

생 마늘과 절인 마늘의 *In Vitro* 항비만 효과

이다빈 · 표영희

성신여자대학교 식품영양학과

In Vitro Anti-Obesity Effects of Raw Garlic and Pickled Garlic

Da-Bin Lee, Young-Hee Pyo

Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University

Received: October 23, 2021
Revised: November 18, 2021
Accepted: December 3, 2021

Correspondence to: Young-Hee Pyo
Department of Food and Nutrition,
Sungshin Women's University, 55
Dobong-ro 76ga-gil, Gangbuk-gu,
Seoul 01133, Korea
Tel: +82-2-920-7588
Fax: +82-2-920-2076
E-mail: rosapyo@sungshin.ac.kr

Copyright © 2021 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: This study aimed to compare the anti-obesity effects of raw and pickled garlic *in vitro* in 3T3-L1 preadipocytes.

Methods: The pickled garlic samples comprised the following: garlic aged in vinegar (VG), garlic aged in soy sauce, and vinegar (1:1, v/v) (PG) and raw garlic (RG) as control. Hexane, butanol, and distilled water were used to prepare the fractions. The pancreatic lipase inhibitory activity was used as a measure of anti-obesity effects of the extracts. The lipid droplet accumulation and triglyceride content in the 3T3-L1 cells were measured using Oil red O staining and triglyceride assay kits, respectively. The adipogenesis related protein expression levels were analyzed using the kits and the western blot method.

Results: The pancreatic lipase inhibitory activity of the garlic extracts (VG, PG, RG) was the highest in the butanol fraction, and the inhibitory effect was the highest in RG, followed by PG and VG. All garlic butanol extracts suppressed triglyceride accumulation in differentiated adipocytes ($P < 0.05$) through the activation of cyclic adenosine monophosphate (AMP), AMP-activated protein kinase, carnitine palmitoyl transferase-1, and the inhibition of fatty acid synthase. Raw garlic extracts significantly inhibited the expression of proteins involved in adipogenesis as compared to pickled garlic.

Conclusions: Raw garlic has the potential to be an effective natural material for reducing obesity compared to pickled garlic with vinegar or soy sauce.

Key Words: Garlic, Obesity, 3T3-L1 cells

서론

비만은 전 세계적으로 꾸준히 증가하는 추세로 세계적인 유행병이라 칭하며 비만 유발률을 줄이기 위한 노력은 계속하고 있다¹⁾. 비만의 치료로는 지방세포의 특이적인 분비 물질의 조절과 지방세포 분화 과정에 관여하는 전사인자들의 활성을 조절하는 것이 중요하다²⁾. 체 내의 지질 합성과 분해에 관여하는 세포 인자에는 지방산합성 효소 (fatty acid synthase, FAS), 카르니틴 팔미토일 전달 효소 (carnitine palmitoyl transferase-1, CPT-1), 호르몬감수성 지방질 가수분해 효소 (hormone-sensitive lipase, HSL), 그리고

탈공역 단백질(un-coupling protein, UCP) 등이 있다³⁻⁵⁾. 특히 고리형 아데노신인산(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)와 AMP-활성 단백질 인산화효소(AMP-activated protein kinase, AMPK)는 에너지 항상성을 유지하는 중요한 기전으로 알려져 있다⁶⁾. cAMP의 증가는 UCP 유전자와 단백질 인산화효소(protein kinase A) 발현을 증가시키고 HSL의 활성화를 통하여 세포질 내 중성지방을 가수분해하는 일련의 과정을 조절한다³⁾. AMPK 또한 세포 내 에너지 변화를 인식하는 에너지 센서 단백질로 AMPK의 활성화는 지방산합성 효소인 FAS 및 콜레스테롤 생합성 제한효소인 hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A (HMG CoA)

환원효소의 억제를 통해 체 내 지질 생성을 조절하며⁴⁾, 아세틸-CoA 카복실화 효소(acetyl CoA carboxylase)와 CPT-1 활성화를 통해 지방 산화를 조절하는 역할을 한다⁵⁾. 에너지 대사의 항상성이 무너지면 지방의 과도한 축적 현상을 일으켜 비만으로 유도되며, 이는 제2형 당뇨병, 심혈관질환, 암, 그리고 관절염과 같은 신체장애의 원인으로 작용한다⁷⁾.

마늘(*Allium sativum*)은 중앙아시아가 원산지인 백합과 중 가장 매운 맛의 식물이며 우리나라를 비롯하여 세계 각국의 민간의학에서는 마늘을 질병 치료 및 예방에 다양하게 활용하고 있다. 혈압과 당뇨 개선 작용뿐만 아니라 항암, 항균, 혈중 콜레스테롤 저하 작용 등이 밝혀진 바 있으며⁸⁾, 특히 비만 관련 연구도 다양하게 진행되고 있다. Bordia 등⁹⁾은 마늘은 관상 동맥 질환을 가진 환자의 총 혈청 콜레스테롤과 중성지방을 감소시키며 high-density lipoprotein-콜레스테롤과 섬유소 용해 활성을 증가시킨다고 보고하였으며, 이 같은 결과는 마늘의 주성분인 알리신이 알리이나나제에 의해 분해되어 생성된 알리신, 이황화 다이알릴(diallyl disulfide, DADS), 삼황화 다이알릴(diallyl trisulfide, DATS) 등에 의한 것으로 보고하였다^{10,11)}. 또한 마늘의 2차 대사산물인 함황 화합물들도 다양한 활성 부위 잔기를 갖고 있어 지방의 대사작용에 관여하는 여러 표적 물질과 리간드 결합을 통해 에너지 항상성을 조절하는 것으로 알려져 왔다¹²⁾. 마늘의 항비만 활성은 주로 생마늘을 통하여 연구되어 왔으며, 이는 3T3-L1 세포를 이용한 지방 축적 억제 효과를 확인한 연구에서 함황 화합물의 영향으로 확인된 바 있다^{13,14)}. 그러나 생마늘은 강한 매운 맛을 가지며 저장수명이 짧다는 한계점을 가진다¹⁵⁾. 따라서 마늘의 매운 맛을 줄이면서 오랜 기간 소비할 수 있는 여러 조리법이 강구되어 왔다^{16,17)}.

절임식품으로 분류되는 장아찌류는 사계절이 뚜렷하고 풍토적, 지역적 다양성을 가지고 있는 우리나라에 적합한 저장식품의 하나로 우리의 전통음식으로 구분된다¹⁸⁾. 장아찌류는 숙성과정 중 알코올 성분이 생성되며 체 내에 유익한 젖산균도 풍부하여 저장기술이 발달한 현대에도 즐겨 먹는 식품 중 하나이다. 특히 마늘장아찌는 제조 방법에 따라 함황 화합물의 종류와 농도가 달라지며 그에 따른 기능성에도 차이가 존재한다¹⁹⁾. 예를 들어 마늘장아찌로 제조 시 항산화 및 항균 활성 등의 기능성 활성 변화가 보고된 바 있으며, 특히 Boonpeng 등²⁰⁾은 마늘장아찌의 숙성과정에서 원료의 폴리페놀 및 플라보노이드가

증가하는 것으로 보고하였다. 이같은 함황 화합물의 변화 및 폴리페놀, 플라보노이드 함량의 증가는 지질 분해와 소화를 지연시켜 3T3-L1 세포에서 지방 축적 억제 능력을 증가시킬 것으로 예상되나 마늘장아찌와 생마늘의 항비만 활성을 비교한 연구는 충분하지 않다. 따라서 본 연구에서는 생마늘과 마늘장아찌류의 부탄올 추출물의 *in vitro* 항비만에 대한 시료별 활성을 비교하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 장아찌 제조

본 실험에 사용한 마늘은 국내에서 생산된 대서종의 마늘로 간장(Sampyo, Seoul, Korea), 식초(Ottogi, Anyang, Korea), 백설탕(Samyang, Seoul, Korea), 소금(Haepyo, Seoul, Korea)과 함께 서울에 위치한 대형마트에서 2020년 5월에 일괄 구매하여 실험 재료로 사용하였다. 마늘장아찌의 제조법은 한국의 일반 가정에서 가장 많이 활용하는 간장과 식초를 주 재료로 하여 제조하였다. 마늘을 물로 깨끗이 씻은 후 물기를 제거한 다음 간장과 식초(1:1, v/v), 소금, 설탕을 첨가하여 30일간 숙성시킨 마늘(pickled garlic, PG)과 소금, 설탕에 식초만을 첨가하여 30일간 숙성시킨 마늘(vinegar pickled garlic, VG)을 마늘장아찌의 시료로 사용하였고, 대조군은 가공하지 않은 생마늘(raw garlic, RG)로 하였다(Fig. 1).

2. 용매 분획물의 제조

마늘 추출물 제조는 마늘을 80% 메탄올과 함께 1:10

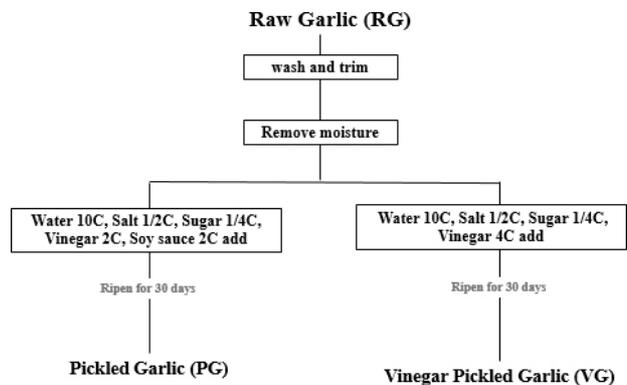


Fig. 1. Manufacturing process of pickled garlic and vinegar pickled garlic.

(w/v) 비율로 혼합, 파쇄 과정을 거친 후 초음파 추출기를 이용해 상온에서 3시간 추출하였다. 그 후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 회전식 감압 농축기 (CCA-1110; Eylea, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축시켰으며 헥산과 부탄올, 증류수(distilled water)를 순차적으로 이용해 앞의 과정을 반복하여 추출하였다(Appendix 1). 효소 실험의 경우 동일 용량의 인산칼륨 완충액(pH 6.8; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 용해하였으며, 세포실험의 경우 동일 용량의 다이메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO; Sigma-Aldrich Co.)에 용해하여 시료로 사용하였다.

3. 췌장 리파아제 저해작용

췌장 리파아제(pancreatic lipase, PL) 저해 활성은 Noh와 Pyo²¹⁾의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 마늘 추출물의 회석액 100 µL와 0.1 g/mL PL (Sigma-Aldrich Co.) 효소 용액 100 µL, 200 mM 인산나트륨 완충액(pH 6.8; Sigma-Aldrich Co.) 100 µL를 혼합하여 37°C에서 15분간 예비 반응을 시킨 후 200 mM 인산나트륨 완충액(pH 6.8)에 녹인 5 mM p-nitrophenollaurate (Sigma-Aldrich Co.) 50 µL를 가하여 30분간 반응시켰다. 반응 종결은 100 mM 탄산나트륨 750 µL를 가해 진행하였고, 420 nm에서 흡광도 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 측정하였다. 모든 효소 저해 활성의 음성 대조군은 시료 대신에 완충액을 사용하였으며, 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{Lipase 저해율(\%)} = 1 - \frac{\text{시료 첨가군 OD}}{\text{시료 무첨가군 OD}} \times 100$$

4. 3T3-L1 세포배양 및 분화유도

실험에 사용한 3T3-L1 지방전구세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포 배양 및 분화에 사용된 배지는 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; Welgene, Daegu, Korea)에 1% penicillin/streptomycin (P/S; Welgene)과 10% donor bovine serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 첨가하였으며, 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양 후 0.25% trypsin-EDTA (Welgene)를 이용해 세포를 떼어낸 후 원심분리하여 계대 배양하였다. 분화유도는 플레이트에 3T3-L1

지방전구세포를 분주하고 100% confluence가 되면 2일을 더 배양한 후 분화유도를 위해 DMEM에 10% fetal bovine serum (FBS; Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany), 1% P/S, 1 µM dexamethasone, 10 µg/mL insulin, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (MDI)를 첨가하여 배양하였다. 분화유도 3일째에는 10 µg/mL 인슐린이 첨가된 배지된 10% FBS-DMEM 배지로 2일간 배양하였고, 5일째부터는 10% FBS-DMEM 배지로만 이틀에 한 번씩 교체하며 9일까지 배양하였다. 시료는 분화유도가 시작되는 시점과 동시에 처리하였다.

5. 세포독성 측정(cell viability assay)

마늘 추출액의 세포증식과 독성은 Kumar 등²²⁾의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 3T3-L1 지방전구세포 (1×10⁴ cell/96 well)를 분주하고 100% confluence가 될 때까지 배양시킨 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands) 용액을 사용하여 측정하였다. 마늘 추출액은 1~500 µg/mL의 농도로 24, 48, 72시간 처리하였으며, 배지를 제거하고 MTT 용액을 첨가하여 37°C, 30분 동안 배양하였다. DMSO를 200 µL씩 첨가하여 포마잔 결정을 용해시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 지방전구세포 분화 억제 활성(Oil red O staining)

마늘 추출물 농도에 따른 지방구 형성에 대한 영향은 Oil red O 염색을 통해 확인하였다²³⁾. 3T3-L1 지방전구세포(8×10⁴ cell/6 well)를 분주하고 분화 9일째에 배양액을 제거하였다. 1 mL 1 x 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS; pH 7.4; Welgene)로 2회 반복 세척한 후 4% 파라-포름알데하이드(Sigma-Aldrich Co.)로 처리하여 암소에서 30분간 고정하였다. 염색된 지방구는 세척하여 현미경으로 관찰한 후 아이소프로판올로 염색된 지방구를 추출하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Triglycerides (TG) 함량의 측정

세포 내 TG 함량은 triglyceride assay kit (Bio Max, Seoul, Korea)를 이용해 측정하였으며 제조사의 제공된 방법에 따라 실험을 수행하였다. 즉 분화가 완료된 세포를 5% NP-40으로 균질화시켜 100°C에서 가열 및 실온에서 냉각하는 작업을 2회 반복 실행하였고, 원심분리를 이용해 상층액을

시료로 사용하였다. 플레이트에 시료와 2 μ L 리파아제를 분주하여 20분간 방치하였고, TG reaction mix를 50 μ L씩 분주한 후 암소에서 30분간 반응시켰다. 흡광도는 570 nm 파장에서 측정하였다.

8. 세포 내 cAMP level 측정

세포 내 cAMP의 농도는 cAMP ELISA kit (Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, USA)를 이용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 실험을 수행하였다. 분화가 완료된 세포에 용해 완충액 600 μ L를 분주하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후 세포를 균질화시켜 원심 분리한 상층액을 시료로 사용하였다. Goat anti-Rabbit antibody coated plate에 시료 50 μ L와 peroxidase cAMP tracer conjugate 25 μ L, Rabbit anti-cAMP polyclonal antibody 50 μ L를 첨가하여 실온에서 2시간 진탕 배양하고 세척 완충액을 이용해 5회 세척하였다. 100 μ L의 기질 용액을 첨가하여 20분 진탕하며 반응시킨 후 종결 용액 100 μ L를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. Western blot 분석에 의한 단백질 발현 분석

마늘 추출물에 의한 3T3-L1 세포의 단백질 발현 분석은 Mazibuko-Mbeje 등²⁴⁾의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 분화유도물질(MDI)과 마늘 추출물을 처리한 3T3-L1 세포를 PBS 2 mL로 2회 세척한 후 용해 완충액(50 mM tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail)을 이용하여 4°C에서 용해시켰다. 세포 추출물을 13,000 rpm, 15분, 4°C에서 원심 분리하여 상층액을 분리한 후 Bradford assay법으로 단백질을 정량하였다. 동일 양의 단백질(25 μ g)과 β -머캅토에탄올을 포함한 시료 용액을 4:1로 혼합하여 100°C에서 5분간 가열하였다. 단백질 시료는 Bio-Rad mini-gel system를 이용하여 SDS-PAGE 후 polyvinylidene fluoride membrane (0.2 μ m, immun-blot PVDF membrane; Bio-Rad Laboratories)으로 단백질을 전이하였으며, 5% skim milk와 0.1% Tween 20을 함유한 tris-buffered saline (TBS)에 90분 동안 blocking 하였다. 그 후 AMPK, p-AMPK (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), FAS, 그리고 CPT-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1차 항체가 첨가된 완충액에서 4°C, 24시간 반응한 후 TBST (TBS containing 0.1% Tween 20)로 세척하였으며, 2차 anti-Mouse IgG conjugates horse-

radish peroxidase antibody (GeneTex, Irvine, CA, USA)가 첨가된 완충액에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시키고 15분간 3차례에 걸쳐 세척하였다. 목적 단백질은 Western PICO ECL kit (LPS Solution, Daejeon, Korea)를 사용하여 검출하였으며, image J 소프트웨어(U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 분석 정량하였다.

10. 통계 처리

모든 실험 결과는 반복 실험하여 평균 \pm 표준편차(mean \pm standard deviation)로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS (version 25; IBM Co., Armonk, NY, USA)를 사용하였다. 분산분석(analysis of variance)과 다중범위검정(Duncan's mul-tiple range test)으로 시료 간의 유의성을 5% 수준에서 실시하였다.

결과

1. 세포독성 평가

세 가지 마늘 추출물의 3T3-L1 지방전구세포에 대한 세포독성 여부는 MTT assay를 통해 확인하였다. 세포의 미토콘드리아 내에 존재하는 환원효소는 MTT 시약에 의해 포마잔을 형성하며 비색법에 의해 살아있는 세포를 측정함으로써 세포독성 여부를 측정할 수 있다²⁵⁾. 시료를 첨가하지 않고 세포만 배양한 대조군의 생존율을 100%로 기준했을 때 마늘 추출물의 모든 시료에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 시료의 농도는 1~100 μ g/mL로 나타났으며, 500 μ g/mL 이상의 농도에서는 대조군 대비 유의미하게 생존율이 감소하였다($P < 0.05$, Fig. 2). 따라서 지방전구세포의 성장에 영향을 주지 않고 세포독성을 나타내지 않는 최고 농도인 100 μ g/mL 이하를 마늘 추출물의 처리 농도로 설정하였다.

2. 췌장 리파아제 저해 활성에 대한 영향

마늘장아찌류의 VG와 PG, 그리고 생마늘(RG)의 항비만 활성에 대한 최적 추출물을 평가하기 위해 용매별 분획물을 시도하였으며 각 추출물의 췌장 리파아제(PL)에 대한 저해 활성은 Table 1과 같다. PL에 대한 저해작용은 half maximal inhibitory concentration (IC₅₀)으로 나타내었으며 부탄올 추출물의 저해 활성이 가장 뚜렷한 것으로

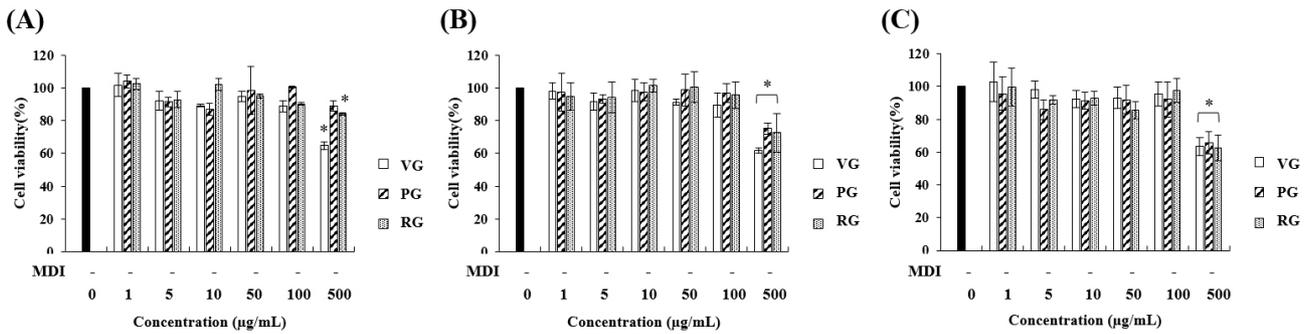


Fig. 2. Effect of garlic extracts on the cell viability of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 preadipocytes were treated with various concentrations (0~500 µg/mL) of garlic extracts. (A) Cell viability of 3T3-L1 preadipocytes after 24 h. (B) Cell viability of 3T3-L1 preadipocytes after 48 h. (C) Cell viability of 3T3-L1 preadipocytes after 72 h. VG: vinegar pickled garlic, PG: pickled garlic, RG: raw garlic, MDI: 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin, 1 µM dexamethasone, 10 µg/mL insulin. All values are means of determinations obtained in three independent experiments. Values are mean±standard deviation. *Significantly different at P<0.05 compared with 0 µg/mL by the t-test, for each time point.

Table 1. IC₅₀ Value of Pancreatic Lipase Inhibitory Activity of Garlic Extract

Variables	Pancreatic lipase inhibition activity	
	Fraction	IC ₅₀ (mg/mL)
VG	n-Hexane	2.13±0.04 ^b
	Butanol	0.74±0.05 ^b
	Water	18.67±0.29 ^e
PG	n-Hexane	1.73±0.05 ^b
	Butanol	0.58±0.02 ^b
	Water	15.90±1.22 ^d
RG	n-Hexane	1.40±0.02 ^b
	Butanol	0.52±0.02 ^b
	Water	13.64±0.18 ^c
<i>Orlistat</i>		0.02±0.01 ^a

IC₅₀: The concentration of the sample required for 50% inhibition, VG: vinegar pickled garlic, PG: pickled garlic, RG: raw garlic. All values are means measured in three independent experiments. Values are mean±standard deviation.

Means with different superscripts in the columns (a~e) are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

나타났다. 이 같은 결과는 마늘(*Allium ampeloprasum L.*)의 핵산, 70% 에탄올, 그리고 부탄올 추출물 중 부탄올 추출물에서 가장 우수한 지방세포분화 억제 능력을 보였다는 Lee 등²⁶⁾의 결과와도 일치한다. 따라서 각 시료(VG, PG, RG)의 부탄올 추출물(이하 마늘 추출물)은 이하의 실험 시료로 사용하였다. 마늘 추출물의 PL 저해 활성은 RG에서 0.52±0.02 mg/mL으로 가장 낮게 나타나 PG (0.58±0.02 mg/mL)와 VG (0.74±0.05 mg/mL)보다 각각 10.3%와 29.7%로 PL 저해 활성이 높은 것으로 비교되었으나 통계적 유의성은 없었다(P>0.05).

3. 지방전구세포의 지방 축적 저해작용에 대한 영향

3T3-L1 지방전구세포의 지방구 형성에 미치는 영향을 확인하기 위해 독성이 나타나지 않는 농도인 5~100 µg/mL의 농도로 마늘 추출물을 처리하였다. 지방구 형성에 미치는 영향을 확인하기 위해 Oil red O 염색한 후 지방구 생성 여부를 관찰한 결과는 Fig. 3A와 같다. 마늘 추출물을 처리한 모든 시료에서 대조군보다 낮은 지방구 형성을 확인할 수 있었으며, 농도 의존적으로 효과적인 지방구 형성에 대한 억제 능력을 나타내었다. 염색된 세포를 아이소프로판올로 용출시켜 세포 내 지방 축적 정도를 측정 한 결과는 Fig. 3B와 같다. 대조군의 지방 축적 정도를 100%로 하였을 때 마늘 추출물 시료의 투여량이 증가할 수록 지방 축적은 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다(P<0.05). 최고 처리 농도(100 µg/mL)를 기준으로 RG의 경우 49.76±2.48%로 지방 축적률이 가장 낮았으며, 다음으로는 PG (51.82±1.46%), VG (59.64±5.06%)의 순으로 지방 축적률이 낮게 측정되었다. 따라서 생마늘 추출물이 세 가지 시료 중 가장 낮은 지방 축적률을 나타냈다(P<0.05). 또한 마늘 추출물의 3T3-L1 세포의 분화 중 중성지방(TG) 축적 정도를 확인하기 위하여 세포 내 TG 함량을 측정하였다(Fig. 3C). Fig. 3C와 같이 대조군(2.66±0.19 mM)에 비해 농도 의존적으로 TG 함량이 감소하는 것으로 나타났다(P<0.05). 지방 축적 억제 능력이 가장 우수한 최고 농도 (100 µL)에서 VG (1.54±0.11 mM)와 PG (1.29±0.08 mM), RG (1.21±0.09 mM)의 순으로 TG 함량이 증가되어 생마늘 추출물의 지방 축적 억제능이 가장 높은 것으로 비교되었다.

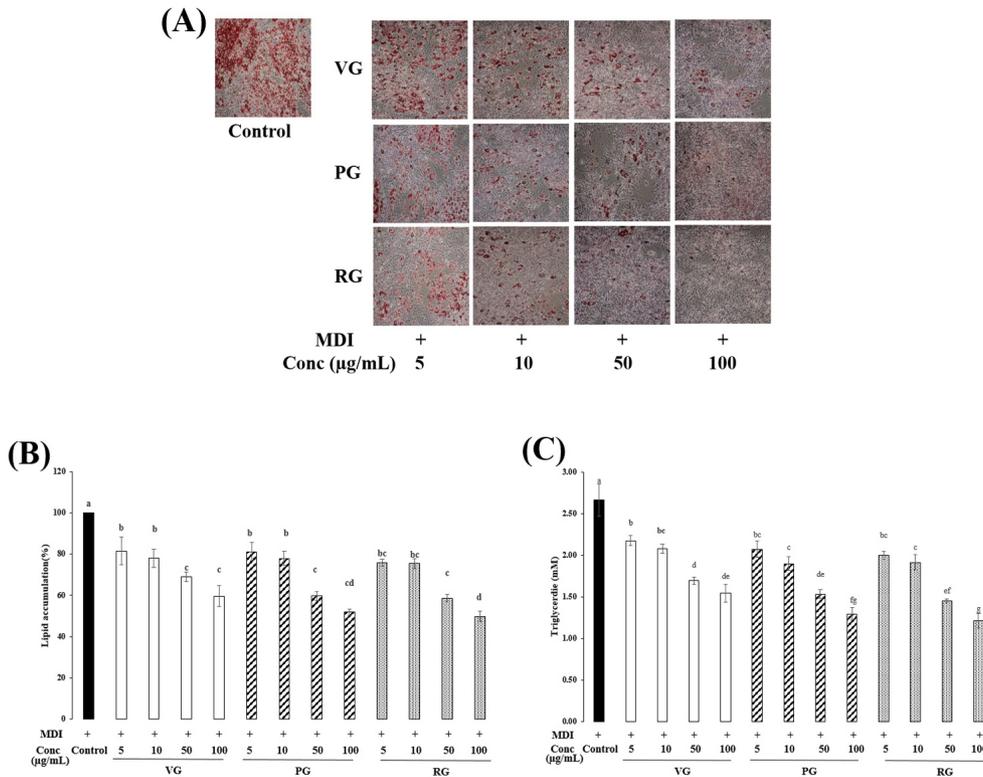


Fig. 3. Inhibitory effects of garlic extract on lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 preadipocytes using Oil red O staining. 3T3-L1 preadipocytes were treated with various concentrations (5-100 µg/mL) of garlic extracts. (A) Intercellular lipid droplets were stained with Oil red O and observed at 20× magnification. (B) Quantification of lipid accumulation by eluting with isopropanol. (C) Intracellular triglyceride contents. VG: vinegar pickled garlic, PG: pickled garlic, RG: raw garlic, Conc: concentration, MDI: 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, 10 µg/mL insulin. All values are means measured in three independent experiments. Values are mean±standard deviation. Means with the same letter superscripts in the bars do not differ significantly at the 5% level.

4. cAMP 활성에 대한 영향

3T3-L1 지방세포의 분화 과정에서 마늘 추출물(100 µg/mL)의 처리가 cAMP 활성에 미치는 영향은 Fig. 4와 같다. 마늘 추출물이 처리된 모든 세포는 대조군에 비해 분화 과정 중 cAMP 활성이 증가한 것으로 나타났다(P<0.05). 가장 높은 cAMP는 RG (41.13±2.74 pmol/mL)에서 확인되었으며, 이는 대조군(23.04±3.24 pmol/mL)보다 78.5% 높은 수치로 비교된다. PG (40.61±1.99 pmol/mL)의 경우 RG에 비하여 약간 낮은 cAMP 활성을 보였으나 통계적으로 유의미한 감소는 아니며(P>0.05), VG (33.14±4.30 pmol/mL)의 경우 RG에 비해 19.4% 낮은 수준으로 나타났다(P<0.05).

5. AMPK, FAS, CPT-1 활성에 대한 영향

3T3-L1 세포의 분화 과정에서 AMPK 활성에 미치는 마늘 추출물의 영향은 Fig. 5와 같다. 대조군과 비교할 때 PG와 RG의 처리는 AMPK를 활성화시켰다(P<0.05). 가장

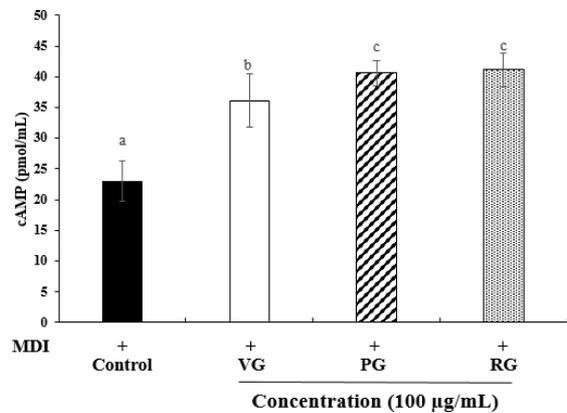


Fig. 4. Effect of garlic extracts on cAMP content of 3T3-L1 preadipocytes. The highest concentration (100 µg/mL) of garlic extracts that did not cause cytotoxicity to 3T3-L1 preadipocytes were evaluated. VG: vinegar pickled garlic, PG: pickled garlic, RG: raw garlic, cAMP: cyclic adenosine monophosphate, MDI: 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, 10 µg/mL insulin. All values are means measured in three independent experiments. Values are mean±standard deviation. Means with the same letter superscripts in the bars do not differ significantly at the 5% level.

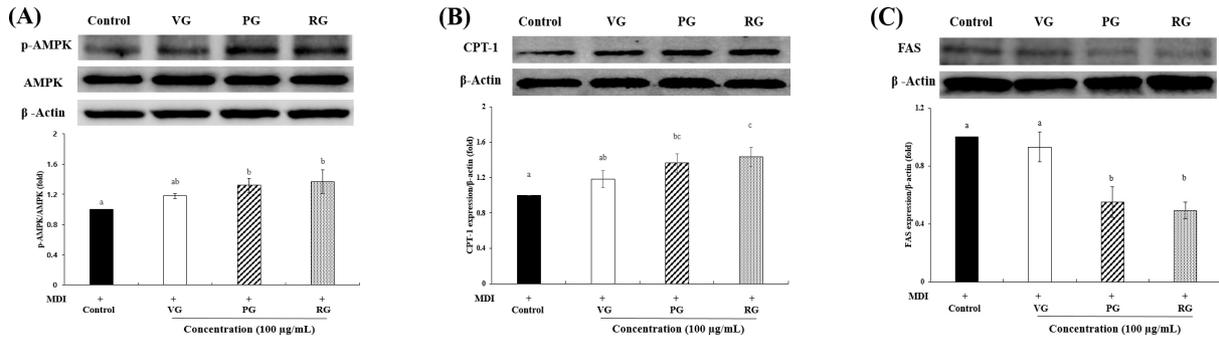


Fig. 5. Effect of garlic extracts on the protein expression of 3T3-L1 preadipocytes. The highest concentration (100 µg/mL) of garlic extracts that did not cause cytotoxicity to 3T3-L1 preadipocytes were evaluated. (A) VG, PG, RG-mediated activation of AMPK in 3T3-L1 cells. (B) Effect of VG, PG, RG on CPT-1 protein expression in 3T3-L1 cells. (C) Effect of VG, PG, RG on FAS expression in 3T3-L1 cells. VG: vinegar pickled garlic, PG: pickled garlic, RG: raw garlic, AMPK: adenosine monophosphate-activated protein kinase, CPT-1: carnitine palmitoyl transferase-1, FAS: fatty acid synthase, MDI: 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, 10 µg/mL insulin. All values are means measured in three independent experiments. Values are mean±standard deviation. Means with the same letter superscripts in the bars do not differ significantly at the 5% level.

높은 p-AMPK 발현은 RG에서 나타났으며, PG와 VG의 순으로 활성이 감소하였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다($P>0.05$). 이 같은 마늘 추출물의 AMPK 활성에 대한 영향은 농도 의존적으로 CPT-1의 활성 증가와 FAS의 활성 저해작용의 결과와도 유사하게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 마늘이 비만 쥐의 AMPK를 활성화시켜 지방산합성 효소 및 전사 인자로 작용하여 지방세포 생성에 관여하는 생체지표의 발현을 차단했다는 Lee 등²⁷⁾의 보고와도 일치한다.

고찰

마늘의 부탄올 추출물(VG, PG, RG)에 대한 *in vitro* 항비만 활성을 예측하기 위해 먼저 PL에 대한 저해 활성을 평가하였다. PL은 TG의 물질대사에 관여하는 효소로 전체 식이 지방의 50~70%를 가수분해하는 역할을 하며 장내 상피세포에서 분해 산물의 흡수를 돕는다²⁸⁾. PL 저해 작용은 천연물의 항비만제 평가 실험에서 가장 널리 연구된 기전 중 하나이며, 비만 치료를 위해 사용하는 약물인 *Orlistat*가 PL 저해 활성을 이용하는 대표적인 약물이다. 그러나 *Orlistat*는 위장 장애와 지용성 비타민 흡수 억제 등의 문제가 보고되어²⁹⁾ 천연물로서의 PL 저해제의 탐색이 다각도로 시도되어 왔다²⁸⁾. 마늘 추출물의 PL 저해 활성은 RG가 PG와 VG보다 각각 10.3%와 29.7% 높은 것으로 비교되었다. 이 같은 결과는 마늘의 페놀산과 함황 화합물의 함량에 기인하는 것으로 알려졌다³⁰⁾. 특히 마늘에

서 발견되는 살리실산은 PL 저해제로 알려졌다³¹⁾ 마늘의 함황 화합물인 알리인, 알리신, 아조엔 등도 고지혈증에 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다^{10,11)}. 생마늘은 가공을 거치며 함황 화합물의 구성과 농도가 달라지며 PL에 대한 친화력도 변화한다. 특히 함황 화합물의 변화는 PL과의 친화력을 가장 많이 감소시키는 것으로 보고되었다¹²⁾. 따라서 절임 마늘 추출물이 생마늘보다 PL 저해 효과가 낮게 나타난 것은 함황 화합물의 감소에 따른 결과로 추정할 수 있다.

이 같은 결과는 3T3-L1 지방전구세포의 지방 축적 억제 능력을 비교한 평가와도 일치한다. 특히 RG에 비해 PG와 VG의 지방 축적 억제 능력의 상대적 저하는 생마늘에 존재하는 화학물질의 변화나 손실에 기인한 것으로 판단된다³²⁾. 마늘 유래 함황 화합물의 대부분은 생리활성을 갖고 있을 뿐 아니라 다양한 잔기와 분자 상호 간의 작용에 의해 시너지 효과를 발휘할 수 있다¹²⁾. 결과적으로 함황 화합물의 총 농도의 감소는 이들 상호 간의 활성 작용을 제한하여 절임 마늘류의 항비만 활성의 저하에 잠재적 영향을 미친 것으로 이해할 수 있다. 지방구는 지방전구세포에서부터 지방세포로의 분화 과정에서 나타나며, 지방생성 전사 인자는 물론 AMPK 등 다양한 조절 인자에 의해 분화가 조절된다²⁾.

마늘 추출물(VG, PG, RG)의 3T3-L1 세포에 대한 지방 축적 억제 효과가 비만 관련 조절인자들의 발현 변화와 관련성이 있는지의 여부를 조사한 결과 에너지 항상성을 유지하는데 핵심적인 역할을 하는 cAMP와 p-AMPK의

발현이 마늘 추출물의 처리로 모두 증가하였다. 활성화형인 p-AMPK는 지방 합성에 직접 관여하는 FAS의 활성을 저해할 뿐 아니라 지방에서 생성되는 malonyl-CoA에 의해 억제되는 CPT-1을 활성화시켜 지방산의 베타산화를 촉진한다⁴⁵. 가장 높은 cAMP와 p-AMPK 발현은 RG에서 확인되었으며 PG와 VG 순으로 감소하였다. 이 같은 마늘 추출물의 항비만 활성의 차이는 화학적 성질에 따른 결과로 판단된다. 마늘의 화학적 성질은 독특한 향미를 내는 많은 함황 화합물과 비황 화합물의 다양한 성분들에 의해 발생한다. 특히 마늘의 주 성분인 알리인은 알리이나아제에 의해 분해되어 알리신 등 티오설피네이트 분해 산물로 변화되는데 이때 알리이나아제는 pH에 의존적인 것으로 알려졌다. Amagase³³)에 따르면 알리이나아제는 pH 3.6 이하의 산성 조건에서 비가역적으로 활성을 잃어 티오설피네이트 형성이 불가능하며 피리독살인산 등 알리이나아제 활성에 보조로 작용하는 여러 인자들도 pH에 영향을 받는 것으로 보고되었다. 또한 항비만 활성물질로 알려진 DADS, DATS, 그리고 diallyl sulfide의 경우 약 알칼리 조건(pH 9.0)에서 오히려 함량이 증가하는 것으로 보고되었다³⁴). 따라서 pH에 아무런 영향을 받지 않은 RG에 비해 VG와 PG의 경우 초기 담금액의 pH가 각각 2.53±0.02과 4.07±0.01로 측정되어 숙성기간 동안 원료에 함유된 여러 활성 성분에 기질의 pH가 영향을 미친 것을 알 수 있다. 이는 간장에 담근 마늘장아찌의 경우 숙성 중 알리이나아제의 잔존 활성은 생마늘보다 낮지만 식초에 담근 마늘장아찌보다 높았다는 Chae³⁵)의 결과와도 일치한다.

간장과 식초 등의 부재료를 마늘과 같이 항비만 활성이 밝혀진 식품 소재들과 숙성시킬 경우 첨가물 간의 상승작용으로 인한^{36,37}) 항비만 활성이 증가할 것으로 기대하나, 오히려 원재료에 비해 감소하는 것으로 보고되었다. 즉 항비만 효능이 알려진 몇 가지 천연 색소 추출물을 마늘과 혼합할 때, 일부 천연 색소 추출물과 혼합한 마늘 시료는 생마늘과 비교하여 혈중의 총 지질, 총 콜레스테롤, 그리고 low-density lipoprotein-콜레스테롤은 감소하지 않았다는 Hwang 등³⁸)의 결과와도 유사하다. 따라서 마늘 시료의 각기 다른 항비만 활성은 pH의 영향과 함께 담금액으로 사용된 첨가물 간의 상호작용에 의해 알리인의 분해 산물인 함황 화합물의 변화에 따른 결과로 평가할 수 있다. 즉 마늘의 주성분으로 알려진 알리신은 고혈압으로 유도된 쥐의 cAMP 수준을 증가시키며³⁹) 알리신이 분해

되어 생성된 DADS와 DATS 등의 함황 화합물도 cAMP 수준을 증가시킨다^{11,40}). 또한 DADS, S-allyl-cysteine, 그리고 아조엔 등은 AMPK 활성화를 통하여 FAS와 CPT-1의 발현을 조절한다는 보고와도^{41,42}) 유사한 결과로 나타났다. 따라서 본 실험의 마늘 추출물이 3T3-L1 지방세포의 형성을 억제한 결과는 Fig. 6과 같은 기전으로 예측할 수 있다. 즉 생마늘과 절임 마늘 추출물의 AMPK에 대한 활성화는 농도 의존적으로 FAS와 CPT-1의 발현을 조절하여 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 효과적으로 억제하였으며, 생마늘 추출물이 절임 마늘 추출물에 비해 *in vitro* 항비만 활성에 대한 작용이 보다 뚜렷한 것으로 비교되었다.

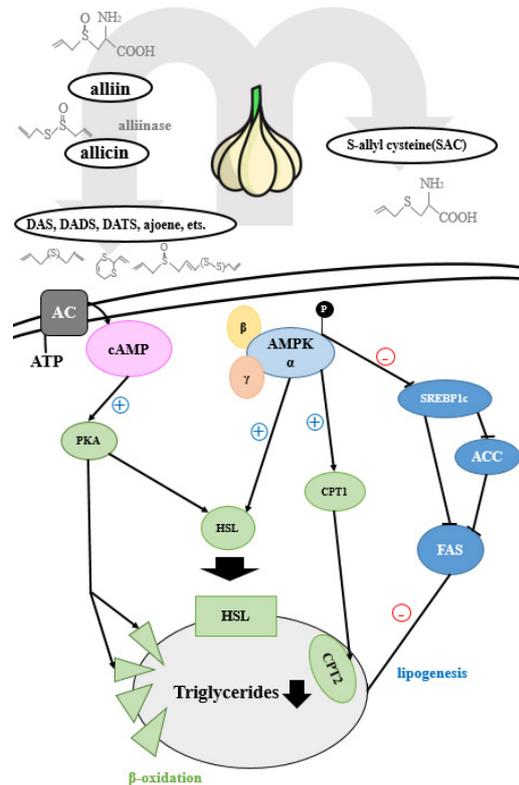


Fig. 6. Predictable mechanism of anti-obesity action of garlic extracts in 3T3-L1 preadipocytes. AMPK is a nutrient sensor, which is activated in response to low ATP levels, and an increased ADP:AMP ratio. AC produces cAMP from ATP. High levels of cytosolic cAMP lead to the activation of PKA. The expression of activated AMPK and cAMP activates and deactivates various factors. (+) Represents the path activated by AMPK and cAMP, and (-) represents the deactivated path. AMP: adenosine monophosphate, ADP: adenosine diphosphate, ATP: adenosine triphosphate, AMPK: AMP-activated protein kinase, cAMP: cyclic AMP, AC: adenylate cyclase, PKA: protein kinase A, HSL: hormone-sensitive lipase, CPT: carnitine palmitoyl transferase, SREBP: sterol regulatory element-binding transcription factor, ACC: acetyl CoA carboxylase, FAS: fatty acid synthase, DAS: diallyl sulfide, DADS: diallyl disulfide, DATS: diallyl trisulfide.

결론

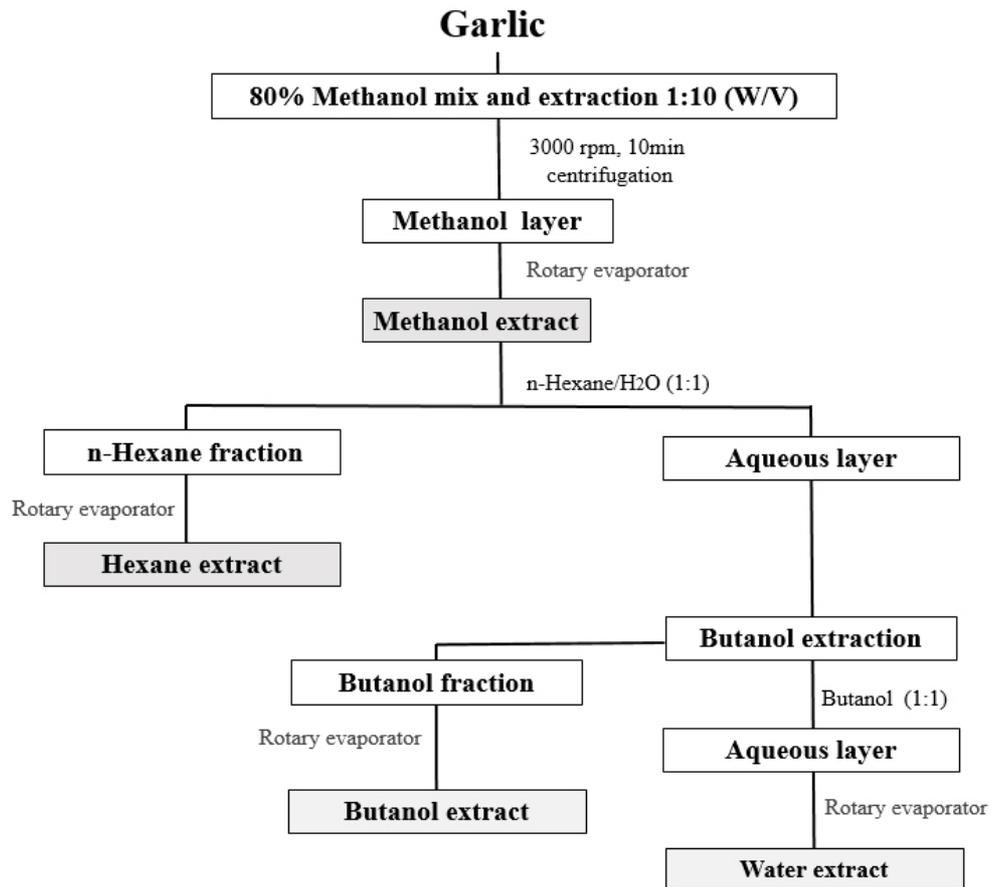
식초(VG)와 간장(PG)을 첨가하여 제조한 마늘장아찌와 생마늘(RG)의 지방 가수분해 효소인 췌장 리파아제(PL)에 대한 저해 활성 및 3T3-L1 세포를 통한 지방 축적 억제 등의 항비만 활성을 비교 평가한 결과는 다음과 같다.

마늘 추출물(VG, PG, RG)의 PL에 대한 저해 활성은 부탄올 추출물에서 가장 높았으며, 모든 마늘 부탄올 추출물에서 PL 저해제로서의 가능성을 확인하였다. 3T3-L1 세포에 대한 마늘 추출물의 시료는 대조군에 비해 모두 효과적인 중성지방 억제 효과가 나타났으며 생마늘 시료인 RG에서 그 효과가 가장 높았다. 또한 이들 시료의 3T3-L1 지방전구세포의 지방 축적 억제 효과는 cAMP, AMPK, 그리고 CPT-1의 활성화 및 FAS의 저해 활성을 통해 확인되었으며 생마늘이 절인 마늘의 시료보다 그 효과가 뚜렷한 것으로 평가되었다.

References

- Dixon JB. The effect of obesity on health outcomes. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 ; 316(2) : 104-8.
- Park J, Park C, Han MH, Kim BW, Chung YH, Choi YH. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by aged black garlic extracts in 3T3-L1 preadipocytes. *J Life Sci.* 2011 ; 21(5) : 720-8.
- Ahn IS, Park KY, Do MS. Weight control mechanisms and antiobesity functional agents. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2007 ; 36(4) : 503-13.
- Jo HK, Han MH, Hong SH, Choi YH, Park C. Ethanol extracts of citrus peel inhibits adipogenesis through AMPK signaling pathway in 3T3-L1 preadipoc. *J Life Sci.* 2015 ; 25(3) : 285-92.
- Kim MK, Kim SH, Yu HS, Park HG, Kang UG, Ahn YM, et al. The effect of clozapine on the AMPK-ACC-CPT1 pathway in the rat frontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2012 ; 15(7) : 907-17.
- Park MJ. Recent advances in regulating energy homeostasis and obesity. *Korean J Pediatr.* 2005 ; 48(2) : 126-37.
- Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a disease. *Med Clin.* 2018 ; 102(1) : 13-33.
- Jo JG. Garlic and health. *J Food Process Preserv.* 2008 ; 7(1) : 2-8.
- Bordia A, Verma SK, Srivastava KC. Effect of garlic (*Allium sativum*) on blood lipids, blood sugar, fibrinogen and fibrinolytic activity in patients with coronary artery disease. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids.* 1998 ; 58(4) : 257-63.
- Gargouri Y, Moreau H, Jain M, Haas G, Verger R. Ajoene prevents fat digestion by human gastric lipase *in Vitro*. *Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab.* 1989 ; 1006(1) : 137-9.
- Bayan L, Koulivand PH, Gorji A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna J Phytomed.* 2014 ; 4(1) : 1.
- Nickavar B. Effect of organosulfur compounds from different garlic preparations on hyperlipidemia: an in-silico approach. *Biointerface Res Appl Chem.* 2022 ; 12(3) : 4048-61.
- Chang WT, Wu CH, Hsu CL. Diallyl trisulphide inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through lipogenesis, fatty acid transport, and fatty acid oxidation pathways. *J Funct Foods.* 2015 ; 16 : 414-22.
- Yang JY, DellaFera MA, NelsonDooley C, Baile CA. Molecular mechanisms of apoptosis induced by ajoene in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity.* 2006 ; 14(3) : 388-97.
- Kim JY, Choi IL, Han SJ, Yoon HS, Park WG, Kang HM. Effects of the different storage temperatures and oxygen transmission rate of package on the qualities in Jangachi (Korean pickle) of *Allium victorialis* L during MA storage. *Korean J Horticult Sci.* 2017 ; 35(1) : 98-9.
- Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Sung NJ. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2008 ; 37(8) : 965-71.
- Lee JJ, Lee HJ. Physicochemical composition of baked garlic. *Korean J Food Preserv.* 2011 ; 18(4) : 575-83.
- Lee SY, Park WJ, Kim HJ. Quality, safety and sensory characteristics of plum jangachi produced using automatic plum sarcocarp separato. *J Acad-ind Technol Cooperation Soc.* 2021 ; 22(2) : 368-77.
- Jung HA. Change of flavor compounds of pickled garlic with different pickling treatments. *J East Asian Soc Diet Life.* 2006 ; 16(3) : 299-307.

20. Boonpeng S, Siripongvutikorn S, Saewong C, Sutthirak P. The antioxidant and anti-cadmium toxicity properties of garlic extracts. *Food Sci Nutr*. 2014 ; 2(6) : 792-801.
21. Noh YH, Pyo YH. The *in vitro* anti-diabetic and anti-obesity effect of monascus-fermented grain vinegar. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2021 ; 50(8) : 783-91.
22. Kumar BD, Krishnakumar K, Jaganathan SK, Mandal M. Effect of mangiferin and mahanimbine on glucose utilization in 3T3-L1 cells. *Pharmacogn Mag*. 2013 ; 9(33) : 72.
23. Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil Red O. *Histochem*. 1992 ; 97(6) : 493-7.
24. Mazibuko-Mbeje SE, Ziqubu K, Dlodla PV, Tiano L, Silvestri S, Orlando P, et al. Isoorientin ameliorates lipid accumulation by regulating fat browning in palmitate-exposed 3T3-L1 adipocytes. *Metab Open*. 2020 ; 6 : 100037.
25. Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colormetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods*. 1984 ; 70(2) : 257-68.
26. Lee SG, Hahn D, Kim SR, Lee WY, Nam JO. Elephant garlic extracts inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Microbiol Biotechnol Lett*. 2020 ; 48(3) : 383-8.
27. Lee MS, Kim IH, Kim CT, Kim Y. Reduction of body weight by dietary garlic is associated with an increase in uncoupling protein mRNA expression and activation of AMP-activated protein kinase in diet-induced obese mice. *J Nutr*. 2011 ; 141(11) : 1947-53.
28. Birari RB, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*. 2007 ; 12(19-20) : 879-89.
29. Kim YJ, Kim BH, Lee SY, Kim MS, Park CS, Rhee MS, et al. Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with anti-obesity. *J Appl Biol Chem*. 2006 ; 49(3) : 221-6.
30. Hester F, Verghese M, Sunkara R, Willis S, Walker LT. A comparison of the antioxidative and anti-diabetic potential of thermally treated garlic, turmeric, and ginger. *Food Nutr Sci*. 2019 ; 10(2) : 207-19.
31. Karamac M, Amarowicz R. Inhibition of pancreatic lipase by phenolic acids-examination *in vitro*. *Z Naturforsch*. 1996 ; 51(11-12) : 903-5.
32. Kim MR, Mo EK. Volatile sulfur compounds in pickled garlic. *Korean J Soc Sci*. 1995 ; 11(2) : 33-139.
33. Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr Biochem*. 2006 ; 136(3) : 716-25.
34. Lawson LD, Hughes BG. Characterization of the formation of allicin and other thiosulfonates from garlic. *Planta Med*. 1992 ; 58(04) : 345-50.
35. Chae SK. Studies on the changes in the alliinase activity during the aging of pickled garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 1999 ; 12(1) : 55-62.
36. Samad A, Azlan A, Ismail A. Therapeutic effects of vinegar: a review. *Curr Opin Food Sci*. 2016 ; 8 : 56-61.
37. Zhong B, Mun EG, Wang JX, Cha YS. Chinese traditional fermented soy sauce exerts protective effects against high-fat and high-salt diet-induced hypertension in sprague-dawley rats by improving adipogenesis and renin-angiotensin-aldosterone system activity. *Fermentation*. 2021 ; 7(2) : 52.
38. Hwang CH, Shin JH, Kang JR, Shim HJ, Kang MJ. Effect of garlic enzymatic hydrolysates and natural color resource composites on lipid metabolism in rat fed a high fat diet. *J Life Sci*. 2015 ; 25(6) : 663-72.
39. Cui T, Liu W, Chen S, Yu C, Li Y, Zhang JY. Antihypertensive effects of allicin on spontaneously hypertensive rats via vasorelaxation and hydrogen sulfide mechanisms. *Biomed Pharmacother*. 2020 ; 128 : 110240.
40. Fakhar H, Tayer AH. Effect of the garlic pill in comparison with Plavix on platelet aggregation and bleeding time. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012 ; 2(4) : 146.
41. Hwang YP, Kim HG, Choi JH, Do MT, Chung YC, Jeong TC, et al. S-allyl cysteine attenuates free fatty acid-induced lipogenesis in human HepG2 cells through activation of the AMP-activated protein kinase-dependent pathway. *J Nutr Biochem*. 2013 ; 24(8) : 1469-78.
42. Lai YS, Chen WC, Ho CT, Lu KH, Lin SH, Tseng HC, et al. Garlic essential oil protects against obesity-triggered nonalcoholic fatty liver disease through modulation of lipid metabolism and oxidative stress. *J Agric Food Chem*. 2014 ; 62(25) : 5897-906.



Appendix 1. Preparation of successive fractions from methanol extract of garlic samples.