

# *Fragaria Orientalis* 물 추출물이 고지방식을 급여한 C57BL/6 Mice에서 비만 관련 인자에 미치는 영향

최문열#, 김미형, 김미려\*

대구한의대 한의과대학 본초약리학교실

## Effects of *Fragaria Orientalis* Water Extract on Adipogenesis in Diet-induced Obese C57BL/6 Mice

Moon-Yeol Choi#, Mi Hyung Kim, Mi Ryeo Kim\*

Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea

### ABSTRACT

**Objective** : In this study, the anti-obesity effect of *Fragaria orientalis* (FO) on high-fat diet-induced obese mice was investigated. Drug treatment methods are widely used as obesity treatment methods, but research using various natural products is being conducted due to safety concerns. This study aims to evaluate the anti-obesity effect of FO extract, a natural product derived from Mongolia.

**Methods** : C57BL/6 mice were used and divided into three groups, normal diet group, high-fat diet group, and high-fat diet with FO oral treatment group at a dose of 300 mg/kg. Extract was orally provided everyday for 6 weeks. Body Weight and food intake were measured every 2 days and blood lipid profiles and liver function in the sacrificed mice were evaluated. In addition, protein expression in hepatic tissue and histomorphological changes in liver and adipose tissue were observed.

**Results** : Body weight, adipose tissue weight and FER were significantly lower in a high-fat diet with FO treatment than fed only high-fat diet. There was a significant difference between the high-fat diet and the FO-treated high-fat diet mice. As a result of analyzing lipid metabolism-related genes in hepatic tissue, all of p-AMPK, p-ACC, PPAR- $\alpha$ , CPT-1, and UCP-1 showed significant increases, and PPAR- $\gamma$  also decreased significantly compared to the high-fat diet group.

**Conclusion** : Overall, these results indicate that FO is effectual in improving obesity, suggesting that it can be used as a possible material for anti-obesity agents or functional supplements for weight control.

**Key words** : Anti-obesity, *Fragaria Orientalis*, High fat diet, adipogenesis, lipid

## I. 서 론

비만은 건강 위협요인으로 만성질환 발생의 중요한 원인으로

알려져 있다. 비만은 서구적 식생활, 정제식품 섭취의 증가와 과잉 영양, 부족한 신체활동 등으로 발생하며 개개인 편차가 있는 흡연, 음주와는 별개로 사회경제적 발전과 전통생활 방식

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

· Tel : +82-53-770-2361

· E-mail : kimkoo1114@anu.ac.kr

#First author : Moon-Yeol Choi, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea.

· Tel : +82-53-770-2241

· E-mail : filesx1@naver.com

· Received : 10 June 2024

· Revised : 04 July 2024

· Accepted : 25 July 2024

에서 점차 서구적인 생활방식으로 바뀌는 변화와 함께 발생하는 구조적인 현상이므로 개선이 어렵다. 한국은 선진국과 비교해 비만율이 높지 않지만 최근 10년간 점차적으로 증가하는 추세를 보이고 있다. 한국인 비만율은 2007년의 31.7%에서 10년 동안 1.5% 증가하여 34% 이내로 비슷하게 유지하였으나, 그 후 5년간 5% 가까이 크게 증가하였다. 2022년은 2020년에 비해 조금 감소하여 37.2%이고 남자가 여자보다 높게 나타났다. 2022년 현재 남자는 47.7%, 여자는 25.7%로 남자가 더 높으며, 연령대별로는 40대가 40.7%로 가장 높으며 나이가 들수록 점차 낮아지는 경향을 보인다. 한국은 신장과 체중의 비율을 의미하는 체질량지수가 25 이상일 때 비만으로 규정하지만, 국제적으로는 체질량지수 30을 초과할 때 비만으로 정의한다. 해외 주요 국가들의 비만율은 남자의 경우 2019년을 자료를 보면 남자는 캐나다(26.7%), 영국(27.0%), 프랑스(13.5%) 순으로 나타나며 한국은 6.2%로 서구권 국가들에 비해 매우 낮은 편이다. 여자의 경우 역시 한국의 비만율은 5.5%로 서구 국가들보다 크게 낮다. 그러나 서구식 생활방식이 확산되면 비만율이 높아질 가능성이 커<sup>1)</sup> 안심할 수만은 없는 상황이다.

비만의 원인은 다양하다. 한방에서는 에너지 대사 이상을 비만의 원인으로 보고 있다. 장기 기능의 조화가 상실되어 비습, 즉 지방과 수분이 과잉 축적되기 때문이다. 황제내경에서는 고량진미와 단 음식을 많이 먹는 게 비만의 원인이라고 설명하고 있다. 양방에서는 내분비 호르몬의 순환이상, 에너지 대사의 불균형, 정신 이상 등과 경제적 요인, 고영양 식이, 사회적 요인등의 환경적 요인을 비만의 원인으로 보고 있다<sup>2)</sup>.

비만의 치료법으로는 행동교정, 식이조절, 운동, 약물치료, 수술 등이 사용되고 있으며 한의학적 치료효과에 대해서도 다양한 연구가 이루어지고 있다. 한의학적인 비만 치료법으로는 기존에 사용되고 있는 식이, 운동, 행동교정요법 외에도 한약, 침, 부항 등이 사용되고 있다<sup>3,4)</sup>. 약물치료로 가장 사용된 약물로 양방에서는 비만개선 약물로 단기 사용약품의 phentermine, 펜디메트라진, 디에칠프로피온, 마진들의 식욕억제제가 있으며, 장기사용약품으로는 orlistat (Xenical<sup>®</sup>) 와 로카세린등과 같은 의약품들이 많이 사용되고 있다<sup>5)</sup>. 하지만 이러한 화학약품들은 여러 가지 부작용으로 인해 판매가 중지된 Reductil<sup>®</sup> (sibutramine)처럼 안전성이 큰 문제로 대두되고 있다. 이에 안전성이 입증된 천연물에서 효과적인 비만 치료 소재를 찾아 치료제로 개발하려는 연구가 진행되고 있다<sup>6,7)</sup>.

아스피린, 모르핀 같이 천연물에서 추출된 약물은 널리 사용되고 있으며 그 사용범위가 늘어나고 있다. 수많은 천연물 유래 약물들이 현재 임상적 치료에 사용되는 중이며, 현재 사용되는 의약품의 약 60%가 천연물에서 유래된 것으로 알려져 있다. 천연물은 합성의약품에 비해 상대적으로 독성과 부작용이 적으며 약리학적 측면에서 그 효능이나 안정성은 이미 확보되어 효과적인 천연물 유래 치료제 개발이 유리하다. 속에서 위궤양치료제를 개발했고, 오수유 추출물에서 치매치료에 효과적인 약물 개발, 황금, 황련, 현호색 혼합제에서 고지혈증에 효과적인 약물을 개발한 것이 대표적인 예이다<sup>8)</sup>.

비만 치료가 주목받고 있는 만큼 비만치료제와 관련된 특허 출원 또한 최근 들어 크게 증가되고 있다. 특히, 천연물을 이용한 비만치료제 특허출원이 폭발적 성장세를 이어가고 있는 것으로 나타났다. 천연물 소재별로는 식물추출물에 관한 특허

출원이 92%로 가장 많은 부분을 차지했으며 광물(2%), 동물 및 미생물(6%) 순이며, 단일 천연추출물에 관한 출원이 69%, 2종 이상의 복합추출물에 관한 출원이 31%로 다양한 천연물 소재로부터 비만 치료제에 대한 연구가 진행 중인 것을 알 수 있다<sup>9)</sup>. 또한, 작용기전별 출원 동향은 소화흡수 저해제가 24%로 가장 많이 차지하고 있으며, 지방세포분화 저해제 12%, 호르몬 조절제 10%, 열대사 촉진제 4%, 식욕 억제제 3%, 지방산 생성 억제제 2%, 혈관신생 억제제 2% 등으로 생명공학발전을 통하여 밝혀지고 있는 다양한 비만 발생의 기전을 활용하여 새로운 비만치료제를 개발에 활발한 연구가 진행 중임을 알 수 있다<sup>10)</sup>.

*Fragaria orientalis* Losinsk (FO)는 석류성, 다년생, 장미과 식물로 한국, 몽골, 러시아 동부 및 중국에 널리 분포한다<sup>11)</sup>. 야생딸기로 불리는 FO는 환경에 적응하기 위해 점차 추위와 가뭄에 강하게 진화한 품종이다<sup>12)</sup>. FO는 종 또는 생태학적 특성에 대한 연구는 진행되고 있지만, 약리학적 효능에 대한 연구는 부족한 실정이다. 본 연구진은 이전 세포 실험에서 FO가 항산화효능을 가지며 지질대사 단백질에 변화에 관여함으로써 항비만 효과를 가지는 것을 확인하였다. 이에 본 연구에서는 고지방식으로 유도된 마우스에 FO를 6주간 경구투여하고 혈액과 조직에 대한 지질프로파일과 단백질을 각각 분석하여 항비만 효능을 평가하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료의 제조

본 실험에 사용된 *Fragaria Orientalis*의 물 추출물은 몽골 전통 의학 학술 연구소 및 몽골 국립 의과대학 소속인 연구팀에서 공급받아 사용하였다. FO는 몽골 Uburkhangai aimag에서 7월경 채집되었으며, 채집 후 건조하였다. 전초를 건조하여 적당한 크기로 분쇄하였다. 건조 원량 200 g에 10배수의 DW (distilled water)를 첨가한 뒤, heating mantle (NP33.1, Pils, Ostfildern, Germany)을 사용하여 100℃에서 2시간 가열하였다. 추출액을 여과 후 잔류물을 버리고 진공원심농축기 (RE-301, Equipment Co. Zhengzhou, China)로 농축하였으며, 이후 freeze-dryer (7753027, Labconco, Missouri, USA)를 사용하여 동결 건조한 분말 350g을 얻었다. 건조된 추출물은 분말형태로 사용 전까지 -80℃에서 보관 후 실험에 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 실험 동물

5주령 수컷 C57BL/6 마우스 (19~21.5 g)는 센트럴 랩(서울, 한국)에서 구입했다. 빛(12시간 명암주기), 온도(23±2℃), 상대습도(50 ± 10%) 아래 개별적으로 사육되었다. 모든 마우스는 1주일의 적응 기간 동안 정상 식이를 먹었다. 마우스는 무작위로 ND (정상 식이 + 0.9% 식염수), HFD (고지방 식이 + 0.9% 식염수), HFD+FO (고지방 식이 + FO 300 mg/kg)의 3개 그룹으로 나뉘었다.

2) 비만 흰쥐모델 제작을 위한 고지방식이 및 약물 투여  
 실험 식이의 영양 성분 및 성분은 표 1에 표기하였다. 정상 식이는 AIN-76A(D10001, Research Diets)를 사용했으며 비만 동물 모델은 가까운 수준에 따라 HFD, HFD+FO 그룹에서 6주 동안 고지방 식이(45% kcal% 지방, D12451, Research Diets, USA)로 유도되었다. 식이의 자세한 성분 조성은 Table 1과 같으며, 정상식은 탄수화물 66%, 단백질 20.3%, 지방 5%이고 고지방식은 탄수화물 41%, 단백질 24%, 지방 24%로 구성되어 있다. HFD군에는 FO 물추출물을 300 mg/kg씩 경구 투여했으며, ND군에는 FO와 동일한 부피의 0.9% 식염수를 경구 투여했다. 식이섭취량은 매일 일정한 시간에 측정되었으며, 체중 및 식이효율(FER)은 6주 동안 격일로 기록되었다. 동물 실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회(DHU2022-024)의 승인을 받은 후 수행되었다.

Table 1. The general characteristics of participants

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

\* Cholesterol in lard = 0.95 mg/g, Cholesterol (mg)/4057 kcal = 196.46

<sup>1)</sup>ND; AIN-76A Diet, <sup>2)</sup>HFD; high fat diet(rodent diet with 45% kcal %fat)

3) 장기 무게 측정 및 조직 추출

실험기간 종료 후 12시간 금식 후 마우스를 희생시켰다. 동물은 이소플루란 (JW Pharmaceutical, Korea)을 흡입하여 마취시켰다. 1cc 주사기를 이용하여 하복부 정맥에서 채혈 후 혈청분리기 Gel (BD microtainer, USA)이 있는 마이크로테

이너 튜브 옐로우캡에 옮겨 3000rpm(4℃)에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 실험동물로부터 즉시 장기(간, 신장 및 가자미근) 및 백색지방조직(상피, 근막, 복부 피하지방)을 적출하고 표면수분을 제거한 후 마이크로밸런스 (XB 220A, Precisa, Swiss)를 이용하여 무게를 측정하였다. 일부 장기 및 지방조직은 조직관찰을 위해 10% 포르말린 (Junsei chemical, TK, Japan) 용액에 고정하여 냉장 보관 (4℃)하였고, 나머지 장기조직은 지질분석 전까지 -80℃에서 보관하였다.

4) 혈청 지질 프로파일링 및 간기능 관련 효소 활성측정

실험 종료 후 동물을 12시간 금식시키고 이소플루란(JW Pharmaceutical Co., Korea)을 흡입하여 마취시킨 후 심장에서 혈액을 채혈하였다. 혈액은 원심분리(3,000 rpm, 15분)하여 혈청을 분리하였으며, -80℃에서 보관하면서 혈액 표지자 분석을 위한 샘플로 사용하였다. 혈액에서 분리된 혈청은 자동혈액분석기(IDEX Vet test@8008, USA)를 이용하여 혈청 내 혈당을 분석하였고 중성지방(TG), 총콜레스테롤(TC), HDL-콜레스테롤(HDL-C), AST 및 ALT는 아산키트(Asan kit, Korea)로 측정하였다. LDL-콜레스테롤(LDL-C)과 동맥경화지수(AI, Arterosenic index)는 다음 식으로 계산하였다.

$$LDL = \{(TC)-(HDL-C)\}-(TG \div 5)$$

$$AI = \{(TC)-(HDL-C)\} \div (HDL-C)$$

5) 간, 신장, 부고환 지방의 형태학적인 조직관찰

형태학적 관찰을 위한 동물 희생 후, 간, 신장 및 부고환 지방의 일부인 조직을 10% 포르말데히드 용액에 24시간 동안 고정시켰다. 고정된 조직을 에탄올로 탈수시키고, 파라핀에 포매하였다. 이후, 파라핀이 포매된 조직을 폴리-L-라이신으로 처리하여 5µm 두께의 조직 절편을 제조하였다. 조직 절편을 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하고, 200배 배율로 광학 현미경으로 관찰하였다.

6) 지질 대사 관련 단백질 발현 측정

간의 지질 대사 관련 단백질 발현에 대한 FO의 영향을 조사하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 실험동물로부터 추출한 간 조직 0.1 g을 얼음 위에서 Halt™ Protease 및 Phosphatase 억제제 카테일(Thermo fisher, USA)을 사용하여 Ratio 면역침전 분석 완충액(RIPA 버퍼, Thermo fisher)으로 균질화한 후 4℃에서 13,000rpm으로 30분 동안 원심분리한 후 상층액을 수집하였다. 단백질 정량은 Bradford 단백질 분석법을 사용하여 수행되었으며, ACC, phospho-ACC, AMPK, phospho-AMPK, PPAR-γ(1:1000; 희석, Cell Signaling, USA), CPT-1, UCP1(1:1000; 희석, abcam, USA), PPAR-α(1:1000; 희석, Santa-Cruz Biotechnology, USA), β-actin(1:3000; 희석, Cell Signaling, USA)을 사용하여 분석했다. 각 인자의 발현 수준은 이미지 분석기(Uvitec Cambridge, Alliance, England, U)를 사용하여 분석하였다.

## 7) 통계

실험 결과의 통계는 SPSS statistics (v. 27.0, USA)을 이용, one-way analysis of variance (ANOVA)을 이용하여 분석하였다. Duncan's multiple range test를 사용하여 검증하였다. 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였다.

## III. 결 과

### 1. Effect of FO on body weight gains, food intakes and food efficiency ratio.

6주 동안 고지방 식이와 FO를 섭취한 마우스의 평균 체중 변화, 식이섭취량 및 FER은 표 2과 같다. 최종 체중 및 증가량은 ND군( $23.62 \pm 0.3$  및  $0.10 \pm 0.00$ ), HFD군( $28.48 \pm 0.53$  및  $0.20 \pm 0.01$ ), HFD+FO군( $25.83 \pm 0.5$  및  $0.12 \pm 0.01$ )으로 나타났다. 최종 체중은 ND군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가했으며 HFD+FO군은 HFD군에 비해 유의한 감소를 확인하였다. 또한 최종 체중은 HFD군에 비해 HFD+FO군에서 9.3%로 감소했다. 식이섭취량은 HFD+FO군에서 ND와 HFD군에 비해 유의하게 감소하였고, ND군은 HFD군에 비해 감소하는 경향을 보였다. ND군( $1.32 \pm 0.09$ )과 HFD+FO군( $2.18 \pm 0.13$ )의 FER (식이효율)은 HFD군 ( $2.98 \pm 0.1$ )에 비해 유의하게 감소하였다(Table 2).

Table 2. Effects of FO on body weight, body weight gain, food intake and FER in diet-induced obese mice.

	ND	HFD	FO
Initial BW (g)	$20.21 \pm 0.26$	$20.21 \pm 0.26$	$20.07 \pm 0.25$
Final BW (g)	$23.62 \pm 0.3^a$	$28.48 \pm 0.53^c$	$25.83 \pm 0.5^b$
BWG (g/day)	$0.10 \pm 0.00^a$	$0.20 \pm 0.01^c$	$0.12 \pm 0.01^b$
FI (g/day)	$2.58 \pm 0.04^b$	$2.62 \pm 0.1^b$	$2.24 \pm 0.05^a$
FER	$1.32 \pm 0.09^a$	$2.98 \pm 0.1^c$	$2.18 \pm 0.13^b$

Data are mean  $\pm$  S.E. <sup>abc</sup>Means not sharing a common letter are significantly different among the groups at  $p < 0.05$ . \*FI; Food intake, \*\*FER; Food intake ratio, ND; normal diet group, HFD; High fat diet group, HFD+FO; *Fragaria orientalis* treated group (300 mg/kg).

### 2. Effects of FO on organ and adipose tissue weights

평균 6주 동안 고지방 식이와 FO를 섭취한 쥐의 체중 100 g당 장기 및 지방 조직 무게의 변화는 표 3과 같다. 간 무게는 HFD군 ( $3.19 \pm 0.24$ )에서 ND군 ( $2.87 \pm 0.14$ )에 비해 유의하게 증가하였고, HFD+FO군은  $2.76 \pm 0.05$ 로 HFD군에 비해 간 무게가 유의하게 감소하였다. 모든 군에서 신장 및 가자미근의 유의한 차이는 없었다. 그러나 HFD군은 신장 무게가 증가하는 경향을 보였고, 고지방 식이를 섭취한 군은 가자미근의 무게가 감소하는 경향을 보였다. 부고환 지방 (ND;  $1.25 \pm 0.1$ ,

HFD;  $3.35 \pm 0.19$  및 HFD+FO;  $2.36 \pm 0.28$ ), 후복막 지방 (ND;  $0.34 \pm 0.03$ , HFD;  $1.12 \pm 0.14$  및 HFD+FO;  $0.75 \pm 0.07$ ), 근막 지방 (ND;  $0.2 \pm 0.02$ , HFD;  $0.42 \pm 0.05$  및 HFD+FO;  $0.29 \pm 0.01$ ), 장간막 지방(ND;  $0.47 \pm 0.05$ , HFD;  $1.14 \pm 0.08$  및 HFD+FO;  $0.78 \pm 0.5$ ), 총 WAT (ND;  $2.65 \pm 0.16$ , HFD;  $6.06 \pm 0.35$  및 HFD+FO;  $4.7 \pm 0.34$ )는 모두 ND군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가하였으며 HFD군에 비해 HFD+FO군에서 유의하게 감소하였다. 또한 BAT는  $0.32 \pm 0.01$ 로 모든 군에 비해 HFD+FO군에서 유의하게 증가하였다(Table 3).

Table 3. Effects of FO on organ and adipose tissue in diet-induced obese mice.

Group	Organ weight (g/100g BW)			WAT weight (g/100g BW)					BAT weight (g/100g BW)
	Liver	Kidney	Soleus	Epididymal	Retroperitoneal	Perirenal	Mesenteric	Total	
ND	$2.87 \pm 0.14^{bc}$	$1.12 \pm 0.03^a$	$1.17 \pm 0.03^{ab}$	$1.25 \pm 0.1^a$	$0.34 \pm 0.03^a$	$0.2 \pm 0.02^a$	$0.47 \pm 0.05^a$	$2.65 \pm 0.16^a$	$0.28 \pm 0.01^a$
HFD	$3.19 \pm 0.24^c$	$1.17 \pm 0.05^a$	$1.1 \pm 0.02^{ab}$	$3.35 \pm 0.19^c$	$1.12 \pm 0.14^d$	$0.42 \pm 0.05^d$	$1.14 \pm 0.08^c$	$6.06 \pm 0.35^e$	$0.28 \pm 0.02^a$
FO	$2.76 \pm 0.05^{ab}$	$1.12 \pm 0.03^a$	$1.12 \pm 0.03^{ab}$	$2.36 \pm 0.28^b$	$0.75 \pm 0.07^b$	$0.29 \pm 0.01^{abc}$	$0.78 \pm 0.05^b$	$4.7 \pm 0.34^{bc}$	$0.32 \pm 0.01^b$

Data are mean  $\pm$  S.E. <sup>abc</sup>Means not sharing a common letter are significantly different among the groups at  $p < 0.05$ . ND; normal diet group, HFD; High fat diet group, HFD+FO; *Fragaria orientalis* treated group (300 mg/kg).

### 3. Effects of FO on serum lipid profiles and liver function test

혈청 내 지질 프로파일 및 간 기능에 대한 결과는 표4에 나타내었다. 혈당 및 LDL-C 측정 결과, HFD군(186.33±0.67, 87.96±4.04)은 ND군 (132.33±3.18, 65.13±1.51)에 비해 유의하게 증가하였으며 HFD+FO군 (162.67±8.65 및 77.92±2.44)은 혈당을 유의하게 감소시켰고 LDL-C는 HFD군에 비해 유의하게 감소시켰다. HDL-C 혈청 수치는 ND군 (36.19±1.29)에 비해 HFD군(31.07±1.94)에서 유의성은 없지만 감

소하는 추세를 보였다. 그리고 HFD+FO군(47.71±2.3)은 HFD군(112.19±3.46 및 59.88±4.55)에 비해 유의하게 증가하였다. 또한 유의하지는 않았지만 HFD+FO군(137.06±6.14 및 72.90±2.56)은 HFD군에 비해 감소하는 경향을 보였다. 계산된 AI 값과 AST 및 ALT 분석 값을 비교했을 때, HFD군(2.52±0.1, 213.67±3.33 및 47.00±1.35)은 ND군 (2.08±0.09, 129.33±0.67 및 35.33±3.18)에 비해 유의하게 증가하였고, HFD+FO군(2.29±0.01, 138.00±7.00 및 40.8±0.97)은 HFD군(Table 4)에 비해 유의하게 감소하였다.

Table 4. Effects of FO on serum lipid profiles and liver function test

Group	Serum (mg/dl)					AI	Liver (U/L)	
	Blood glucose	TG	TC	HDL-C	LDL-C		AST	ALT
ND	132.33±3.18 <sup>a</sup>	112.19±3.46 <sup>a</sup>	59.88±4.55 <sup>a</sup>	36.19±1.29 <sup>a</sup>	65.13±1.51 <sup>a</sup>	2.08±0.09 <sup>a</sup>	129.33±0.67 <sup>a</sup>	35.33±3.18 <sup>a</sup>
HFD	186.33±0.67 <sup>c</sup>	152.10±7.37 <sup>b</sup>	75.96±5.34 <sup>b</sup>	31.97±1.94 <sup>a</sup>	87.96±4.04 <sup>c</sup>	2.52±0.10 <sup>b</sup>	213.67±3.33 <sup>b</sup>	47.00±1.35 <sup>b</sup>
FO	162.67±8.65 <sup>b</sup>	137.06±6.14 <sup>b</sup>	72.90±2.56 <sup>ab</sup>	47.71±2.30 <sup>b</sup>	77.92±2.44 <sup>b</sup>	2.29±0.01 <sup>a</sup>	138.00±7.00 <sup>a</sup>	40.80±0.97 <sup>a</sup>

Data are mean±S.E. <sup>abc</sup>Means not sharing a common letter are significantly different among the groups at p<0.05. ND; normal diet group, HFD; High fat diet group, HFD+FO; *Fragaria orientalis* treated group (300 mg/kg), AI; Arteriosclerosis index.

### 4. Effects of FO on the histomorphology in diet-induced obese mice

비만에 의한 지방간 병변 및 지방세포 비대의 형태학적 관찰을 Fig. 1 a-b에 나타내었다. 또한, 사구체 비대 및 세뇨관 괴사에 대한 신장의 형태학적 분석을 Fig. 1c에 나타내었다. HFD군은 ND군에 비해 높은 지질 축적 및 지질 질량을 나타내었으며, HFD+FO군은 HFD군에 비해 지질 축적 및 지질 질량을 감소시켰다(Fig. 1a). 지방조직의 형태학적 관찰에서, 지방세포의 크기는 ND군에 비해 HFD군에서 크고 HFD+FO군에서 HFD군에 비해 작은 것으로 관찰되었다(Fig. 1b). 추출물의 독성을 확인하기 위하여 신장을 형태학적 관찰한 결과, 사구체 비대 및 세뇨관 침윤의 특징은 나타나지 않았다 (Fig. 1c).

(Peroxisome prolifer-activated receptor- $\alpha$ )의 단백질 발현을 측정하였다. HFD군(0.91±0.07)은 ND군(1.02±0.01)에 비해 유의하지는 않았으나 감소 추세를 보였으며, FO군 (1.15±0.04)은 HFD군(Fig.2c)에 비해 유의한 증가를 보였다. 에너지 소비의 주요 역할을 하는 UCP-1 (Uncoupling protein-1) 단백질 발현을 측정한 결과, HFD군(0.98±0.01)은 ND군(1.39±0.01)에 비해 유의한 감소를 보였고, HFD+FO군 (1.52±0.02)은 HFD군에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig. 2f).

### 5. Effect of FO on lipid metabolism-related hepatic protein expressions.

지질 대사 관련 인자 p-AMPK, p-ACC, PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , CPT-1 및 UCP-1의 단백질 발현에 대한 FO의 효과를 결정하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다 (Fig. 2a-f).

p-AMPK, p-ACC, CPT-1 및 PPAR- $\gamma$  단백질 발현을 측정하였다. 그 결과, HFD+FO군(1.15±0.06, 1.04±0.01 및 1.08±0.08)에서 HFD군(0.85±0.04, 0.71±0.06 및 0.26±0.00)에 비해 p-AMPK, p-ACC 및 CPT-1 수준이 유의하게 증가하였다(Fig. 26a, b 및 e). 또한, PPAR- $\gamma$  수준은 HFD+FO군(0.8±0.07)에서 HFD군(1.18±0.06)에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 2d). 지질 합성 및 지질 대사 조절에 관여하는 인자들 중 특히 지질 산화를 조절하는 인자인 PPAR- $\alpha$

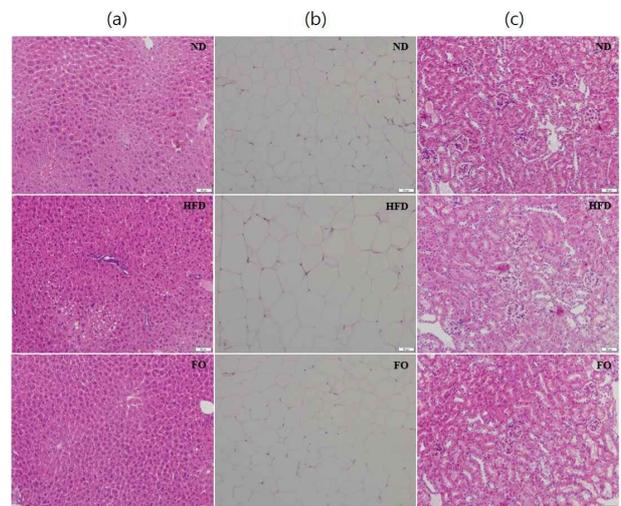


Fig. 1. Effects of FO on the histomorphology in diet-induced obese mice (x200)  
Data are mean ± S.E. ND; normal diet group, HFD; High fat diet group, HFD+FO; *Fragaria orientalis* treated group (300 mg/kg). Liver; (a). Epididymal fat; (b). Kidney; (c).

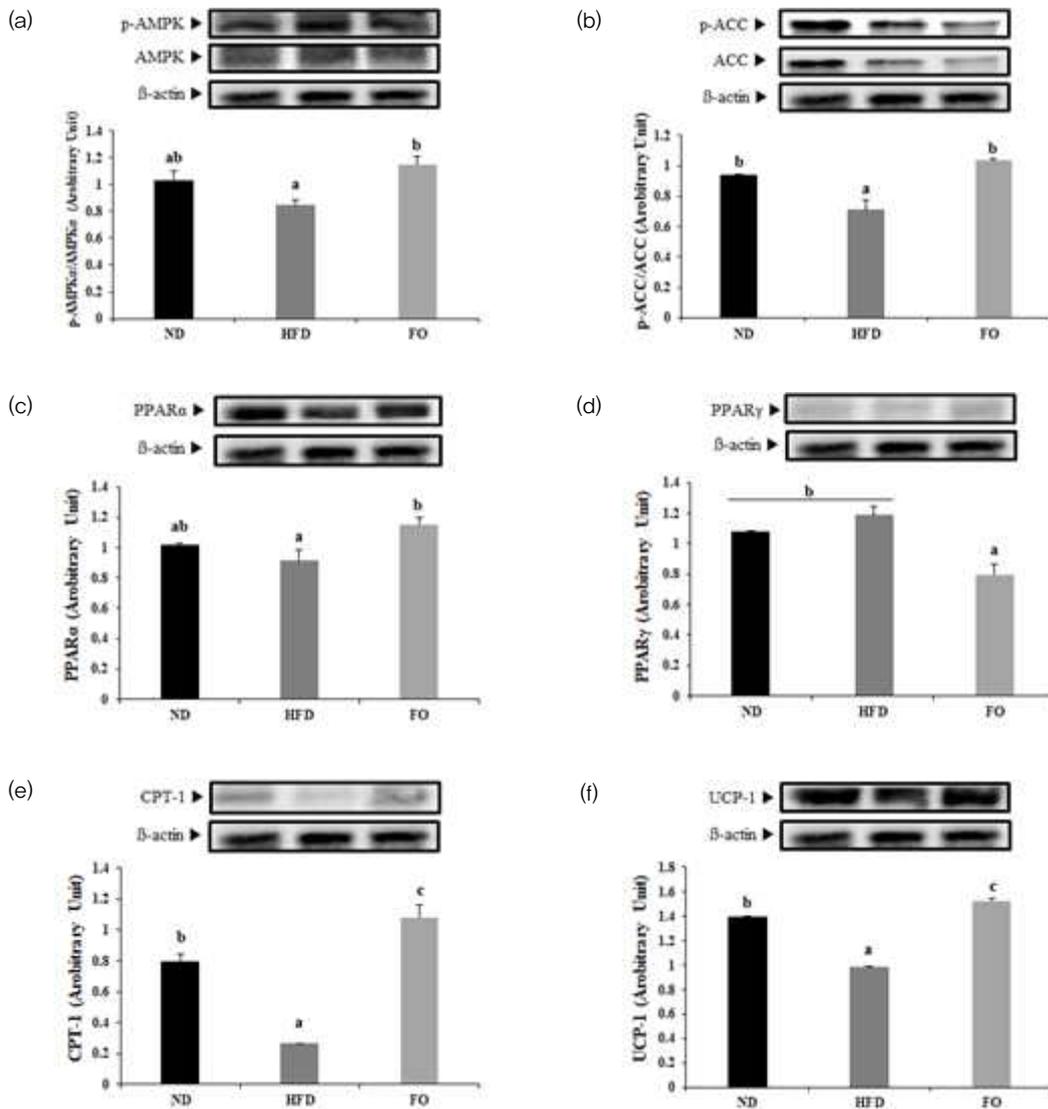


Fig. 2. Effect of FO on lipid metabolism-related hepatic protein expressions in diet-induced obese mice. Data are means  $\pm$  S.E. <sup>abc</sup>Means not sharing a common letter are significantly different among the groups at  $p < 0.05$ . ND; normal diet group, HFD; High fat diet group, HFD+FO; *Fragaria orientalis* treated group (300 mg/kg).

#### IV. 고 찰

비만은 지난 45년 동안 3배 증가한 유병률을 가진 주요 공중 보건 문제이다.<sup>13)</sup> 또한, 2015년 글로벌 질병 부담 연구의 분석에서 높은 BMI는 전 세계적으로 400만 명의 사망을 차지하고 1억 2천만 명의 장애 조정 수명에 기여하는 것으로 보고되었다.<sup>14)</sup> 비만은 환자의 삶의 질에 심각한 영향을 미치는 제2형 당뇨병, 심혈관 질환 및 비알코올성 지방간 질환을 포함한 다양한 만성 대사 질환의 발달과 밀접한 관련이 있다.<sup>14)</sup> 현재 일반적으로 사용되는 항비만 약물에는 심각한 부작용을 유발하는 것으로 알려진 췌장 리파아제 억제제 orlistat와 식욕억제제 sibutramine 등이 있다. 이러한 약물들은 환자에게 심장 두근거림, 혈압 상승, 거식증 및 우울증과 같은 이상 증상을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있어<sup>15)</sup> 안전하고 효과적인 치

료법, 특히 항비만 활성을 갖는 천연물에 많은 관심이 쏠리고 있다.<sup>16)</sup>

본 연구팀은 야생딸기로 불리는 FO (*Fragaria orientalis*) 물 추출물의 항비만 효능을 *in vitro*와 *in vivo* 시스템에서 평가하였다. 먼저, 저자 등은 이전 실험에서 세포에서 FO의 항산화 활성 및 항염, 항균 효과 및 FO가 지질대사를 억제한다는 것을 확인하였다<sup>17)</sup>. 따라서 본 연구에서는 FO 물추출물의 지방분화 및 지방 대사를 억제 효능을 비만 마우스 모델에서 평가하였다. 즉, C57BL/6 마우스에 45% kcal의 고지방 식이를 6주 동안 투여하여 비만 동물 모델을 유도하였다. HFD군은 ND군에 비해 체중이 20.6% 유의하게 증가했고, HFD+FO군은 HFD군에 비해 체중이 9.3% 유의하게 감소하였다. 고지방 식이는 마우스에서 체중 증가와 많은 양의 지방 축적을 유도했지만, FO 투여에 의해 상당히 감소된 것을 확인하였다 (Table 3).

또한, FO 투여는 비만 유도 마우스에서 음식 섭취와 FER을 유의하게 감소시켰다(Table 3). 백색 지방 조직은 주요 지질 저장 장소로 알려져 있으며, 렙틴, 다양한 호르몬, 아디포넥틴 등 다양한 단백질을 분비하는 기능을 가지고 있다<sup>18,19</sup>. 지방 조직에서 증가된 중성지방 수치는 산화 스트레스 유도로 인한 고지혈증, 심혈관 질환 및 당뇨병과 같은 다른 대사 질환과 관련이 있다<sup>20,21</sup>. 따라서, 백색 지방 조직 감소가 비만에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 모든 조직(간 및 WAT)의 무게는 ND군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가했으며, H&E 염색을 통해 지방세포 비대를 확인하였다(Fig. 5). 또한, 모든 조직의 무게와 조직학적 변화는 HFD군에 비해 HFD+FO군에서 유의하게 감소했음을 확인하였다(Table 4).

유리 및 에스테르화된 형태의 콜레스테롤 및 트리글리세리드는 혈청 내 주요 지질이며, 높은 혈청 수치의 트리글리세리드, HDL-C 감소 및 LDL-C 증가 또한 심혈관계 질환 및 내당능 장애, 인슐린 저항성 및 대사 질환을 유발한다. 따라서 혈청 콜레스테롤, 트리글리세리드 수치 및 AI는 이러한 대사 질환에서 중요한 요소이다.<sup>22,23</sup> 혈청 내 공복혈당, TG, TC 및 HDL-C를 측정하고 LDL-C 및 심혈관 지수 AI를 계산한 결과, FO 투여는 HFD군에 비해 공복혈당, LDL-C 및 AI를 유의하게 감소시켰다 (Table 4). 또한 TG 및 TC는 감소 추세를 보였고 HDL-C는 유의하게 증가하였다 (Table 4).

중성지방의 합성부위인 간조직은 지질대사에 중심적인 역할을 하며, 혈중 지질의 함량과 지방산의 산화를 조절한다고 알려져 있다. 간조직 염색을 통하여 확인한 결과, HFD군은 ND군에 비해 지방세포가 증가하였고, HFD+FO군은 HFD군에 비해 지방세포의 감소를 보였다 (Fig.1a). AST와 ALT는 간세포 손상의 진단에 가장 민감한 지표로, 이화작용과 아미노산 합성 시 AST와 ALT는 간세포 내인성 효소로서 중요한 역할을 한다. 정상적인 신체의 작업 조건에서는 혈중 ALT와 AST 수치가 매우 낮으며, 간조직이 손상되어 세포막 투과성이 증가하면 이 두 효소가 혈액에 대량으로 침투하여 혈청 내 효소의 활성이 크게 증가한다<sup>24</sup>. 따라서 혈청 AST와 ALT의 증가는 간세포 손상의 정도를 반영할 수 있다<sup>25,26</sup>. 따라서 AST와 ALT 측정 결과, HFD+FO군이 HFD군에 비해 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 FO 투여가 간 손상을 주지 않았음을 시사한다. Kim et al<sup>27</sup>에 따르면, 고지방식으로 인한 비만 쥐의 혈청과 간에서 지질대사를 개선시켜 지방간으로 인한 보리 싹 가루의 간세포 손상을 지연시키거나, 보리싹에 간보호제가 포함되어 있음을 보고하였다. 본 실험에서도 FO는 우수한 간보호 효과를 보였다.

이후 간 조직에서 지질대사 관련 단백질의 발현 수준을 확인한 결과, HFD+FO군이 HFD군에 비해 p-AMPK, p-ACC, 및 CPT-1이 유의하게 증가하였다. 생체 내 에너지 대사 조절은 AMPK가 중추적인 역할을 하며, AMPK는 지방 및 당 대사에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>28</sup> 에너지 대사의 이상은 심혈관계 질환, 암, 대사성질환에 깊은 관련이 있으며 AMPK의 활성이 비만을 포함한 대사성 질환 치료에 중요한 역할을 할 것으로 기대되어왔다<sup>29</sup>. AMPK의 하위 인자인 ACC는 지방산의 합성 및 산화에 관여하는 말로닐-CoA를 생성하는데 AMPK의 인산화 활성은 지질을 합성에 관여하는 ACC를 인산화시켜 불활성화 시키고, 그 결과로 CPT1의 활성

을 증가시켜 지방산 산화를 증가시킨다. 이는 FO가 지방생성을 억제하는 것을 시사한다. 또한, PPAR- $\gamma$ 은 HFD군에 비해 HFD+FO군에서 유의하게 감소하였다 (Fig.2a,b,d,e). 간에서, 과산화소체 및 미토콘드리아  $\beta$ -산화 관련 유전자 발현을 조절하는 주요 전사 인자인 PPAR- $\alpha$ 의 활성화는 지방산의 흡수, 이용 및 이화작용을 촉진한다<sup>30,31</sup>. PPAR- $\alpha$ 의 발현 수준을 측정한 결과, HFD+FO군의 발현 수준이 HFD군에 비해 유의하게 증가하였음을 확인할 수 있다(Fig.2c). 이러한 결과는 FO가 지방산 산화 단백질을 조절함으로써 비만을 개선시킬 수 있음을 시사한다. 또한, 갈색지방조직의 미토콘드리아 내막에 결합해제 단백질-1 (UCP-1)이 존재하며, 활성화되면 ATP 합성효소의 작용을 억제하고, 열을 발생시켜 체지방 축적을 방지하는 것으로 알려져 있다<sup>32</sup>. 그러나, Rial et al<sup>33</sup>에 따르면, 고지방식이 (45% kcal%)로 유도된 비만 마우스의 간에서 UCP-1의 발현이 대조군에 비해 섭취군에서 유의하게 증가하였다. 이 결과를 바탕으로, 본 실험에서 간에서의 UCP-1의 발현 수준을 측정하였다. 그 결과, UCP-1의 발현 수준은 HFD군에 비해 HFD+FO군에서 유의하게 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig.2f). 또한, 갈색지방조직의 무게를 측정한 결과, HFD+FO군에서 갈색지방조직의 무게가 유의하게 증가하였으며, FO가 ATP 합성효소의 작용을 억제하고, 열을 발생시켜 체지방 축적을 방해하는 것으로 사료된다 (Table 3).

위의 모든 결과를 종합해보면, 고지방식으로 유도된 비만 마우스에서 FO 투여는 체중 및 조직 무게 감소, 혈중 지질 축적 억제 등 항비만 효능에 유의한 결과를 보였다. 또한, 간 조직에서 AMPK 활성화를 통해 PPAR- $\gamma$  발현이 억제되었고, PPAR- $\alpha$ 의 증가를 통해 CPT-1과 UCP-1이 활성화되었다. 지방산의 산화는 촉진하고, 생성은 억제하여 콜레스테롤 생성을 감소시키는 것으로 생각된다. 이러한 결과를 통해 FO는 지방 대사를 촉진시켜 비만 마우스에서 체중과 체지방량을 감소시키는 것으로 생각된다. 따라서 FO는 비만의 치료와 예방을 위한 기능적 물질로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 FO가 식이에 의한 비만 C57BL/6 마우스에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중과 식이 효율은 HFD 그룹에 비해 두 HFD+FO 그룹 모두에서 유의하게 감소하였다.
2. 간 및 지방 조직 무게는 HFD+FO군에서 HFD군에 비해 유의하게 감소하였고, 갈색 지방 조직 무게는 유의하게 증가하였다.
3. 혈액 분석 결과, TG, TC, LDL-C, AST, ALT의 혈청 수치는 모두 HFD+FO군에서 HFD군에 비해 유의하게 감소 또는 감소하는 경향을 보였으며, HDL-C는 유의하게 증가하였다.

4. 간 및 백색 지방 조직의 형태학적 관찰 결과, HFD+FO 군에서 HFD군에 비해 지방 세포의 크기와 축적이 감소하는 것이 관찰되었다.
5. 식이 유도 비만 쥐에서 p-AMPK, p-ACC, PPAR- $\alpha$ , CPT-1 및 UCP-1 등 지질대사 관련 간 단백질의 발현은 각각 유의한 증가를 보였고 PPAR- $\gamma$ 은 유의하게 감소하였다.

따라서 FO는 식이 유도 비만 마우스에서 지방 생성 및 지질 대사 관련 단백질 발현에 영향을 끼쳐 비만의 예방과 치료를 위한 기능적 물질로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 (PJ015272032021)과 한국연구재단 (2021R1A2C201471711)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

## References

1. Korea National Health and Nutrition Examination Survey, Korea Disease Control and Prevention Agency, 2022. [https://knhanes.kdca.go.kr/knhanes/sub03/sub03\\_02\\_05.do](https://knhanes.kdca.go.kr/knhanes/sub03/sub03_02_05.do).
2. Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases, Report of a Joint WHO/FAO Consultation, WHO Technical Report Series, 2003 ; 916.
3. Park YU. Office Management of Obesity. Seoul: Hanmi, 2007 ; 27(30) : 107-125, 281-285.
4. Chi BH, Hur JI, Kim DW, Park K, Kim DJ, Byun JS. A clinical Study on the effect of 62 cases through obesity clinic in Dae-Gu Haany University. Korean J. Orient. Int. Med. 2006 ; 27(2) : 345-355.
5. Yoon JC, Kim KK. Pharmacotherapy in obesity: the current state and the near future. J Korean Med Assoc. 2022 ; 65(8) : 514-531.
6. Son EH, In SW, Kim BO, Pyo SN. Anti-Obesity Drugs: A Current Research Insight. J. Exp. Biomed. Sci. 2005 ; (11) : 89-101.
7. Apfellabaum M, Vague P, Ziegler O, Ilanotin O, Thomas F and Leu-tenegger E. Long-term maintenance of weight loss after a very low calorie diet; Efficacy and tolerability of sibutramine. Am. J. Med. 1999 ; 106 : 179-184. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(98\)00411-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(98)00411-2).
8. Lee HG - The Science & Technology, 2003 ; (8) : 50-52.
9. Trend of Patent Application for Natural Obesity Treatment, Korean Intellectual Property Office, 2008, <https://www.kipo.go.kr/kpoBultnFileDown>.
10. Shin DH, Cho GH, Lee H, Moon MK, Kang DG, Yun YG, Park DS, Juhng SK, Lee HS. Clinical study of Bangpoongtongsungsan on body weight change in subjects with obesity. The Korean Journal Of Oriental Medical Prescription 2008 ; 16(2) : 133-144.
11. Zhang Y, Zhang Q, Sammul M. Physiological integration ameliorates negative effects of drought stress in the clonal herb *Fragaria orientalis*. PLOS ONE. 2012 ; 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044221>.
12. Han Y, Wu HB, Liu Y. The complete chloroplast genome sequence of *Fragaria orientalis* (Rosales: Rosaceae). Mitochondrial DNA Part B : Resources. 2018 ; 3(1) : 127-128. <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1424578>.
13. Ahmad NN, Robison S, Martin TK, Poon JL, Kan H. Clinical outcomes associated with anti-obesity medications in real-world practice: a systematic literature review. Obesity Rev. 2021 ; 22. <https://doi.org/10.1111/obr.13326>.
14. GBD 2015 obesity collaborators. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. N Eng J Med. 2017 ; 377 : 13-27. <http://hdl.handle.net/10550/67381>.
15. Wu Y, Tan F, Zhang TY, Xie BL, Ran LX, Zhao X. The anti-obesity effects of lotus leaves on high-fat-diet-induced obesity by modulating lipid metabolism in C57BL/6J mice. Appl Biol Chem. 2020 ; 63 : 61. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00541-x>.
16. Song D, Cheng Lu, Zhang X, Wu Z, Zheng X. The modulatory effect and the mechanism of flavonoids on obesity. J Food Biochem. 2019 ; 43. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12954>.
17. Choi MY, Kim MH, Kim MR. Effects of *Fragaria Orientalis* Water extract on Adipogenesis and Cell Differentiation in 3T3-L1 Cells. Kor. J. Herbology 2024 ; 39(3) : 49-56. <http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2024.39.3.49>.
18. Trayhurun P, Wood IS. Adipokines inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. Br J Nutr. 2004 ; 92 : 347-355. <https://doi.org/10.1079/BJN20041213>.
19. Jeong HS. Efficacy of *Alismatis Orientale Rhizoma* on Obesity induced by High Fat Diet. Kor. J. Herbology 2013 ; 28(3) : 95-106. <http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2013.28.3.95>.

20. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Boren J, Catapano AL, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Nordestgaard BG, Ray KK, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgozlu L, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J*. 2011;32:1345-1361. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr112>.
21. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 ; 404 : 635-643.
22. Das UN. Is Obesity an Inflammatory Condition?. *Nutrition*. 2001 ; 17. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00672-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00672-4).
23. Vega GL, Barlow CE, Grundy SM, Leonard D, Defina LF. Triglyceride-to-high-density-lipoprotein-cholesterol ratio is an index of heart disease mortality and of incidence of type 2 diabetes mellitus in men. *J Investig Med*. 2014 ; 62(2) : 345-349. <https://doi.org/10.2310/JIM.00000000000000044>.
24. 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. <http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2016.31.3.1>.
25. Liu B, Fang Y, Yi R, Zhao X. Preventive effects of blueberry extract on liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. *Foods*. 2019 ; 8(2) : 48. <https://doi.org/10.3390/foods8020048>.
26. Han HJ, Kim HJ, Chong MS, Cho HE, Choi YH, Lee KN. Effect of Red Ginseng with Processed Sulfur Extracts on Serum Lipids Concentration and Metabolic Variables in Diabetic Rats. *Kor. J. Herbol*. 2009 ; 24(1) : 89-98. <https://doi.org/10.6116/kjh.2009.24.1.089>.
27. Kim DE, Park SH, Lee YM, Lee JJ. Effects of young barley leaf powder on anti-obesity and lipid improvements in rats fed a high-fat diet. *Kor J Community Living Sci*. 2019 ; 30(2) : 211-221. <https://doi.org/10.7856/kjcls.2019.30.2.211>.
28. Liu H, Wang J, Liu M, Zhao H, Yaqoob S, Zheng M, Cai D, Liu J. Antiobesity effects of ginsenoside Rg1 on 3T3-L1 preadipocytes and high fat diet-induced obese mice mediated by AMPK. *Nutrients*. 2018 ; 10 : 830. <https://doi.org/10.3390/nu10070830>.
29. Li Q, Lai X, Sun L, Cao J, Ling C, Zhang W, Xiang L, Chen R, Li D, Sun S. Antiobesity and anti-inflammation effects of hakka stir-fried tea of different storage years on high-fat diet-induced obese mice model via activating the AMPK/ACC/CPT1 pathway. *J Food Nutr Res*. 2020 ; 64 : 1681. <https://doi.org/10.29219/fnr.v64.1681>.
30. Song JB, Kim YS, Kim LN, Park HJ, Lee DH, Kim HC. Anti-obesity effects of the flower of *prunus persica* in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients*. 2019 ; 11 : 2176. <https://doi.org/10.3390/nu11092176>.
31. Tutunchil H, Asl MS, Ostadrahimi A. A systematic review of the effects of oleoylethanolamide, a high-affinity endogenous ligand of PPAR- $\alpha$ , on the managements and prevention of obesity. *Clin Exp Pharmacol. Physiol*. 2020 ; 47 : 543-552. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13238>.
32. Palou A, Pico C, Bonet L, Oliver P. The uncoupling protein themegenin. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 ; 30 : 7-11.
33. Rail SA, Carignan AJ, Bergeron KF, Mounier C. A high-fat diet enriched in medium chain triglycerides triggers hepatic thermogenesis and improves metabolic health in lean and obese mice. *BBA-Mol cell Biol L*. 2020 ; 1865(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2019.158582>.