

LKB1/AMPK 신호 전달 경로의 활성화로 인한 새싹옻무 열수 추출물의 항비만 효과

김민주^{1#}, 이정훈^{2#}, 최정원¹, 박해진³, 신미래¹, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부
3 : DHU 바이오융복합시험센터

Coix lacryma-jobi var. *mayuen* Stapf Sprout Extract Ameliorates High-Fat Diet-Induced Obesity by Upregulating LKB1/AMPK Signaling

Min Ju Kim^{1#}, Jeong Hoon Lee^{2#}, Jeong Won Choi¹, Hae-Jin Park³
Mi-Rae Shin¹, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University
2 : Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, 3 : DHU Bio Convergence Testing Center

ABSTRACT

Objectives : AMP-activated protein kinase (AMPK) is a key metabolic regulator that reduces lipogenesis. AMPK is mainly activated via phosphorylation of liver kinase B (LKB) 1 under energy stress. Here, we highlighted the anti-obesity effect and underlying mechanism of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout water extract (CSW) sprout extract in connection with the LKB1/AMPK signaling pathway.

Methods : C57BL/6 mice (20~25 g) fed HFD to induce obesity and at the same time administered CSW 100 mg/kg (CSWL; CSW low concentration) or CSW 200 mg/kg (CSWH; CSW high concentration) or Garcinia extract (Garcinia) 200 mg/kg orally for 6 weeks. Body weight and food intake were measured at the same time each day. After 6 weeks of CSW administration, liver tissue and serum were obtained through an autopsy. After the end of the experiment, biochemical analysis (triglycerides (TG), total cholesterol (TC), HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol) was performed on the serum. And then, protein levels related to TG and TC synthesis were measured through western blot analysis in liver tissue.

Results : As a result, serum TG, TC, and LDL-cholesterol levels were significantly increased in the control group and significantly decreased in the CSW administration group. On the other hand, the HDL-cholesterol level was increased in the CSW-administered group. And as a result of Western blot analysis, CSW significantly increased the phosphorylation of LKB1 & AMPK, and remarkably decreased the expression of factors related to TG and TC synthesis.

Conclusions : Our findings suggest that CSW influences the TG and TC synthesis to positively affect HFD-induced obesity in C57BL/6 mice.

Key words : *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout, High-fat diet, Obesity, AMPK, LKB1

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Min Ju Kim, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : mj8976@naver.com

Jeong Hoon Lee, Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA,

· Tel : +82-43-871-5670 · Fax : +82-43-871-5569 · E-mail : artemisia@korea.kr

· Received : 15 October 2021 · Revised : 05 November 2021 · Accepted : 25 November 2021

I. 서론

비만 (Obesity)은 신체적 활동과 성장 등으로 소모되는 에너지의 양보다 섭취하는 에너지의 양이 많아져 지방이 체내에 과하게 축적되는 질환으로 예방 가능한 주요 사망의 원인 중 하나로 전 세계적으로 심각한 사회 문제가 되어 유병률이 매년 증가하고 있는 추세이다^{1,2)}. 세계보건기구 (WHO)에서는 1975년에서 2016년 사이에 비만의 유병률이 3배가량 증가하였으며, 18세 이상의 성인의 경우 약 39% 과체중이다³⁾. 건보공단 비만관리대책위원회에서는 지난 10년간 우리나라 비만 유병률이 약 29%에서 약 32%로 증가하였으며, 19세에서 29세 사이의 젊은 연령층에서 높은 증가세를 보인다고 하였다⁴⁾. 비만은 제2형 당뇨병, 골관절염, 우울증, 심혈관질환 등의 질병으로도 연결되어 건강문제의 위험이 된다⁵⁾. 비만은 식이요법, 약물요법, 운동요법 등의 다양한 치료요법들이 있는데 이들 중 약물요법이 활발하게 이용되고 있다. 흔히 사용되는 약물에는 식욕을 억제하거나 체중증가를 억제하는 phentermine, xenical, mazindol 등 있다⁶⁾. 이러한 약물들은 항비만 효과가 우수하다고 알려져 있는데 장기간 복용하면 신경이 과민해지고, 불면증, 위장장애, 두통 등의 부작용을 야기하게 된다⁷⁾. 한의학에서 비만은 肥白人, 肥, 肥胖, 肥人 등으로 표현하며, 원인을 陽虛, 食積, 痰血, 脾虛 등으로 나누어 치료하고 있으며, 枸杞子, 消脹飲子, 體感薏苡仁湯 등에 대한 항비만 효능 연구들이 있다^{8,9)}.

울무 (薏苡, *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf)는 벼과에 속하며 원산지는 중국, 일본 등의 동남아시아로 최근에는 다른 나라에서도 많이 재배되어지고 있다¹⁰⁾. 우리나라에서는 울무의 종자를 식용으로 많이들 섭취하며, 한의학에서는 薏苡仁으로 性味는 서늘하고 甘, 淡하여 健脾滲濕, 除痺止瀉, 清熱排膿와 같은 효능을 지니고 있어 腳氣, 腸癰, 脾虛泄瀉, 水腫하는 병증들을 치료한다^{11,12)}. 薏苡仁의 효능에 대하여 먼역, 항염증, 항비만 등 다양한 효능에 관한 연구들이 있다¹³⁻¹⁵⁾. 반면, 실험에 사용한 새싹울무 (*Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout)는 울무 종자에서 자라나는 새싹으로¹⁶⁾ 국내외에서 연구들이 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 고지방식이와 동시에 양성대조약물로 지방합성을 억제하는 가르시니아와¹⁷⁾ 새싹울무 열수 추출물을 투여하여 비교하며 새싹울무의 항비만 효능을 연구하였고, 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 추출

본 실험에서 사용한 새싹울무는 조현울무 품종으로 생산하였으며, 2일간의 종자소독과 침종을 하여 7일간 온도 25℃, 습도 90%의 조건에서 상자재배 후 수확하여 58℃의 조건에서 3일간 건조한 것 (건조 수율 7%)을 농촌진흥청 (Rural Development Administration, RDA)에서 공급받았다. 건조된 CSW를 10배수의 증류수에 넣고 2시간동안 100℃에서 끓

여서 추출하였다. 그 후, 여과와 농축을 하여 완전한 분말 형태로 만들었으며, 이를 CSW라 표기하였다 (수율 20%, 수분 함량 4.615%).

2. 시약

본 실험에서 사용된 sodium carbonate, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, potassium phosphate dibasic, sodium hydroxide, potassium phosphate monobasic, quercetin은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, aluminium chloride는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입 후 사용하였다. 그리고 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 triglyceride (TG), total cholesterol (TC) assay kit, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), protease inhibitor cocktail를 구입하였으며, Asan pharmaceutical (Seoul, Korea)에서 High density lipoprotein (HDL)-cholesterol assay kit를 구입하여 사용하였다. 1차 항체인 total AMP-activated protein kinase (t-AMPK), phospho-AMPK, total acetyl-CoA carboxylase (t-ACC), phospho-ACC는 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, β -actin, histone, stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1), 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase (HMGCR), total liver kinase B1 (t-LKB1), phospho-LKB1, fatty acid synthase (FAS), sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2) 및 sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1)은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. 그리고 2차 항체는 GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 BCA protein assay kit를 구입하였으며, nitrocellulose membranes와 ECL Western Blotting Detection Reagents를 Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)에서 구입하여 사용하였다.

3. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

Folin-Denis 방법¹⁸⁾으로 CSW의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μ L, 7.5% sodium carbonate 400 μ L와 sample 100 μ L를 잘 혼합하여 30분간 반응시켜 765 nm에서 값을 측정하였으며, 표준물질로 사용한 gallic acid의 표준곡선에 값을 대입하여 mg (gallic acid equivalents (GAE))/g로 환산하였다.

Aluminium chloride를 사용한 비색법¹⁸⁾으로 CSW의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 10% aluminium chloride solution 20 μ L, sample 100 μ L, 1 M potassium acetate solution 20 μ L, 증류수 560 μ L, methanol 300 μ L를 잘 혼합하여 30분간 반응시켜 415 nm에서 값을 측정하였으며, 표준물질로 사용한 quercetin의 표준곡선에 값을 대입하여 mg (quercetin equivalents (QE))/g로 환산하였다.

4. 비만 유발 및 효능 평가

1) 비만 유발 및 약물투여

4주령의 수컷 C57BL/6 mouse를 DBL (Eumseong, Korea)에서 구입하여, 물과 고형사료를 충분히 공급하며 일주 일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실은 명암주기 12시간, 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 가 되도록 조절하였다. 본 실험은 대한한의대학교 동물 실험 윤리 위원회의 승인 (2021-067)을 얻어 실험을 시행하였으며 동물 관리 규정을 준수하였다. 실험은 6주간 진행되었으며, 실험군은 5군으로 다음과 같다; 일반사료를 공급받은 정상군 (Normal), 고지방식이 (60% High-fat Diet (HFD), Table 1)를 공급받은 대조군 (Control), 고지방식사와 동시에 가르시니아 추출물 200 mg/kg/day로 경구 투여 받은 가르시니아군 (Garcinia), 고지방식사와 동시에 CSW를 100 mg/kg/day로 투여 받은 CSW 저농도군 (CSWL), 고지방식사와 동시에 CSW를 200 mg/kg/day로 투여 받은 CSW 고농도군 (CSWH). 6주 동안 하루에 한번 동일한 시간에 실험동물의 체중과 식이섭취량을 측정하였다. 부검 하루전날 15시간 절식 후, isoflurane을 사용해 마취하여 심장에서 혈액을 채취하였고, 그 후 간 조직을 적출하였다. 간 조직과 혈액은 사용하기 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

식이효율 (food efficiency ratio, FER)

식이효율 (%) = 체중 증가량 / 사료 섭취량 \times 100

Table 1. The Ingredients of 60% High Fat Diet (HFD)

Product #	D12492	
	kcal%	gm%
Protein	20	26.2
Carbohydrate	20	26.3
Fat	60	34.9
Total	100	
kcal/gm		5.24
Ingredients	kcal	gm
FD&C Blue Dye#1	0.05	0
L-Cystine	12	3
Dicalcium phosphate	13	0
Cellulose, BW200	0	50
sucrose	275.2	68.8
Corn starch	0	0
Soyabean oil	225	25
Lard	2205	245
Mineral mix S10026	0	10
Vitamin mix V10001	40	10
Calcium Carbonate	0	5.5
Potassium citrate	0	16.5
Maltodextrin 10	125	500
Choline bitartrate	0	2
Casein, 80 Mesh	200	800

2) 비만관련 바이오마커 측정

부검에서 채취한 혈액을 4°C , 4000rpm 조건으로 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 그 후, 혈청에서 비만관련 바이오마커인 TG, TC, HDL-cholesterol를 assay kit를 사용하여 측정하였으며, Low density lipoprotein (LDL)-cholesterol은 아래의 Friedewald의 식에 대입하여 구하였다¹⁸⁾.

$$\text{LDL-cholesterol} = \text{TC} - (\text{HDL-cholesterol} + (\text{TC}/5))$$

3) Western blotting

간 조직에 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 15 mM CaCl_2 , 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, 2 mM MgCl_2 , 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), protease inhibitor cocktail이 첨가된 buffer A와 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 50 mM KCl, 50 mM HEPES, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol이 첨가된 buffer C를 사용해 세포질과 핵을 분리하였다. 단백질 발현을 측정하기 위해 10 μg 의 단백질을 8 ~12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 후, nitrocellulose membrane으로 acrylamide gel을 이동시켰다. 그 다음, membrane에 1차 항체 (PBS-T로 1:1000로 희석 후 사용)를 처리하여 4°C 에서 overnight 시킨 다음 PBS-T를 사용하여 세척하였다. 그 후, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석 후 사용)를 사용하여 상온에서 2시간 반응시키고 PBS-T로 세척한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에 노출시킨 다음, Sensi-Q2000 Chemidoc으로 단백질 발현을 확인한 후, ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 해당 밴드를 정량하여 실험군간에 발현량을 비교하였다 (Fold of normal).

5. 통계분석

실험에 사용된 값들은 *in vitro* mean \pm SEM, *in vivo* mean \pm SD로 표시하였다. SPSS (Version 26.0, IBM, Chicago, IL USA)로 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 사용한 후, least-significant differences (LSD) test로 사후 검정을 실시하여 유의수준 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

CSW의 총 폴리페놀 함량 측정 결과, 82.44 ± 0.90 mg (GAE)/g으로 측정되었으며, 총 플라보노이드 함량 측정 결과, 13.30 ± 0.23 mg (QE)/g로 함량이 측정되었다 (Table 2).

Table 2. Total Polyphenol and Flavonoid Contents of CSW

Sample	Total polyphenol (mg (GAE)/g)	Total flavonoid (mg (QE)/g)
CSW	82.44 ± 0.90	13.30 ± 0.23

CSW is *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout water extract. All data are expressed mean ± SEM.

2. 체중 및 식이효율

실험 기간 동안 체중의 변화량은 측정 결과, 대조군 값은 정상군 값의 약 1.98배 ($p < 0.001$)로 고지방식이로 인해 유의하게 체중이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 가르시니아군, CSW 저농도군, CSW 고농도군의 값들은 각각 대조군의 약 0.74배, 0.81배, 0.75배로 약물 투여로 인하여 체중 증가가 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Garcinia $p < 0.01$, CSWL $p < 0.05$, CSWH $p < 0.01$) (Fig. 1A).

식이효율 (Food Efficiency Ratio, FER)은 정상군 8.26 ± 0.86%에 비해서 대조군에서 22.20 ± 0.79%로 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.001$), 약물 투여군들은 각각 가르시니아군 15.40 ± 1.34% ($p < 0.001$), CSW 저농도군 18.43 ± 0.48% ($p < 0.01$), CSW 고농도군 17.34 ± 0.73% ($p < 0.01$)로 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다 (Fig. 1B).

3. 비만관련 바이오마커 측정

혈청 내 비만관련 바이오마커를 kit를 사용하여 측정하였다. 그 결과 정상군에 비해 고지방식이를 섭취한 대조군에서 TG, TC 및 LDL-cholesterol의 수준을 유의하게 증가시켰다 ($p < 0.001$). 이러한 대조군에 비하여 가르시니아군과 CSW 고농도군에서 고지방식이로 증가된 TG, TC 및 LDL-cholesterol 수준을 현저히 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 HDL-cholesterol 수준은 정상군에 비해서 고지방식이를 섭취한 대조군에서 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.001$), 가르시니아군 ($p < 0.05$)과 CSW 고농도군 ($p < 0.05$)에서 유의하게 증가하였다 (Table 3).

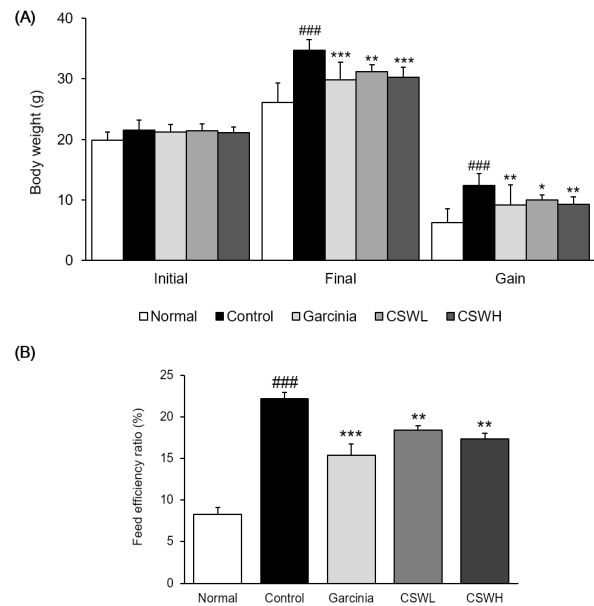


Fig. 1. Initial body weight, final body weight, gain body weight, and feed efficiency ratio in HFD-fed Obese mice.

(A) body weight, (B) feed efficiency ratio.

Normal ; normal mice, Control ; 60% HFD-fed Obese mice, Garcinia ; 60% HFD-fed Obese mice treated with Garcinia 200 mg/kg/day.

CSWL ; 60% HFD-fed Obese mice treated with *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout 100 mg/kg/day.

CSWH ; 60% HFD-fed Obese mice treated with *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout 200 mg/kg body.

All data are expressed mean ± SD (n=6 mice per group).

Significance: $^{###}p < 0.001$ compared vs. Normal group and $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, and $^{***}p < 0.001$ vs. Control group by LSD test.

Table 3. Triglyceride, Total Cholesterol, HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol Levels in Serum.

Group	Triglyceride (mg/dL)		Total cholesterol (mg/dL)		HDL-cholesterol (mg/dL)		LDL-cholesterol (mg/dL)	
Normal	99.16	± 5.79	75.46	± 2.38	39.48	± 1.8	22.45	± 3.31
Control	191.47	± 5.57 ^{###}	139.04	± 4.09 ^{###}	23.97	± 1.09 ^{###}	76.74	± 5.88 ^{###}
Garcinia	154.89	± 7.71 ^{***}	103.69	± 7.12 ^{***}	32.77	± 3.16 [*]	49.88	± 3.86 ^{**}
CSWL	164.77	± 7.27 ^{**}	121.07	± 7.78 [*]	30.29	± 4.67	61.45	± 9.32
CSWH	126.83	± 6.24 ^{***}	105.13	± 9.08 ^{***}	33.66	± 3.71 [*]	54.08	± 3.38 ^{**}

Normal ; normal mice, Control ; 60% high fat diet-fed Obese mice, Garcinia ; 60% high fat diet-fed Obese mice treated with Garcinia 200 mg/kg/day, CSWL ; 60% high fat diet-fed Obese mice treated with *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout 100 mg/kg/day, CSWH ; 60% high fat diet-fed Obese mice treated with *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout 200 mg/kg body. All data are expressed mean ± SD (n=6 mice per group). Significance: $^{###}p < 0.001$ compared vs. Normal group and $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, and $^{***}p < 0.001$ vs. Control group by LSD test.

4. 간 조직 내 p-LKB1과 p-AMPK 발현량 측정

간 조직에서 LKB1과 AMPK의 인산화를 측정된 결과, 두 인자 모두 정상군에 비해 대조군에서 고지방식이 섭취로 인하여 인산화가 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.001$), 가르시니아군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (p-LKB1 $p < 0.001$, p-AMPK $p < 0.01$). 그리고 두 인자 모두 CSW를 투여한 군에서 농도의존적으로 유의하게 발현이 증가하였다 (CSWL $p < 0.01$, CSWH $p < 0.001$) (Fig. 2).

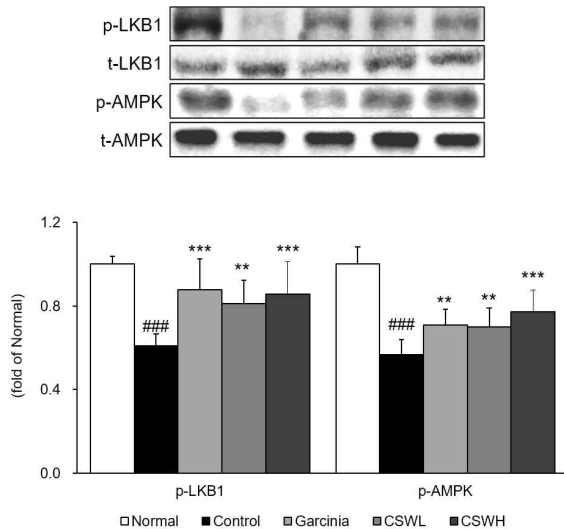


Fig. 2. Expressions of p-LKB1 and p-AMPK in liver tissue. Normal ; normal mice, Control ; 60% HFD-fed Obese mice, Garcinia ; 60% HFD-fed Obese mice treated with Garcinia 200 mg/kg/day, CSWL ; 60% HFD-fed Obese mice treated with *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout 100 mg/kg/day, CSWH ; 60% HFD-fed Obese mice treated with *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout 200 mg/kg body. All data are expressed mean \pm SD (n=6 mice per group). Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control group by LSD test.

5. 간 조직 내 지방 합성관련 전사인자 발현량 측정

간 조직에서 지방 합성에 관련된 전사인자인 SREBP-1과 SREBP-2의 발현량을 측정하였다. 그 결과, 두 인자 모두 정상군에 비하여 대조군에서 고지방식이 섭취로 인해 발현이 유의하게 증가하였다 ($p < 0.001$). 그리고 대조군과 비교해 모든 약물 투여군들에서 발현이 감소하였는데, 특히 TG 합성 전사인자인 SREBP-1에서 가르시니아군과 CSW 고농도군이 정상군 수준까지 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.001$) (Fig. 3).

6. 간 조직 내 지방 합성관련 단백질 발현량 측정

간 조직 내 TG 합성관련 단백질인 p-ACC, FAS, SCD-1와 TC 합성관련 단백질인 HMGCR의 발현을 측정하였다. 그 결과 ACC의 인산화는 정상군에 비하여 대조군에서 유의하게 감소하였으며, 가르시니아군 ($p < 0.001$)과 CSW 고농도군 ($p < 0.01$)에서 유의하게 인산화가 증가하였다. 그리고 FAS, SCD-1, HMGCR 측정 결과, 모든 인자에서 정상군에 비하여 대조군

에서 고지방식으로 인하여 발현이 증가하였다 ($p < 0.001$). 반면에 약물투여군들에서 대조군에 비하여 발현이 유의하게 감소하였다. 특히 SCD-1는 가르시니아군과 CSW 고농도군이 정상군 수준까지 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.001$) (Fig. 4).

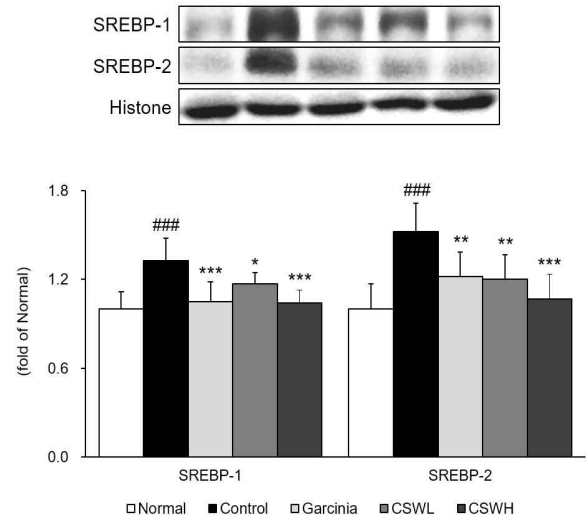


Fig. 3. Expressions of SREBP-1 and SREBP-2 in liver tissue. Normal ; normal mice, Control ; 60% HFD-fed Obese mice, Garcinia ; 60% HFD-fed Obese mice treated with Garcinia 200 mg/kg/day, CSWL ; 60% HFD-fed Obese mice treated with *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout 100 mg/kg/day, CSWH ; 60% HFD-fed Obese mice treated with *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout 200 mg/kg body. All data are expressed mean \pm SD (n=6 mice per group). Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and ** $p < 0.05$, * $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. Control group by LSD test.

IV. 고찰

울무 (*Coix lacryma-jobi* var. *mayeun* Stapf)는 초본식물로 벼과에 속해있으며 우리나라의 대부분의 지역에서 재배되어지고 있다¹⁰). 울무의 잎과 줄기는 가축의 사료로 사용하고 종자는 한약재 또는 식품 등으로 많이들 사용하고 있다¹⁹). 울무 종자의 효능에 대해 항비만, 항산화, 항염증 등의 많은 연구들이 보고되어 있다²⁰). 새싹울무는 이러한 울무 종자에서 자라나는 새싹으로¹⁶) 현재 비만에 관한 연구로는 알려지지 않았다. 이에 본 연구에서는 새싹울무 열수 추출물 (*Coix lacryma-jobi* var. *mayeun* Stapf sprout water extract; CSW)의 항비만 효과를 확인하기 위하여 실험을 진행하였다.

실험을 위해 수컷의 C57BL/6 mice에 고지방식을 6주간 공급하였으며, 동시에 가르시니아 추출물 또는 CSW를 경구 투여해 주었다. 실험 종료 후, 부검으로 얻은 혈청을 통해 비만관련 바이오마커인 TG, TC, HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol의 수준을 측정하였으며, western blotting 분석을 통해 간 조직 내 지방합성관련 단백질 인자들의 발현을 측정하였다.

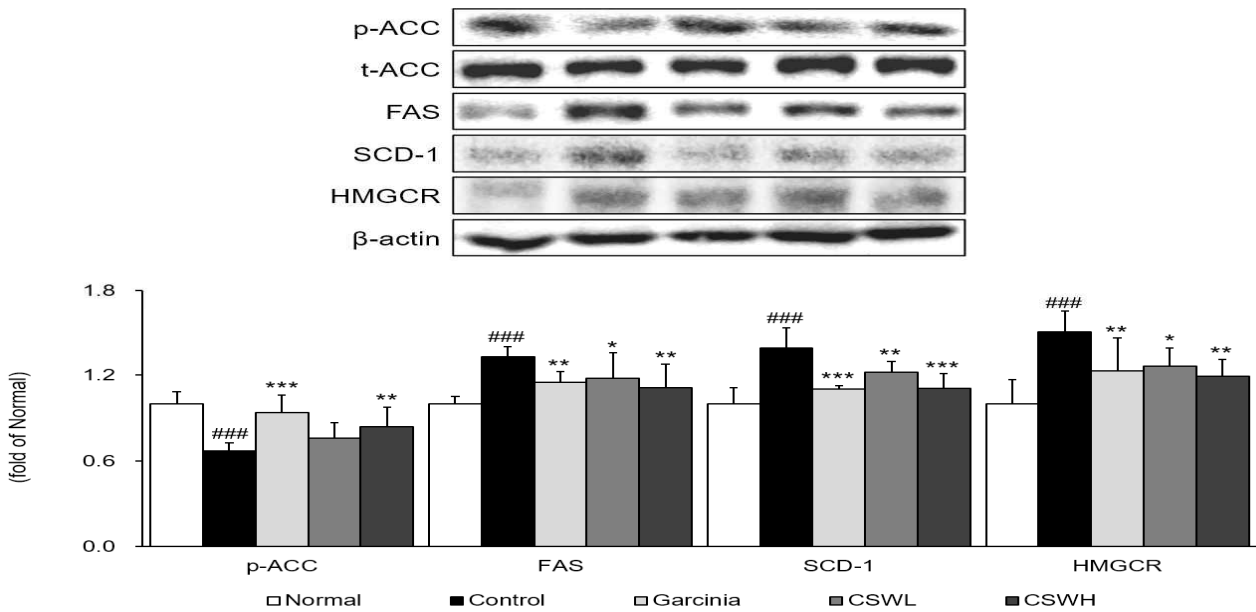


Fig. 4. Expressions of p-ACC, FAS, SCD-1, and HMGCR in liver tissue.

Normal ; normal mice, Control ; 60% HFD-fed Obese mice, Garcinia ; 60% HFD-fed Obese mice treated with *Garcinia* 200 mg/kg/day, CSWL ; 60% HFD-fed Obese mice treated with *Coix lacryma-jobi var. mayuen* Stapf sprout 100 mg/kg/day, CSWH ; 60% HFD-fed Obese mice treated with *Coix lacryma-jobi var. mayuen* Stapf sprout 200 mg/kg body. All data are expressed mean±SD (n=6 mice per group). Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. Control group by LSD test.

신체활동과 성장에 필요한 에너지보다 칼로리 섭취가 과잉 되면 TG의 형태로 지방조직에 많이 축적된 열량 불균형이 일어나게 되어 체중이 증가하게 된다²¹). 이에 혈청 내의 TG의 수준을 측정된 결과, 고지방식이 섭취에 의해 대조군에서 정상군에 비해 유의한 증가가 있었으며, CSW 투여에 의해 농도 의존적으로 감소되었다. Cholesterol은 세포막과 신경세포의 수초와 지단백을 구성하는 성분이다. 그 중 LDL-cholesterol은 몸속의 cholesterol을 혈관으로 이동시키는데 체중이 높을수록 LDL-cholesterol 수준이 증가한다고 알려져 있다. 반대로 HDL-cholesterol은 혈관 속으로 이동된 cholesterol을 없애 주는 역할을 하는데 체중이 높을수록 HDL-cholesterol 수준은 감소한다고 알려져 있다²²). 이러한 TC, LDL-cholesterol 및 HDL-cholesterol의 수준을 혈청에서 측정하였다. TC와 LDL-cholesterol은 고지방식으로 인해 모든 군에서 정상군보다 증가하였으며, 대조군과 비교해 가르시니아군과 CSW투여군에서 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 반면 HDL-cholesterol 수준은 대조군에 비하여 약물 투여군에서 증가하였다. 이러한 점으로 미루어 보아 CSW는 혈청 내에서 비만관련 바이오마커들을 조절하여 항비만 효과를 낼 수 있을 것으로 사료된다.

AMPK의 활성화는 새로운 지질생합성 경로에 영향을 미친다고 알려져 있다²³). 이러한 AMPK는 LKB1에 의해 활성화된다²⁴). 두 인자를 western blotting 분석을 통해 간 조직 내에서 측정하였다. 그 결과, 고지방식이 섭취에 의해 감소한 LKB1과 AMPK의 인산화를 CSW의 투여로 인해 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

지방세포의 지방생성과 TG 축적은 주로 지방 조직이 크기가 증가하는데 영향을 준다²⁵). 이러한 지방생성은 SREBP-1 등의 많은 전사인자들에 조절된다²⁶). 그리고 TG 합성관련 인자들로 ACC, FAS, SCD-1가 있는데 이들은 SREBP-1의 표적인자로서 활동한다²⁷). TG 합성에 관여하는 이에 간 조직에서

western blotting 분석을 통해 SREBP-1과 TG 합성관련 인자들을 발현을 측정된 결과, 고지방식으로 활성이 증가한 SREBP-1을 CSW 투여로 감소시킴으로써 TG 합성관련 인자인 ACC, FAS 및 SCD-1의 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. SREBP-2는 HMGCR과 같은 cholesterol 합성 유전자를 조절하는 전사인자이다^{28,29}). 이 두 인자를 western blotting 분석으로 간 조직에서 측정된 결과, 고지방식이 섭취로 증가한 SREBP-2를 CSW 투여로 감소시킴으로써 HMGCR의 발현을 감소시켰다.

이상의 결과들은 고지방식이 섭취와 동시에 CSW의 투여로 LKB1/AMPK를 활성화시켜 TG, cholesterol 합성에 관여하는 SREBP-1, SREBP-2의 경로를 통해 지방합성을 억제하는 항비만 효과를 보이는 것으로 판단되어진다.

V. 결 론

본 연구에서는 고지방식으로 유발된 동물모델에서 CSW의 비만 개선 효과를 확인하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 실험기간 동안 몸무게 변화량을 측정된 결과, 고지방식만 섭취한 대조군에 비해서 CSW를 투여하였을 때 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다.
2. 고지방식이를 섭취한 동물모델의 혈청 내에서 비만관련 바이오마커를 측정된 결과, CSW 투여가 TG, TC, LDL-cholesterol 수준을 유의하게 감소시켰으며, HDL-cholesterol의 수준은 유의하게 증가시켰다.

3. 간 조직에서 지방합성에 영향을 주는 AMPK와 LKB1의 발현을 측정된 결과, 고지방식으로 감소된 인산화를 CSW 투여로 유의하게 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.
4. 간 조직에서 TG 합성관련하여 SREBP-1, ACC, FAS, SCD-1의 발현을 측정된 결과, CSW 투여가 전사인자인 SREBP-1를 감소시킴으로써 ACC, FAS, SCD-1 발현을 유의하게 줄이는 것을 확인할 수 있었다.
5. 간 조직에서 cholesterol 합성관련하여 SREBP-2와 HMGCR의 발현을 측정된 결과, CSW 투여가 전사인자인 SREBP-2를 감소시킴으로써 HMGCR의 발현을 감소시켰다.

따라서 고지방식이 섭취 동물모델에서 몸무게 체중 변화량과 혈청 내 비만관련 바이오마커 수준, 간 조직 내 지방합성관련 인자의 단백질 발현량을 측정된 결과를 통해 CSW가 항비만 효과가 있다고 사료된다.

감사의 글

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업 (과제번호: PJ0142510 2021)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Chang SJ, Wang JH, Choi HS, Chin YW, Kim HJ. The Effect of Scutellariae Radix Combined with Metformin on Obesity-Relating Biomarker in High Fat Fed C57BL/6 Mice. *J Korean Med Obes Res.* 2017;17(1):20-28.
2. Seo YJ, Kim KJ, Choi J, Koh EJ, Lee BY. Spirulina maxima Extract Reduces Obesity through Suppression of Adipogenesis and Activation of Browning in 3T3-L1 Cells and High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients.* 2018;10(6):10,3390/nu10060712.
3. JMuhamad Adyab NS, Rahmat A, Abdul Kadir NAA, Jaafar H, Shukri R, Ramli NS. Mangosteen (*Garcinia mangostana*) flesh supplementation attenuates biochemical and morphological changes in the liver and kidney of high fat diet-induced obese rats. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(1):10,1186/s12906-019-2764-5.
4. Jang YE, Seo BI. The Anti-obesity Effects of Platycodi Radix, Combination of Platycodi Radix and Cyperi Rhizoma on Obesity Induced by High Fat Diet. *Kor. J. Herbol.* 2016;31(3):1-11.
5. Jung YC, Kim HW, Min BK, Cho JY, Son HJ, Lee JY, Kim JY, Kwon SB, Li Q, Lee HW. Inhibitory Effect of Olive Leaf Extract on Obesity in High-fat Diet-induced Mice. *In Vivo.* 2019;33(3):10,21873/invivo.11529.
6. Lee DS, Lee MH, Kim HS, Jeong TR, Hyun HS, Lee JM. Anti-Obesity Effect of Pine Cone (*Pinus koraiensis*) Supercritical Extract in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *In Vivo.* 2016;45(12):1701-1707.
7. Reddy P, Chow MSS. Focus on orlistat: A nonsystemic inhibitor of gastrointestinal lipase for weight reduction in the management of obesity. *Formulary.* 1998;33(10):943-959.
8. Baek SJ, Kim DH. The Study on anti-obesity of Myrrh ethanol extract. *Kor. J. Herbol.* 2016;31(4):11-18.
9. Song MY. Evaluation of Efficacy of Aconitum carmichaeli Debx Extract on Obesity and Glucose Tolerance in Diet Induced Obese Mice. *J Korean Med Obes Res.* 2017;17(1):29-36.
10. Son ES, Kim SH, Kim YO, Lee YE, Kyung SY, Jeong SH, Kim YJ, Park JW. *Coix lacryma-jobi* var. *ma-yuen* Stapf sprout extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical carcinoma cells. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(1):312.
11. Chung CP, Hsia SM, Lee MY, Chen HJ, Cheng F, Chan LC, Kuo YH, Lin YL, Chiang W. Gastroprotective Activities of Adlay (*Coix Lachryma-Jobi Ma-Yuen Stapf*) on the Growth of the Stomach Cancer AGS Cell Line and Indomethacin-Induced Gastric Ulcers. *J Agric Food Chem.* 2011;59(11):6025-6033.
12. Cho SI, Kim HW, Kim JS. Effect of Coicis Semen Extract on Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy Rats. *Kor. J. Herbol.* 2006;21(3):75-81.
13. Woo YE, Kim HK, Song BK, Lee EJ. Effects of Coicis Semen on the Immune Responses in the Mouse. *Korean journal of oriental medicine.* 1996;2(1):269-288.
14. Yun HJ, Lee YJ, Kang MS, Baek JH. Inhibitory Effect of Coicis Semen Extract(CSE) on Pro-inflammatory Mediator. *J Korean Oriental Pediatrics.* 2009;23(1):159-171.
15. Song MY, Jung HW, Park YK. Antiobesity Effect of Water Extract of *Coix lacrymajobi* var. *mayuen* in High Fat Fed C57BL/6 Mice. *J Korean Med Obes Res.* 2016;16(1):27-35.
16. Kim MJ, Lee JH, Shin MR, Roh SS. Single Oral Dose Toxicity Test of *Coix lacryma-jobi* var. *ma-yuen* Stapf Sprout in Sprague-Dawley Rats. *Kor. J. Herbol.* 2021;36(5):109-115.
17. Kim YJ, Choi MS, Park YB, Kim SR, Lee MK,

- Jung UJ. *Garcinia Cambogia* attenuates diet-induced adiposity but exacerbates hepatic collagen accumulation and inflammation. *World J Gastroenterol*. 2013;19(29):4689–4701.
18. P Rama, A Vignesh, G Lakshmanan. IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *ACHYRANTHES ASPERA* LINN. *Int J Med Pharm*. 2013;2013(3): 67–78.
 19. Kuo CC, Chen HH, Chiang W. Adlay (薏苡 *yi y* ; “soft-shelled job’s tears”; the seeds of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) is a potential cancer chemopreventive agent toward multistage carcinogenesis processes. *J Tradit Complement Med*. 2012;2(4):267–275
 20. Choi YH, Choi CW, Lee JY, Ahn EK, Oh JS, Hong SS. Phytochemical constituents of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* roots and their tyrosinase inhibitory activity. *J Appl Biol Chem*. 2017;60(1):49–54.
 21. Kim ST, Hwang CW, Kim YK. The Effect of Natural Mate Tea Extract on the Body Weight and Biochemical Biomarker in High Fat Diet-Obese (*ob/ob*) Mice. *Yakhak Hoeji*. 2012;56(1):1–8.
 22. Shin JG, Choi JS, Beik GY. Effect of Mahangbokhap Extract Lipid Profile and Tissue in HFD-induced Obese Mice. *Korean Beauty Society*. 2019;2019:51–59.
 23. Gómez-Galeno JE, Dang Q, Nguyen TH, Boyer SH, Grote MP, Sun Z, Chen M, Craigo WA, van Poelje PD, MacKenna DA, Cable EE, Rolzin PA, Finn PD, Chi B, Linemeyer DL, Hecker SJ, Erion MD. A potent and selective AMPK activator that inhibits de novo lipogenesis. *ACS Med Chem Lett*. 2010;1(9):478–482.
 24. Yan Y, Zhou XE, Xu HE, Melcher K. Structure and physiological regulation of AMPK. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):10.3390/ijms19113534.
 25. Scherer PE. Adipose tissue: From lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 2006;55: 1537–1545.
 26. Kim MY, Shin MR, Seo BI, Noh JS, Roh SS. Young Persimmon Fruit Extract Suppresses Obesity by Modulating Lipid Metabolism in White Adipose Tissue of Obese Mice. *J Med Food*. 2020; 23(3): 273–280.
 27. Shin MR, Shin SH, Roh SS. *Diospyros kaki* and Citrus unshiu Mixture Improves Disorders of Lipid Metabolism in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2020;doi.org/10.1155/2020/8812634.
 28. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Fisher EA, Moore KJ, Fernández-Hernando C. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*. 2010;328(5985):1570–1573.
 29. Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán A. MiR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107: 12228–12232.