

Chamaeneron angustifolia 추출물이 3T3-L1 Preadipocyte의 지방대사 및 분화에 미치는 영향

이슬비[#], 최문열, 김미형, 김소영, 김미려^{*}

대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

Effects of *Chamaeneron angustifolia* Extract on Lipid Metabolism and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocyte

Seul Bi Lee[#], Moon-Yeol Choi, Mi Hyung Kim, So-Young Kim, Mi Ryeo Kim^{*}

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

ABSTRACT

Objectives : Obesity is an imbalance between energy intake and consumption due to overeating and lack of exercise, and if it persists, it increases non-infectious diseases such as high blood pressure, diabetes, and hyperlipidemia. In this study, we tried to investigate the possibility of using *Chamaeneron angustifolia* (CA) as a material for anti-obesity by confirming the effect of inhibiting lipid differentiation.

Methods : We measured the effects of CA extract on oil-red-o staining, cell cytotoxicity evaluation activity using 3T3-L1 cells. Additionally, we assessed fat decomposition and metabolism-related protein expression through Western blot analysis.

Results : In this study, the anti-obesity effects of CA extract were experimentally assessed. Results showed significant inhibition of adipocyte differentiation and accumulation at concentrations of 0.05, 0.1, and 0.2 mg/ml of oil-red-o staining, with reductions of 80% or more. CA notably increased the phosphorylation of AMPK protein expression compared to the control group across all concentrations. Additionally, phosphorylation of ACC significantly increased at a concentration of 0.2 mg/ml compared to the control. PPAR- γ , which regulates adipogenesis, exhibited a significant decrease compared to the control, while protein expression of CPT-1, involved in fatty acid oxidation, showed a concentration-dependent increase across all groups. Therefore, CA extract demonstrates potential as a functional material for anti-obesity by increasing the expression of proteins related to fat decomposition and synthesis while decreasing others.

Conclusions : These results suggest that CA may also be useful as an anti-obesity functional substance.

Key words : 3T3-L1, *Chamaeneron angustifolia*, Adipogenesis, Anti-obesity, Adipocyte differentiation

I. 서 론

Chamaeneron angustifolia L. (CA)는 ‘분홍바늘꽃’ 으
로도 불리며, Onagraceae과의 긴 가지가 있는 뿌리줄기와

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

· Tel : +82-53-770-2361

· E-mail : mrkim@dhu.ac.kr

#First author : Seul Bi Lee, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea.

· Tel : +82-53-770-2241

· E-mail : bi6570@naver.com

· Received : 10 June 2024

· Revised : 10 July 2024

· Accepted : 25 July 2024

다육질의 줄기가 있는 다년생 초본으로 숲, 공터, 건조한 모래밭, 비옥한 땅이 없고 토양의 광물화가 강한 곳에서 자란다^{1,2)}. 북아메리카와 유라시아에 널리 분포하는 종으로 약용뿐만 아니라 식용 및 관상용 식물로도 널리 사용되어왔으며 특히 제약, 식품 및 화장품 산업에 사용되는 중요한 약용식물로 알려져 있다³⁾. CA 추출물은 항산화⁴⁾, 항염증⁵⁾, 항암 효과⁶⁾가 있다고 보고되어 있으나 CA의 항비만 효능에 관한 연구는 미비한 상황이므로 본 연구에서는 몽골산 CA의 지질분화억제 효과를 확인하여 항비만 소재 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

비만은 약물, 환경, 화학물질, 스트레스 변형된 장내 미생물과 같은 유전적 요인과 환경적 요인 등 복합적으로 작용하는 다인성 질환이다⁷⁾. 비만은 과식과 운동 부족으로 인한 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인해 발생하며, 세계보건기구(WHO)에서는 비만의 기준을 체질량지수(BMI) 30 이상으로 정의하였다. 분석에 따르면 세계인의 약 1/3이 과체중이고 약 10%가 비만으로 나타났으며 2030년까지 비만 유병률은 성인 2명 중 1명으로 유병률이 증가할 것으로 예상하고 있다^{8,9)}. 현재 비만은 전 세계적으로 다섯 번째로 가장 흔한 사망 원인으로 꼽히고 있으며, 비만이 지속되는 경우, 고혈압, 제2형 당뇨병, 이상지질혈증, 관상동맥질환 및 뇌졸중 등의 질병이 수반될 수 있다^{10,11)}. 현재까지 비만 치료의 기본 방법으로는 운동, 식단 조절, 약물적 치료 및 수술적 치료 등이 있다. 그러나 식단 조절은 급격한 체중 감량으로 인한 과식을 일으키기 쉬우며, 적절한 수분 섭취에도 불구하고 음식 제한 시 탈수 및 변비와 같은 추가 합병증이 발생할 수 있다. 또한 간헐적 단식은 비만, 이상지질혈증, 고혈압, 염증 및 인슐린 저항성에 도움이 될 수 있으나 장기적인 지속 가능성과 이점은 알려지지 않았다¹¹⁾. 약물치료 중 날트렉손/부프로피온은 도파민/노르에피네프린의 재흡수억제제로서 부작용으로 메스꺼움, 변비, 두통이 나타나고 펜터민/토피라메이트는 식욕억제제로 감각이상, 불면증, 미각 상실, 두통, 설사 등의 부작용이 나타난다¹¹⁾. 개발 단계에 있는 일부 약물은 생체 및 이론적으로 비만 치료에 효과가 있을 것으로 예상되나, 추가적인 동물 및 초기 임상시험에서 체중감소 효과가 미비하여 폐기되었다. 비만 치료를 위한 수많은 실험이 진행되고 있으나 부작용, 적절한 섭취 등 다양한 문제로 인해 지속적인 연구가 필요한 실정이다^{11,12)}.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 제조

채집된 CA 전초를 건조 작업 후 적당한 크기로 절단 및 분쇄하였다. 건조량 200 g에 증류수 2,000 ml를 첨가하여 heating mantle (NP33.1, PilZ, Ostfildern, Germany)로 100℃에서 30분 간격으로 10℃씩 180℃까지 올려 2시간 동안 가열하였다. 추출액은 상층액을 진공원심분리기(RE-301, Equipment Co, Zhengzhou, China)를 사용하여 농축하였다. Freeze-dryer (7753027, Labconco, Missouri, USA)로 동결 건조한

분말을 얻었으며 실험 직전까지 -80℃에서 냉동보관 후 사용하였다. 본 실험에서 사용한 CA 추출물은 몽골 전통 의학 연구소 및 몽골 국립 의과대학 소속 연구팀에서 공급받아 사용하였다.

2. 방법

1) DPPH free radical 소거능 측정

CA 물 추출물을 농도별로 희석한 추출물 또는 0.1 mg/ml 양성 대조군 BHA (Butylated hydroxyanisole, sigma, Missouri, USA)를 96 well plate에 각각 100 μ l씩 분주한 다음, 에탄올에 희석한 0.2 mM DPPH 50 μ l 및 에탄올 50 μ l 첨가하여 혼합하였다. 이후 차광하여 30분 동안 반응시킨 반응액을 517nm 파장에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. DPPH radical scavenging activity (%)를 아래 식으로 계산하였으며, 본 실험은 Blois의 방법¹³⁾을 보완하여 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 (%)

$$= [1 - (\text{추출물의 흡광도} / \text{추출물 무첨가 군의 흡광도})] \times 100$$

2) 세포 배양

3T3-L1 세포는 미국 세포주 은행(American type culture collection, ATCC, CL-173TM, Manassas, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ 배양기(MCO-15AC, SANYO, Japan)에서 DMEM (high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)에 10% BCS (bovine calf serum, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)와 1% P/S (penicillin-streptomycin, Thermo Fisher scientific, Massachusetts, USA)을 첨가한 배지에서 배양하였다. 세포 분화를 유도하기 위해서 10% FBS (Fetal bovine serum, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), 0.5mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, Thermo Fisher scientific, Massachusetts, USA), 1% P/S, 2 μ M DEX (dexamethasone, Thermo Fisher, Massachusetts, USA) 및 10 μ g/ml insulin을 포함하는 DMEM 배지로 교체하였다. 분화 5일 이후, 배양액에 insulin을 첨가하지 않고 배양하였다. CA 물 추출물의 농도는 0.05, 0.1 및 0.2 mg/ml로 배지 교체 시기마다 함께 처리하였다.

3) 세포 독성 평가

CA 물 추출물이 3T3-L1 세포에서 세포 독성에 미치는 영향을 측정하였다. 96 well plate에 3T3-L1 세포를 48시간 배양하였다. 추출물을 농도별로 24시간 처리 후 1 mg/ml 농도의 MTT시약 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide, Sigma, Missouri, USA) 200 μ l씩을 첨가하여 반응시켰다. 4시간 동안 반응 후 상층액을 제거하고 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma, Missouri, USA)를 200 μ l씩 분주하였고 생성된 Formazan을 모두 녹인

후 570nm 파장에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4) Oil-red-O 염색

3T3-L1 지방세포의 세포 분화 중 CA 물 추출물을 농도 별로(0.05, 0.1, 0.2 mg/ml) 함께 처리하였다. 분화 8일 후 세포 배양액을 제거하고 DPBS (phosphate buffered saline, intron biotechnology, Seongnam, Korea)로 세척 하였으며, pH 7.2 cacodylate buffer로 4°C에서 2시간 고정하였다. 고정이 완료된 세포를 DPBS로 세척하고 oil-red-o 시약(Sigma, Missouri, USA) 3 ml을 첨가하여 염색하였다. 2시간 동안 실온에서 염색한 후 염색 시약을 제거하고 세척 한 후 건조하였다. 100% isopropyl alcohol (Junsei, Tokyo, Japan)로 지방을 추출하여 흡광도 520nm로 ELISA reader를 이용하여 측정하였다.

5) Western blot 분석

3T3-L1 지방 전구세포에서 CA 물 추출물의 처리가 지방 분화 및 대사에 있어서 어떠한 영향을 미치는지를 평가하기 위해 단백질 발현을 측정하였다. 분화가 완료된 세포를 DPBS로 세척한 후 lysis buffer로 세포를 용해시켰다. 4°C에서 1300 rpm으로 30분간 원심분리한 후 얻은 상층액을 Bradford법으로 단백질을 정량하였고 정량한 50 µg 단백질을 12% SDS-page gel을 사용하여 전기영동 후 Transfer 하였다. β-actin (1:3000, Mouse, Santa Cruz Biotechnology, USA), AMPK, phospho-AMPK, ACC, phospho-ACC (1:1000, Rabbit, Cell Signaling, USA), CPT-1 (1:1000, Mouse, Abcam, USA), PPAR-γ (1:1000, Mouse, Cell Signaling, USA) 의 1차 항체를 4°C overnight 처리하고, 2차 항체(1:3000, rabbit or mouse, GeneTex, USA)를 1시간 반응시킨 후 ECL을 사용하여 단백질 발현량을 관찰하였다.

6) 통계 처리

모든 실험 결과는 IBM SPSS 통계 프로그램(ver 27, USA)을 이용하여 처리하였다. 군 간 평균 차이를 분석하기 위해 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였으며 유의성 검정은 Duncan's multiple range test를 사용하여 P값이 <0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. CA 물 추출물의 DPPH free radical 소거능 측정

CA 물 추출물을 0.1, 0.5, 1 및 5 mg/ml 농도로 처리하여 라디칼 소거능을 평가한 결과, 각 농도 별로 80.90±0.45%, 81.94±0%, 81.94±1.36%, 84.69±0.56%로 나타났으며, 양성 대조군인 BHA는 90.58±0.79%로 나타났다(Figure 1).

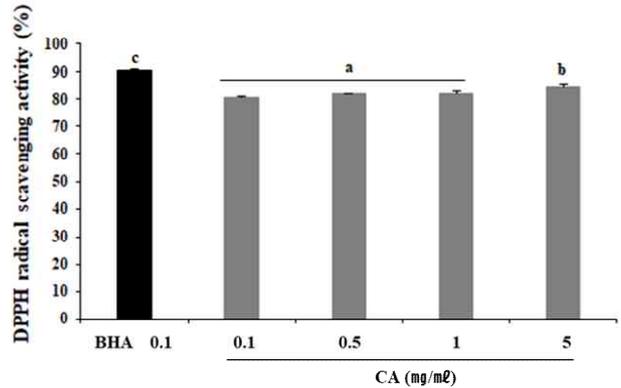


Figure 1. DPPH free radical scavenging activity of CA water extract. Data were expressed as mean ± standard error. Distinct letters denote statistical variances (p < 0.05) determined by Duncan's Multiple range test.

2. CA 물 추출물이 3T3-L1의 세포 독성에 미치는 영향

CA 물 추출물 처리 후 세포 생존율을 측정한 결과 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1 mg/ml 군에서 각각 106.90±4.37%, 104.67±3.23%, 104.54±6.03%, 107.36±3.03%, 73.55±6.24%, 41.86±6.80%로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도인 0.2 mg/ml 이하 농도를 설정하였다(Figure 2).

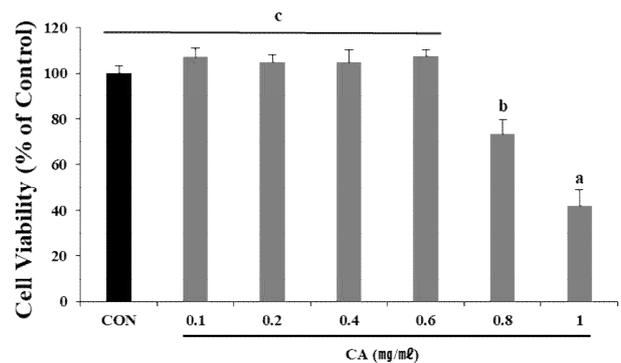


Figure 2. Effect of CA water extract on the cell viability in 3T3-L1 cells. Data are expressed as mean ± standard error. Distinct letters denote statistical variances (p < 0.05) determined by Duncan's multiple range test.

3. 3T3-L1 세포에 대한 지질분화 촉진 및 억제능 평가

3T3-L1 지방 전구세포 내 중성지방 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 CA 물 추출물 0.05, 0.1 및 0.2 mg/ml 농도를 처리하여 Oil Red O 염색한 결과, 각각 59.86±4.61%, 12.86±0.70%, 11.51±0.42%로 나타났다. 따라서 지방세포에 중성지방 축적은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Figure 3).

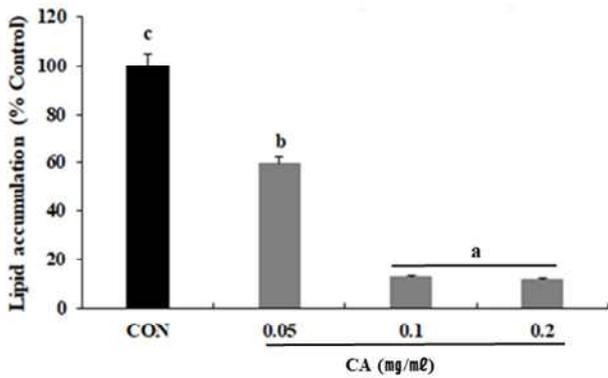


Figure 3. Effect of CA water extract on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Data were expressed as mean \pm standard error. Distinct letters denote statistical variances ($p < 0.05$) determined by Duncan's multiple range test.

4. 지방 분화 및 대사 관련 단백질 발현량 분석

3T3-L1 세포에서 CA 물 추출물을 처리하여 지방분화 및 대사 관련 단백질 발현을 확인하기 위해 Western blot을 실시하였다. 세포 내의 에너지 대사 조절, 에너지 항상성 유지와 관련 있는 AMPK 인산화를 확인한 결과, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 각각 1.94 ± 0.17 , 2.40 ± 0.61 , 3.84 ± 0.17 로 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의적 증가가 나타났다. 중성지방 형성의 주요 인자인 ACC의 인산화는 0.2 mg/ml 농도에서 5.0 ± 0.30 으로 유의한 증가가 나타났다. 또한 지방산 산화에 관여하는 CPT-1의 단백질 발현은 모든 군에서 대조군에 비해 증가하였으며 지방분화 조절인자인 PPAR- γ 의 단백질 발현은 모든 농도 군에서 1.30 ± 0.01 , 0.74 ± 0.04 , 0.93 ± 0.11 로 유의적으로 감소하였다(Figure 4).

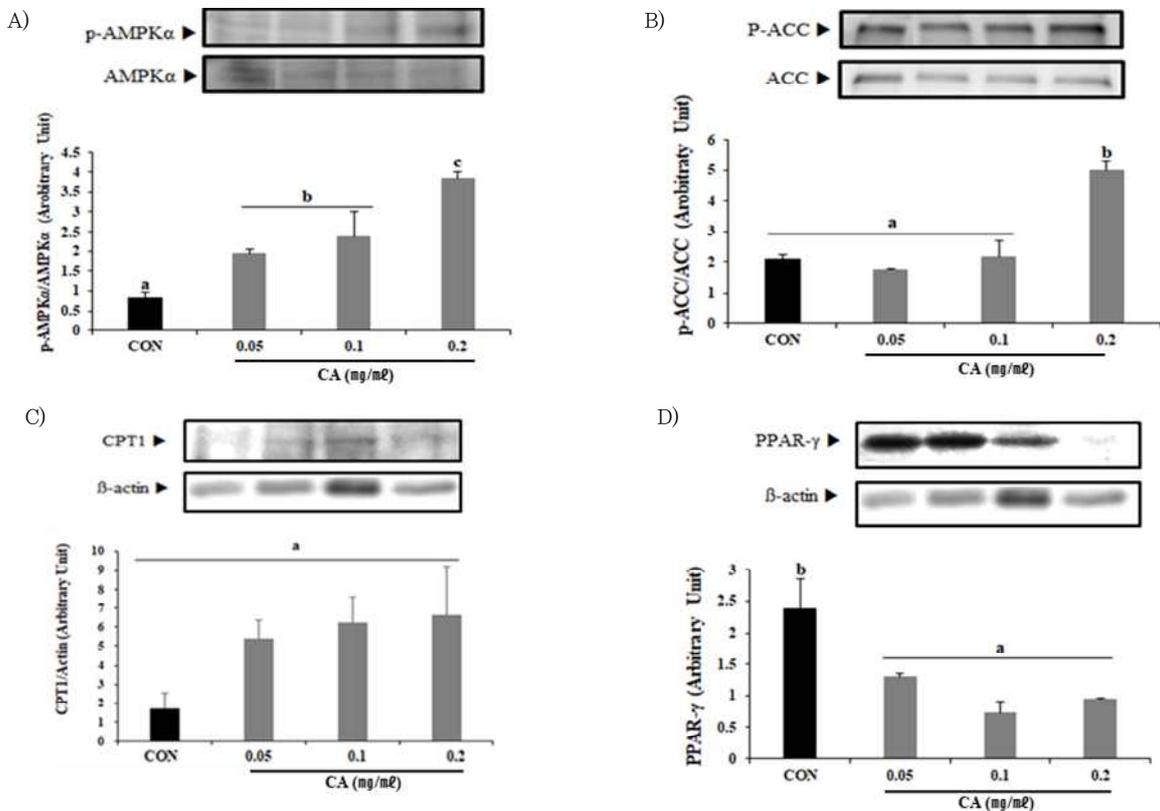


Figure 4. Effect of CA water extract on P-AMPK and P-ACC, CPT-1 and PPAR γ protein expressions in 3T3-L1 cells. (A) Phospho-AMP-activated protein kinase α (p-AMPK α)/AMP-activated protein kinase α (AMPK α), (B) Phospho-acetyl-CoA carboxylase (p-ACC)/ Acetyl-CoA carboxylase (ACC), (C) Carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1)/ β -actin (D) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ)/ β -actin. Data are expressed as mean \pm standard error. Distinct letters denote statistical variances ($p < 0.05$) determined by Duncan's multiple range test.

IV. 고찰

비만은 일반적으로 지속적인 에너지 불균형으로 인한 체지방 과잉을 특징으로 하며 소모되지 못하고 축적된 칼로리는 지방

세포에서 중성지방의 형태로 저장되고 이는 지방세포 내 지질의 증가 및 지방세포의 수와 크기의 증가를 유도한다^{14,15}. 지방 조직은 중요한 에너지 저장고이자 에너지 균형에 필수적인 기관으로 많은 생체 합성 펩티드와 단백질을 분비하며, brown

adipose tissue (BAT)와 white adipose tissue (WAT) 두 종류가 있다. BAT는 주로 스트레스, β -adrenergic 자극, 열 발생을 담당하며 WAT는 지질 항상성과 에너지 균형을 유지하는 역할을 한다. 비만과 관련된 WAT의 비정상적인 확장은 기존 지방세포의 세포 크기를 증가시키거나 새로운 지방세포의 분화를 통해 그 수를 증가 시킨다^{16,17}. 현재 국내에서 시판되는 비만약으로는 올리스타트(Orlistat), 로카세린(Lorcaserin), 펜터민/토피라메이트(phentermine/topiramate), 날트렉손/뷰프로피온(naltrexone, ER/bupropion) 등이 있다. 올리스타트는 중성지방이 지방산으로 분해되어 장에서 흡수되는 것을 방지하지만 노인 환자나 간 또는 신장 기능이 손상된 환자에 대한 안전성에 대한 데이터가 충분하지 않았으며, 다른 약물들 또한 심혈관에 관한 안전성, 매스꺼움, 구토, 과다색소 침착 등 부작용이 보고되고 있다¹⁸. 항산화제는 식욕, 포만감, 에너지 소비 및 항상성 조절에 관여하는 호르몬과 신경펩타이드(지방 조직의 렙틴 및 아디포넥틴, 췌장의 인슐린, GLP-1 등)를 조절하고 살아있는 유기체에 부정적인 영향을 미치는 활성산소인 자유라디칼과 존재와 관련된 산화스트레스의 영향을 중화시키는 역할을 한다^{19,20}. 최 등¹의 연구에서 몽골 약용식물 40종 중 상위 종으로서 CA 물 추출물이 3T3-L1 세포에서 지질 축적 저해 활성을 우수하게 억제하는 추출물 중 하나로 보고하였다. 따라서 이전 연구에서 다른 약제에 비해 지방 대사 억제에 유의한 효과가 있는 약용식물 중 하나인 CA를 선정하여 본 연구를 진행 하였다¹. 먼저 CA 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 높은 항산화능을 확인한 후 가장 일반적으로 사용되는 지방 세포주 중 하나인 3T3-L1 세포에서 CA의 효능을 확인 하였다. 지방 전구세포에서 지방세포로의 분화는 일반적으로 성장 정지 후 배양 배양액을 처리하며 대략 4일이 지나면 세포는 배양 시간에 따라 수와 크기가 커지는 지질 방울 형태로 지질을 축적이 이루어진다^{21,22}. 이에 분화된 3T3-L1 세포에서 CA 물 추출물을 0.05, 0.1 및 0.2 mg/ml 농도로 처리하여 oil-red-o 염색한 결과, 지방세포 분화 및 세포 내 중성지방 축적은 대조군에 비해 CA 물 추출물의 모든 처리 농도에서 유의하게 억제되었다.

AMPK는 세린/트레오닌-단백질 키나아제로 인산화되면 AMPK는 지방산 산화와 같은 이화작용 경로를 촉진하고 지방산 합성과 같은 에너지 소비 경로를 억제한다. 또한 AMPK 인산화는 ACC를 비활성화하여 지방산과 콜레스테롤 합성을 억제하도록 유도된다. 본 연구에서 AMPK와 ACC의 인산화를 확인한 결과, AMPK 인산화는 농도 의존적으로 증가하였으며, ACC 인산화는 0.2 mg/ml 농도에서 대조군에 비해 유의적인 증가가 나타났다. PPAR- γ 는 지방생성 분화, 포도당 및 지질 대사, 염증 과정을 제어하며 특히 PPAR- γ 의 활성화는 아디포넥틴을 상향 조절하며, 간과 근육의 인슐린 민감성을 개선하여 지방생성과 분화 상태 유지에 필수적인 역할을 한다. CPT-1은 지방산 산화의 속도 제한 효소로 지방산의 β -산화 촉진한다. 본 연구에서 PPAR- γ 은 모든 농도군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 지방산 산화에 관여하는 CPT-1의 단백질 발현은 모든 군에서 대조군보다 증가하는 경향을 나타내었다.

위의 결과를 종합해보면, CA 물 추출물이 높은 항산화능을 보였으며, 3T3-L1 세포에서 지질 축적을 유의하게 억제하였

다. 지방 대사 관련 단백질 확인 결과, AMPK와 ACC의 인산화가 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, CPT-1은 대조군에 비해 증가하는 경향이, PPAR- γ 는 대조군에 비하여 모든 군에서 유의적인 감소가 나타났다. 따라서 CA 물 추출물은 비만 치료 및 예방 등의 소재로 활용할 수 있을 것으로 사료 되며, 자세한 기전 및 효능은 추후 동물실험 등을 통해서 평가되어야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구에서 CA 물 추출물의 항비만을 실험한 결과를 측정 한 결과, 다음의 결과를 얻었다.

1. CA 물 추출물은 0.1 ~ 0.6 mg/ml 이하의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았으며 DPPH free radical 소거능 측정 결과, 양성 대조군인 BHA와 비슷한 경향이 나타났다.
2. Oil-red O 염색 결과, 0.05, 0.1 및 0.2 mg/ml 처리 농도에서 유의하게 80% 이하의 지방세포 분화 억제 및 세포 내 지방의 축적 억제능을 보였다.
3. CA 물 추출물은 세포 내 에너지 항상성 조절인자인 AMPK의 인산화를 모든 농도 처리군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, ACC 인산화는 0.2 mg/ml 농도에서 유의적으로 증가하였다.
4. 지방분화 조절인자인 PPAR- γ 는 대조군에 비하여 모든 군에서 유의적으로 감소하였고, 지방산 산화에 관여하는 CPT-1의 단백질 발현은 모든 군에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다.

따라서 CA 물 추출물은 지방의 분해와 관련된 단백질의 발현을 증가시키고, 지방의 합성과 관련된 단백질의 발현을 감소 시킴으로써 항비만 관련 기능성 소재로 활용될 가능성을 시사한다.

감사의 글

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

References

- Choi MY, Kim SY, Kim MR. Basic research for exploring anti-obesity activity of several medicinal plants from mongolia. *Kor J Herbology*. 2023 ; 38(3) : 1-10.
- Pasichnik EA, Paukshta OL, Nikolaev VG, Tsvetov NS. Extraction of bioactive components from chamaenerion angustifolium (L.) herb growing in kola peninsula using deep eutectic solvents. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2022 ; 981(3) : 032080. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/981/3/032080>.
- Adamczak A, Dreger M, Seidler-Łożykowska K, Wielgus K. Fireweed (L.): botany, phytochemistry and traditional uses. A review. *Herba Polonica*. 2019 ; 65(3) : 51-63. <https://doi.org/10.2478/hepo-2019-0018>.
- Tóth BH, Blazics B, Kéry A. Polyphenol composition and antioxidant capacity of epilobium species. *J Pharm Biomed Anal*. 2009 ; 49(1) : 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.047>.
- kiss AK, Bazylo A, Filipek A, Granica S, Jaszewska E, Kiarszys U, Kosmider A, Piwowarski J. Oenothain b's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of Epilobium sp. *Phytomedicine*. 2011 ; 18(7) : 557-60. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.10.016>.
- Schepetkin IA, Kirpotina LN, Jakiw L, Khlebnikov AI, Blaskovich CL, Jutila MA, Quinn MT. Immunomodulatory activity of oenothain b Isolated from epilobium angustifolium. *J Immunol* . 2009 ; 183 : 6754-66. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901827>.
- Kaškonienė V, Stankevičius M, Drevinskas T, Akuneca I, Kaškonas P, Bimbiraitė-Survilienė K, Maruška A, Ragažinskiene O, Kornysšova O, Briedis V, Ugenskiene R. Evaluation of phytochemical composition of fresh and dried raw material of introduced chamaerion angustifolium L. using chromatographic, spectrophotometric and chemometric techniques. *Phytochemistry*. 2015 ; 115 :184-93. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.005>.
- Heindel JJ, Howard S, Agay-Shay K, Arrebola JP, Audouze K, Babin PJ. Obesity II: Establishing causal links between chemical exposures and obesity. *Biochem Pharmacology*. 2022 ; 199 : 115015. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115015>.
- Camacho S, Ruppel A. Is the calorie concept a real solution to the obesity epidemic?. *Global Health Action*. 2017 ; 10 (1) : 1289650. <https://doi.org/10.1080/16549716.2017.1289650>.
- Kim WI, Youn DH, Kim HG, Na CS. Effect of pear extracts containing herbal medicine(*Lycii Fructus, Coicis Semen, Alimatis Rhizoma and Astragali Radix*) on body weight, lipid metabolism and immuneresponses in rats fed high fat diets (II). *Kor J Herbology*, 2012 ; 27 : 1-7. <https://doi.org/10.6116/kjh.2012.27.3.7>.
- Son JW. Recent advances in anti-obesity drugs. *J Korean Diabetes*. 2022 ; 23(2) : 113-27. <https://doi.org/10.4093/jkd.2022.23.2.113>.
- Srivastava G, Apovian C. Future pharmacotherapy for obesity: new anti-obesity drugs on the horizon. *Curr Obes Rep*. 2018 ; 7 : 147-61. <https://doi.org/10.1007/s13679-018-0300-4>.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*. 1958 ; 181 : 1199-200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J, Chittka T, Mergl R, Kirkby KC, Faßhauer M, Stumvoll M, Holdt LM, Teupser D, Hegerl U, Himmerich H. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. *Plos One*. 2015 ; 10(3) : e0121971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121971>.
- De Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clinical Chemistry*. 2008 ; 54(6) : 945-55. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.100156>.
- Feng S, Reuss L, Wang Y. Potential of natural products in the inhibition of adipogenesis through regulation of PPAR γ expression and/or its transcriptional activity. *Molecules*. 2016 ; 21(10) : 1278. <https://doi.org/10.3390/molecules21101278>.
- Jakab J, Miškić B, Mikšić Š, Juranić B, Čosić V, Schwarz D, Vcev A. Adipogenesis as a potential anti-obesity target: A review of pharmacological treatment and natural products. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021 ; 14 : 67-83. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S281186>.
- Tak YJ, Lee SY. Anti-obesity drugs: long-term efficacy and safety: an updated review. *World J Mens Health*. 2021 ; 39(2) : 208-21.
- Panickar KS. Effects of dietary polyphenols on neuroregulatory factors and pathways that mediate food intake and energy regulation in obesity. *Mol Nutr Food Res*. 2013 ; 57 : 34-47. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200431>.
- Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int J Mol Med Sci*. 2021 ; 22(7) : 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M.

Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes, Anal Biochem, 2012 ; 425 : 88-90. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.005>.

22. Choi HM, Moon SO, Lee HH, Lee HD. Inhibitory effect of by Ojeok-san lipid accumulation in high fat diet-induced obesity mice and 3T3-L1 adipocytes. Kor J Herbology, 2015 ; 30 : 121-8. <https://doi.org/10.6116/kjh.2015.30.4.121>.