한 마찬가지로 HFD군에 비해 PAF군 모두에서 HMGCR의 억제 및 CPT-1의 활성증가를 확인하였다.

Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs)는 helix-loop-helix 계열 전사인자로서 1a, 1c 및 2의 세 가지 종류가 있다. SREBP-1a 및 SREBP-1c는 지방산과 중성지방 합성에 관여하며, SREBP-2는 콜레스테롤 대사에 관여 한다^{32,33)}. 특히, SREBP-1c는 간 조직에서 발현이 우세한 것으로 알려져 있기 때문에 SREBP-1c의 발현 감소는 지방간의 치료에 핵심적인 역할을 하게 된다^{34,35)}. 따라서 본 연구에서 PAF 투여가 HFD군에 비해 SREBP-1c의 발현을 유의적으로 억제시킨 것을 확인하였는데, 이는 HFD군에 비해 PAF 투여군에서 혈장과 간의 중성지방 및 총 콜레스테롤의 수치가 유의적으로 감소하였으며, 간 조직 내 지방세포의 크기가 감소한 선행연구의 결과와 일치하였다.

지방 조직은 크게 백색 지방 조직과 갈색 지방 조직 두 종류로 나뉘며 백색 지방 조직은 중성지방 형태로 많은 양의 에너지를 저장하기 때문에 비만은 백색 지방 조직이 많이 축적된

특징을 보인다³⁶⁾. 반면에 갈색 지방 조직은 백색 지방 조직에 비해 미토콘드리아가 풍부하며, 성인 보다 신생아에서 더 풍부하게 존재하고 추위, 운동, 음식 섭취 및 감염 등의 여분의 열 발생이 필요한 경우에 열을 발생시켜 에너지 소비를 증가시킴으로써 에너지 균형에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁷⁾. 이러한 갈색지방 조직의 열 생성은 갈색 지방 조직의 미토콘드리아 내막에 존재하는 uncoupling protein-1 (UCP-1)에 의해 이루어지며, 활성화된 UCP-1이 ATP 생성효소의 작용을 억제하고, 열을 발생시킴으로써 체지방 축적을 방해한다³⁸⁾. 여러 연구에서 PPARs가 UCPs 유전자 발현의 주요 조절 인자라는 사실이 입증되어있으며^{39,40)}, William의⁴¹⁾ 연구보고에서 PPAR- γ 를 활성화 시키는 thiazolidinedione계 약물인 로시글리타존 (rosiglitazone)이 쥐의 갈색 지방 조직에서 UCP-1의 mRNA 수준을 증가시키는 것을 보여주었다. 그러나 본 연구의 결과 각 군간의 UCP-1의 변화는 보이지 않았으며, 이는 데이터를 제시하지는 않았지만 갈색지방 조직의 무게를 측정할 결과 무게 변화가 없었기에 유관한 것으로 보여진다.

peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)는 핵 호르몬 수용체의 구성원으로써 α , β 및 γ 의 세 가지 아형이 존재 한다^{42,43)}. 특히, PPAR γ 는 주로 지방조직에서 발현되어 adipogenesis와 lipogenesis를 자극하여 지방전구세포가 지방세포 분화하는데 중요한 역할을 하며, 지질 저장 및 포도당 대사에 관여하는 유전자의 조절에 중요한 역할을 한다⁴⁴⁾. Jones등⁴⁵⁾은 PPAR γ 가 결핍된 쥐에 고지방식을 준 결과 지방조직을 생성하지 못한다고 보고하였다. 따라서 PPAR γ 의 발현 억제는 비만 치료에 중요한 억제요소로 작용하며 이는 HFD군에 비해 PAF군에서 백색조직의 무게가 유의하게 감소하였던 선행연구의 결과와 일치하였다. 본 연구에서 UCP-1 및 PPAR γ 의 단백질 발현을 관찰한 결과, HFD군에 비해 PAF 투여군 모두에서 UCP-1 발현 증가는 나타나지 않았으며, PPAR γ 의 발현은 HFD군에 비해 PAF 투여군 모두에서 유의적으로 억제되었다. 이는 PAF가 에너지 소비에는 영향을 크게 미치지 않으며, 지질의 합성과 지방산 대사 와 같은 지질대사 과정에 작용함으로써 항비만 효능을 나타내는 것으로 사료된다.

요약하자면 PAF의 투여는 고지방식으로 유발된 비만 생쥐의 간 조직에서 SREBP-1c 및 PPAR γ 전사인자의 발현을 억제시키고, AMPK 및 ACC 인산화를 유의적으로 증가시켜 HMG-CoA 억제 및 CPT-1 활성 증가에 영향을 미침으로써, 선행 연구 결과인 체중과 체지방량의 유의한 감소를 가져오는 것으로 사료된다. 따라서 PAF는 비만 치료 및 예방을 위한 기능성 소재로서의 활용할 수 있을 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 PAF의 투여가 고지방식으로 비만이 유발된 생쥐의 비만관련 인자에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시상하부에서 AMPK 및 ACC 단백질 인산화 분석 결과, HFD군에 비해 PAF군 모두에서 감소하는 경향을 나타내었다.

2. 갈색 지방조직에서 UCP-1 단백질 발현 분석 결과, PAF군 모두에서 HFD군에 비해 감소하는 경향이 나타났다.
3. 간에서 SREBP-1c의 단백질 발현 분석 결과, PAF 군 모두에서 HFD군에 비해 유의적인 감소를 보였다.
4. 지방세포 분화 조절에 크게 관여하는 전사인자인 PPAR γ 의 단백질 발현은 PAF 군 모두에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었다.
5. 간에서 AMPK 및 ACC의 인산화 분석 결과, PAF군 모두 HFD군에 비해 AMPK 및 ACC의 활성화가 유의적으로 증가되었다.
6. 간에서 콜레스테롤 생합성 제한 효소인 HMGCR의 단백질 발현은 PAF 300군에서 HFD군에 비해 유의적으로 억제되었다.
7. 간에서 지방산 산화에 관여하는 CPT-1 단백질발현은 HFD군에 비해 PAF 모든 군에서 유의적으로 증가하였다.

이상의 모든 연구결과로부터 고지방식으로 유발된 비만 생쥐에서 PAF투여는 AMPK 활성화를 통하여 간 조직에서 SREBP-1c, PPAR γ 및 HMGCR 전사인자의 발현을 억제시키고, ACC의 인산화 증가 및 CPT-1의 활성화를 통해 콜레스테롤 생성 감소와 지방산의 산화 촉진 및 생성 억제를 통한 지방의 대사를 촉진시킴으로써 비만 생쥐의 체중과 체지방량을 감소시키는 것으로 사료된다. 따라서 PAF는 항비만 효과를 가진 천연물로서, 비만 예방 및 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 연구개발 특구진흥재단-기술이전사업화 사업 (No. 2016DG00010) 및 한국연구재단 (No. 17-220-023)의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

1. James OH, Edward LM, Holly TW. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J Nutr*. 2000 ; 130 : 284S-8S.
2. Korea centers for disease control and prevention, Korea health statistics 2014: Korea national health and nutrition examination survey (KNHANES VI). 2016.
3. Shin HY, Kang HT. Recent trends in the prevalence of underweight, overweight, and obesity in Korean adults: The korean national health and nutrition examination survey from 1998 to 2014. *J Epidemiol*. 2017 ; 27(9) : 413-9.

4. Scott MG. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 ; 89(6) : 2595-600.
5. Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 ; 9(6) : 465-82.
6. Song MY, Lim SK, Wang JH, Kim HJ. The root of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi prevents obesity and glucose intolerance and increases energy metabolism in mice. *Int J Mol Sci.* 2018 ; DOI: 10.3390/ijms19010278.
7. Daneschvar HL, Aronson MD, Smetana GW. FDA-approved anti-obesity drugs in the United states. *Am J Med.* 2016 ; 129(8) : 879.e1-6.
8. Kang JG, Park CY. Anti-obesity drugs: a review about their effects and safety. *Diabetes Metab J.* 2012 ; 36 : 13-25.
9. Yun JW. Possible anti-obesity therapeutics from nature - A review. *Phytochemistry.* 2010 ; 71 : 1625-41.
10. Saad B, Zaid H, Shanak S, Kadan S. Herbal-derived anti-obesity compounds and their action mechanisms. *Anti-diabetes and Anti-obesity Medicinal Plants and Phytochemicals.* 2017 ; 129-44.
11. Ye CL, Jiang CJ. Optimization of crude polysaccharides from *Plantago asiatica* L. by response surface methodology. *Carbohydr Polym.* 2011 ; 84 : 495-502.
12. Ravn H, Brimer L. Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subs *major*. *Phytochemistry.* 1988 ; 27(11) : 3433-7.
13. Tundis R, Bonesi M, Menichini F, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, Pirisi FM, Menichini F. Antioxidant and anti-cholinesterase activity of *Globularia meridionalis* extracts and isolated constituents. *NatProdCommun.* 2012 ; 7 : 1015-20.
14. Danae CO, Sugeyla BG, Jaime RBB, Rola AA, Verónica RL. Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. 2013 ; 18(10) : 12109-18.
15. Kim SY, Jeong MJ, Kim YJ, Lee UT, Choo ST. Effect of *Plantaginis asiaticae* Folium water extract on body fat loss in high fat-induced obese C57BL/6 mice. *Kor J Herbol.* 2018 ; 33(2) : 59-68.
16. Turel I, Hanefi H, Erten R, Oner AC, Cengiz N, Yilmaz O. Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Plantago major* L. *Indian J Pharmacol.* 2009 ; 41(3) : 120-4.
17. Park SJ, Sihn EH, Kim CA. Component analysis and antioxidant activity of *Plantago asiatica* L. *Korea J food Preserv* 2011 ; 18(2) : 212-8.
18. Hu JL, Nie SP, Wu QM, Li C, Fu ZH, Gong J, Cui SW, Xie MY. Polysaccharide from seeds of *Plantago asiatica* L. affects lipid metabolism and colon microbiota of mouse. *J Agric Food Chem.* 2014 ; 62(1) : 229-34.
19. Huang DF, Xie MY, Yin JY, Nie SP, Tang YF, Xie WM, Zhou C. Immunomodulatory activity of the seeds of *Plantago asiatica* L. *J Ethnopharmacol.* 2009 ; 124(3) : 493-8.
20. Yin JY, Nie SP, Zhou C, Wan Y, Xie MY. Chemical characteristics and antioxidant activities of polysaccharide purified from the seeds of *Plantago asiatica* L. *J Sci Food Agric.* 2009 ; DOI 10.1002/jsfa.3793.
21. Hwang JT, Kwon DY, Yoon SH. AMP-activated protein kinase: a potential target for the disease prevention by natural occurring polyphenols. *N Biotechnol.* 2009 ; 26 : 17-22.
22. O'Neill HM, Holloway GP, Steinberg GR. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 2013 ; 366 : 135-51.
23. Hawley SA, Davison M, Wood A, Davies SP, Besi RK, Carling D, Hardie DG. Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver, and identification of threonine-172 as the major site at which it phosphorylates and activates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1996 ; 271 : 27879-87.
24. Kong CS, Kim JA, Kim SK. Anti-obesity effect of sulfated glucosamine by AMPK signal pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Food Chem Toxicol.* 2009 ; 47 : 2401-6.
25. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the Regulation of Energy Balance. *Cell.* 2002 ; 104 : 531-43.
26. Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem.* 2004 ; 279 : 12005-8.
27. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002 ; 415 : 339-43.
28. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase-development of the energy sensor concept. *J Physiol.* 2006 ; 574 : 7-15.
29. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res.* 1993 ; 34 : 1637-59.
30. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system-From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* 1997 ; 244 : 1-14.

31. Clouet P, Henninger C, Bard J. Study of some factors controlling fatty acid oxidation in liver mitochondria of obese Zucker rats. *Biochem J*. 1986 ; 239 : 103–8.
32. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997 ; 89 : 331–40.
33. Kolehmainen M, Vidal H, Alhava E, Uusitupa MIJ. Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity. *Obes Res*. 2001 ; 9(11) : 706–12.
34. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis on the liver. *J Clin Invest*. 2002 ; 109 : 1125–31.
35. Ji C, Chan C, Kaplowitz N. Predominant role of sterol response element binding proteins (SREBP) lipogenic pathways in hepatic steatosis in the murine intragastric ethanol feeding model. *J Hepatol*. 2006 ; 45 : 717–24.
36. Kalupahana NS, Claycombe KJ, Moustaid-Moussa N. (n-3) fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. *Adv Nutr*. 2011 ; 2(4) : 304–16.
37. Harms M, Seale P, Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013 ; 19(10) : 1252–63.
38. Palou A, Pico C, Bonet ML, Oliver P. The uncoupling protein, thermogenin. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 ; 30 : 7–11.
39. Petrovic N, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Thermogenically competent nonadrenergic recruitment in brown preadipocytes by a PPAR γ agonist. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 ; 295 : 287–96.
40. Francesc V, Roser I, Marta G. PPARs in the control of uncoupling proteins gene expression. *PPAR Res*. 2007 ; DIO:10.1155/2007/74364.
41. Festuccia WT, Blanchard PG, Richard D, Deshaies Y. Basal adrenergic tone is required for maximal stimulation of rat brown adipose tissue UCP1 expression by chronic PPAR- γ activation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 ; DIO:10.1152/ajpregu.00821.
42. Peng Z, Borea PA, Varani K, Wilder T, Yee H, Chiriboga L. Adenosine signaling contributes to ethanol-induced fatty liver in mice. *J Clin Invest*. 2009 ; 119 : 582–94.
43. Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunffld C, Feingold KR. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- α) and PPAR- γ messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR- γ -responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology*. 2000 ; 141(11) : 4021–31.
44. Spiegelman BM. PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 1998 ; 47: 507–14.
45. Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner B, Fujimoto Y. Deletion of PPAR γ in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 ; 102 (17) : 6207–12.