



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교육학 석사 학위논문

효소를 이용한 감태분획물의  
항비만 효과



2014년 8월 22일

부경대학교 교육대학원

영양교육전공

김슬영

교육학 석사 학위논문

효소를 이용한 감태분획물의  
항비만 효과

지도교수 남택정

이 논문을 교육학 석사 학위논문으로 제출함.

2014년 8월 22일

부경대학교 교육대학원

영양교육전공

김슬영

김슬영의 교육학석사 학위논문을  
인준함.

2014년 8월 22일



주 심 약학박사 최 재 수 (인)

위 원 이학박사 류 은 순 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (인)

# 목 차

LIST OF FIGURES .....	iii
ABBREVIATIONS .....	iv
ABSTRACT .....	v
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
1. 실험 재료 .....	
1) 시약 및 재료 .....	4
2. 실험방법 .....	5
1) 효소를 이용한 감태분획물 (EEc)의 제조 .....	5
2) 세포실험 .....	5
① 3T3-L1 preadipocyte 배양 및 MTS assay .....	5
② 세포 내 glucose 및 triglyceride 함량 .....	6
③ Oil red O 염색 .....	7
④ Western blot 분석 .....	7
3) 동물실험 .....	8
① 실험동물의 사육 및 식이조성 .....	8
② 실험동물의 혈액 및 장기 회수 .....	11
③ 체중변화, 식이섭취량 측정 및 식이효율 계산 .....	11
④ 혈청 지질 함량 측정 .....	11
⑤ 혈청 glucose 및 leptin 농도 측정 .....	12
⑥ 혈청 중의 GOT, GPT 측정 .....	12
⑦ 간 조직 내 triglyceride 함량 측정 .....	12
⑧ Western blot analysis .....	13
4) 통계학적 처리 .....	13
III. 결과 및 고찰 .....	15
1. 세포실험 결과 .....	15

1) 3T3-L1 preadipocyte의 세포생존율 .....	15
2) 세포 내 glucose 함량의 변화 .....	17
3) 세포 내 triglyceride 함량의 변화 .....	19
4) Lipid droplet 생성에 미치는 영향 .....	21
5) 세포 수준에서 adipogenesis 저해활성 .....	23
3. 동물실험 결과 .....	25
1) 체중변화, 식이섭취량 및 식이효율 .....	25
2) 장기 및 주변지방량의 변화 .....	28
3) 혈청 지질의 변화 .....	30
4) 혈청 glucose 및 leptin 농도의 변화 .....	32
5) 혈청 중의 GOT, GPT 활성 변화 .....	36
6) 간 조직 내 triglyceride 함량의 변화 .....	38
7) 간 조직에서 adipogenesis 저해활성 .....	40
IV. 결론 및 요약 .....	42
V. 참고 문헌 .....	45



## LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Cell viability of 3T3-L1 preadipocytes.  
(A) Cell viability of 3T3-L1 preadipocytes for 24hr.  
(B) Cell viability of 3T3-L1 preadipocytes for 48hr.
- Fig. 2. Effects of EEc on intracellular glucose in 3T3-L1 adipocytes.
- Fig. 3. Effects of EEc on intracellular glucose in 3T3-L1 adipocytes.
- Fig. 4. Effects of EEc on Oil red O stained material in 3T3-L1 adipocytes.
- Fig. 5. Effects of EEc on C/EBPs protein expression in differentiated 3T3-L1 adipocytes.
- Fig. 6. Change in body weights of mice during 9 weeks.
- Fig. 7. Effects of EEc on glucose in serum.
- Fig. 8. Effects of EEc on leptin in serum.
- Fig. 9. Effects of EEc on GOT and GPT activities in serum.  
(A) Effects of EEc on GOT activities.  
(B) Effects of EEc on GPT activities.
- Fig. 10. Effects of EEc on triglyceride in liver tissue.
- Fig. 11. Effects of EEc on C/EBPs protein expression in liver tissue.

## ABBREVIATIONS

BCA : bicinchoninic acid

BSA : bovin serum albumin

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

FBS : fetal bovine serum

kDa : kilodalton

MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PBS : phosphate-buffered saline

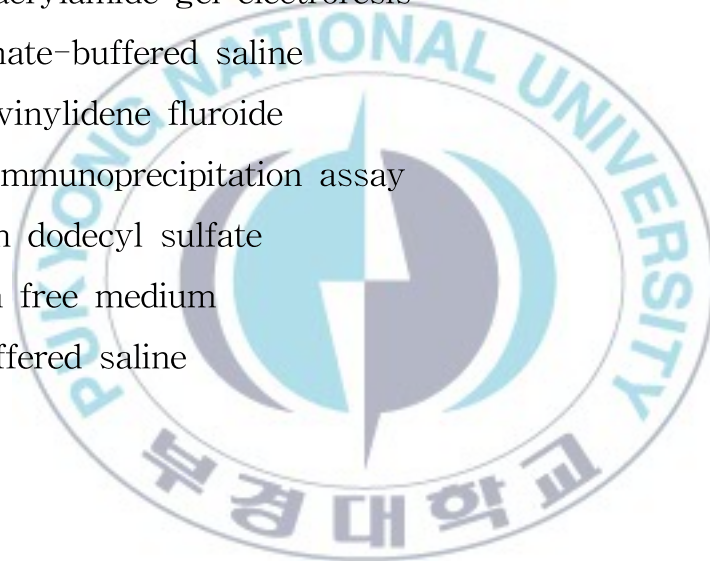
PVDF : Polyvinylidene fluoride

RIPA : radioimmunoprecipitation assay

SDS : sodium dodecyl sulfate

SFM : serum free medium

TBS : tri buffered saline



The effects of the enzyme-treated *Ecklonia cava* extracts on anti-obesity

Seul-Young Kim

*Graduate School of Education*

*Pukyong National University*

## Abstract

Obesity is a worldwide problem that contributes to serious diseases including diabetes, hypertension and atherosclerosis. Recently, much research is conducted about functional natural materials and their anti-obesity activity. This study investigated the effects of the enzyme-treated *Ecklonia cava* extracts (EEc) on 3T3-L1 preadipocytes and mice fed high fat diet.

In vitro, EEc in order to observe effect of inhibiting adipogenesis, EEc were treated with different concentrations (12.5 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml) on induced differentiation of 3T3-L1 cells. The results of MTS assay were not observed that cell viability reduced on any concentrations of EEc treatment. The levels of glucose in differentiated 3T3-L1 cells were lowest in the group treated with a concentration of 200 µg/ml EEc. Triglyceride accumulations and lipid droplets were decreased in a dose-dependent manner. In addition, EEc reduced the C/EBPs transcriptional activity significantly in 3T3-L1 cells.

In vivo, to test anti-obese effect of diet containing EEc, C57BL/6NTac mice were divided into six groups : Normal diet group (ND), High fat diet group (HFD), High fat with Garcinia extract diet group (GHD), High fat with EEc diet group (EHD250, EHD500, EHD1000), and all groups were fed with each diet for 9 weeks. After the end of all feeding, factors relevant to lipid metabolism which body weight, lipid patterns, concentration of glucose and

leptin in serum were determined, also GOT, GPT were measured, and protein expression in liver tissue were determined by western blot analysis. Body weight was significantly increased in HFD group compared to EHD groups, and the weights of liver, perirenal fat and epididymal fat corresponded to the increase in body weight. The levels of triglyceride, total cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol in blood serum were lower in the EHD1000 group compared to the HFD group. Glucose and leptin concentrations were lowest in the EHD1000 group. The levels of GOT and GPT in the EHD1000 group were lower than in the HFD group and C/EBPs expressions were decreased in a dose-dependent manner. These results demonstrate that EEc significantly inhibit adipogenesis and can be used for the regulation of obesity.



## I. 서론

인간은 에너지를 섭취하고 소모하는 일련의 활동들을 통해서 생명을 유지하며, 이러한 에너지의 섭취와 소비는 우리 몸의 다양한 조절기구들에 의해 균형적으로 이루어진다. 식욕은 에너지 섭취의 가장 중요한 요소이며, 과도하게 섭취된 에너지는 체내 지방조직을 형성하고 과잉에너지를 저장한다 (Park, 2005). 그동안 지방조직은 단순히 중성지방을 저장하고 영양이 부족할 때 다른 조직이나 기관에 에너지를 공급하는 수동적인 기능만 한다고 여겨져 왔다 (Gesta et al., 2007). 하지만 최근 연구들을 통해 지방조직은 여러 신호전달 물질과 호르몬을 생산하고 분비함으로써 지질대사, 면역기능, 염증반응, 생식기능 등 중요한 역할을 하는 내분비기관임이 밝혀졌다 (Ahima and Flier, 2000). 지방세포의 분화과정은 다양한 전사인자들의 상호작용을 통하여 매우 복잡하게 이루어진다 (Lee et al., 2012). 그 중에서도 C/EBPs, ADD1/SREBP1c, PPAR $\gamma$ 가 가장 중요한 adipogenic transcription factor로 작용한다 (Park, 2005). 이러한 전사인자들은 지방세포 분화과정의 각기 다른 시점에서 발현되며, 서로 상호작용을 통하여 지질대사를 활성화 시키고 지방세포의 분화를 유도한다 (Morrison and Farmer, 2000; Rosen and Macdougald, 2006). 지방세포는 단순히 지방 축적 역할 뿐만 아니라 adipokine이라는 신호전달물질을 분비하여 면역이나 염증반응에도 관여하는 것으로 알려져 있다 (Park, 2005). 대표적인 adipokine으로는 leptin, Acrp30, TNF- $\alpha$ , resistin 등이 있으며, 인슐린저항성, 제2형 당뇨병, 동맥경화증과 같은 대사성 질환과 밀접한 연관이 있다고 보고되고 있다 (Kown et al., 2003).

비만은 지방세포의 과다한 분화와 에너지의 불균형적인 과잉 공급에 의해 유발되며 (Ordovas and Moose, 2004), 현재 세계적으로 급격하게 증가하고 있는 질병 중 하나이다 (Jang and Choi, 2003; Visscher and Seidell, 2001). 특히, 비만은 고혈압, 고지혈증, 당뇨병 등 만성 질환의 위험인자로 알려져 있기 때문에 비만치료에 대한 많은 연구들이 진행되고

있다 (Jung et al., 2011; Lee, 2010; Shin and Han, 2006). 현재 비만치료는 식사요법, 운동, 수술 및 약물 치료 등 여러 가지 방법으로 이루어지고 있으며 (Lee et al., 2007), 그 중 약물치료에는 중추성 식욕억제제와 소화흡수제인 Fenfluramine, Sibutramine, Orlistat (Xenical) 등이 사용되고 있다 (Ko, 2004). 하지만 이 약물들은 불면증, 메스꺼움, 두통, 발진 등 부작용을 동반하고 있기 때문에 항비만 효능을 가진 천연물질의 개발 및 연구가 필요하다 (Lee et al., 2007). 비만치료 약리활성을 가진 천연물에 대한 기존 연구들은 주로 육상식물을 대상으로 이루어져 왔으며 (Jung et al., 2011), 최근 해조류의 생리활성 물질들이 알려지면서 해양식물에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다 (Joo et al., 2003). 해조류는 일반적으로 열량이 낮고 소량의 단백질과 당질, 다양한 미네랄과 비타민이 풍부하며, 특히 채소에 비해 불포화지방산과 필수아미노산의 함량이 더 높은 것으로 알려져 있다 (Choi et al., 2006). 특히 해조류에 풍부한 알긴산, 푸칸설페이트, 라미나란 등 수용성 다당류의 항당뇨, 항응고, 항염증, 항종양 등 다양한 생리활성 기능들이 알려지면서 새로운 자원으로 주목 받고 있다 (Lee et al., 2012).

본 연구에 사용된 감태 (*Ecklonia cava*)는 주로 우리나라 제주도 연안에 많이 서식하고 있는 다시마목 (*Laminariales*) 미역과 (*Alariaceae*)의 다년생 해조류로서 (Wi et al., 2008), 전복이나 소라의 먹이로 많이 이용되었다 (Sim, 2003). 감태는 항염증 (Shin et al., 2006), 고혈압 억제효과 (Hong et al., 2006), tyrosinase 저해활성 (Yoon et al., 2009) 및 갱년기 증상완화 (Kang and Kim, 2009) 등의 효능을 가진 것으로 보고되었고, 최근에는 감태에 있는 phlorotannin의 다양한 polyphenol 성분들에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다 (Shin, 2011). 감태의 항비만 효과에 관한 기존 연구들을 살펴보면, 감태의 에탄올 추출물은 Lipase 저해활성을 나타낸다고 보고되었고 (Jung et al., 2011), 감태의 polyphenol 추출물인 seanol (sea polyphenol)은 지질대사 및 당대사에 효과가 있다고 보고되고 있다 (Kwon, 2013). 본 연구에서는 유효성분의 분리 및 정제를 위하여 소

화효소인 Rapidase press L과 Rohament CL을 감태에 작용시켜 얻은 분획물을 재료로 하여 지방세포와 동물실험을 통하여 지방세포 분화 억제와 관련된 전사인자들을 검토함으로써 비만 억제 효과를 검토하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 시약 및 재료

본 연구에 사용된 Garcinia추출물 및 감태효소분획물 (EEc)은 주영엔에스(주) (Juyeong NS, Korea)에서 제조한 것을 사용하였으며, -70 °C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 3T3-L1 preadipocyte (CL-173)는 미국세포주은행 (American Type Culture Collection, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에 사용한 Fetal bovin serum (FBS)은 Gibco (Life Technologies, Gibco BRL, USA) 제품을 사용하였고 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Sigma (Sigma Chemical Co., USA) 제품을 사용하였다. 세포 배양 시 분화유도인자로 사용된 methylisobutylxanthine (I-5879), dexamethasone (D-4902), insulin (I-5523)은 Sigma (Sigma Aldrich, USA)에서 구입하였고, 세포생존을 측정을 위하여 MTS/PMS solution (Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit)을 Promega에서 구입하여 사용하였다. Glucose 함량 및 triglyceride 함량의 변화를 측정하기 위해 Glucose 측정 kit (AM 201-K)와 TG 측정 kit (AM 157S-K)를 아산제약 (Asan Pharm, Korea)에서 구입하였다.

동물실험에서 부검을 위한 동물마취제로 zoletil (Virbac, France)과 rompun (Bayer, Germany)을 이용하였고, 혈청 중의 leptin 농도 측정을 위하여 Leptin ELISA kit (ADI-900-019A)를 Enzo (Enzo Life sciences, Switzerland)에서 구입하였다.

Western blot analysis에서 세포 및 간 조직의 단백질 농도는 BCA protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, USA)를 사용하여 측정하였고, protein standard marker는 dual color marker (BIO-RAD, USA)를 사용

하였다. Antibody는 Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, USA) 제품을 이용하였다. Detection reagent로 Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution과 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution (Pierce Biotechnology, USA)을 이용하여 Kodak film (Eastman Kodak, USA)에 감광하였다. 현상에 사용된 현상액은 Kodak (Eastman Kodak, USA) 제품을 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 효소를 이용한 감태분획물 (EEc)의 제조

분말상태의 감태에 pH 4.5로 조정된 증류수를 혼합하고 Rapidase press L 및 Rohament CL 두 효소를 첨가하여 50 °C에서 24시간 동안 반응시켰다. 이후 반응액을 3,000 rpm, 4 °C에서 20분간 원심분리 하였고 상층액을 회수하여 여과 및 농축 후 분무, 건조하여 감태효소분획물 (EEc)로 제조하여 본 연구의 시료로 사용하였다.

### 2) 세포실험

#### ① 3T3-L1 preadipocyte 배양 및 MTS assay

3T3-L1 preadipocyte를 10 % Fetal Bovine Serum (FBS)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 이용하여 배양하였다. 3T3-L1 cell이 postconfluent되면 10 % FBS-DMEM 배지에 분화 유도인자인 MDI (0.5 mM Methylisobutylxanthine, 0.25  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin)를 첨가하여 초기분화를 유도하였다. 분화유도 2일, 4일, 6일째에는 Human Recombinant, Zinc solution 5 ml을 증류수에 희석하고 10  $\mu$ g/ml 농도의 insulin을 첨가하여 지방세포로 분화

를 유도하였다.

MTS assay를 이용하여 EEc가 세포생존율에 미치는 영향을 알아보았다. 96-well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well의 농도로 3T3-L1 cell을 seeding하고 24시간 배양한 후 serum-free medium (SFM)을 4시간 처리하였다. Garcinia추출물 200  $\mu\text{g/ml}$ , EEc 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각각 처리한 다음, 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 plate에서 배지를 제거하고, phenol-red free DMEM에 MTS/PMS solution을 첨가하여 30분 동안 반응시킨 후에 분광광도계 (Ultraspec 2001 pro. Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## ② 세포 내 Glucose 및 Triglyceride 함량

세포 내 glucose 유입량을 확인하기 위하여 분화된 3T3-L1 cell에 SFM을 4시간 처리한 후 Garcinia추출물 200  $\mu\text{g/ml}$  및 EEc 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 처리하였다. 반응이 종료된 세포의 배지를 원심분리한 후에 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액 10  $\mu\text{l}$ 에 glucose assay reagent 1.5 ml을 첨가하여 혼합한 뒤에 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시킨 후 500 nm 흡광도에서 측정하였다.

EEc 처리에 따른 triglyceride의 함량변화를 측정하기 위하여 6-well plate에 3T3-L1 cell을 seeding하고 80 % confluent되면 MDI (0.5 mM Methylisobutylxanthine, 0.25  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 10  $\mu\text{g/ml}$  insulin)를 처리하여 분화를 유도한 후 SFM을 4시간 처리하였다. 여기에 Garcinia추출물을 200  $\mu\text{g/ml}$ , EEc를 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 처리하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고 ice-cold PBS를 1 ml 첨가한 뒤에 30초간 초음파 분쇄하여 세포막 안의 내용물이 용출되도록 하였다. 이후, cell lysate 40  $\mu\text{l}$ 에 TG assay reagent 1.5 ml을 첨가하여 혼합한 뒤에 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 반응시킨 후 550 nm 흡광도에서 측정하였다.

### ③ Oil red O 염색

분화된 3T3-L1 cell을 Oil Red O 염색을 이용하여 지방축적량을 관찰하였다. 6-well plate에 3T3-L1 cell seeding하고 80 % confluent되면 MDI (0.5 mM Methylisobutylxanthine, 0.25  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin)를 처리하여 분화를 유도한 후 SFM을 4시간 처리하였다. 여기에 Garcinia추출물 200  $\mu$ g/ml와 EEc 12.5  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml의 농도로 24시간 처리하고, PBS로 두 번 세척 후 10 % (v/v) formalin을 첨가하여 20분간 방치하였다. 다시 10 % formalin을 첨가하여 1시간 방치하여 세포를 고정시킨 후 Oil Red O 염색시약 (0.5 g Oil Red O, 60 ml isopropanol, 40 ml distilled water)을 첨가하여 3시간 염색하고 distilled water로 세척하였다. 지방구가 염색된 세포를 현미경 상에서 사진 촬영하였다. ( $\times 200$ )

### ④ Western blot 분석

6-well plate에 3T3-L1 cell를 seeding하고 80 % confluent되면 MDI (0.5 mM Methylisobutylxanthine, 0.25  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin)를 처리하여 분화를 유도한 후 SFM을 4시간 처리하였다. 여기에 Garcinia추출물 200  $\mu$ g/ml, EEc 12.5  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml의 농도로 24시간 처리하고, PBS로 2회 세척한 후 lysis buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, 100  $\mu$ M sodium orthovanadate, 100  $\mu$ M ammonium molybdate, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 10 % glycerol, 0.1 % NP-40, 0.1 % SDS, phosphate inhibitor, protease inhibitor)를 첨가하여 세포를 회수하였다. 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 dual color marker를 표준분자량으로 사용하여 전기 영동한 후 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore Co., USA)으

로 transfer 하였다. 단백질이 전이된 PVDF membrane을 1 % BSA/TBS-T로 1시간 30분간 blocking하고, 1차 antibody를 10 °C에서 16 시간 동안 반응시킨 후 2차 antibody와 chemiluminescent sensitive HRP 를 순차적으로 붙여 KODAK X-ray film으로 현상하였다.

### 3) 동물실험

#### ① 실험동물의 사육 및 식이조성

본 연구에 사용한 실험동물은 부경대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다. 생후 4주령 C57BL/6NTac 수컷 mouse ( $16.7 \pm 1.73$  g)를 (주)샘타코 (Samtako Bio Korea, Korea)에서 구입하였다. 7일간 고품사료로 예비사육기간을 거친 후 난괴법 (randomized block design)에 따라 각 군의 평균 체중이 비슷하도록 정상식이군 (ND), 고지방식이군 (HFD), Garcinia 고지방혼합식이군 (GHD), 감태효소분획물 (EEc) 고지방 혼합식이군 (EHD250, EHD500, EHD1000)으로 나누어 9주간 사육하였다. 실험식은 AIN-76 semipurified diet를 기본 사료로 사용하였으며, 비만을 유도하기 위하여 지방함량을 총 열량의 37 % 수준으로 증가시키고, 지질급원으로 lard와 corn oil을 사용하였다. 사육기간 동안 식이는 1일 1회 섭취하도록 하며 물은 자유 급이하였다. 실험사육실의 온도는  $23 \pm 2$  °C, 습도  $50 \pm 5$  %, 12시간 light-dark cycle로 조절하였다. 실험군의 분류 및 식이의 조성은 Table 1, 2와 같다.

Table 1. Manufacture of experimental diets.

Group	Diet
ND (n=10)	Nomal diet group
HFD (n=10)	High fat diet group
GHD (n=10)	High fat diet + Garcinia 250mg/kg/day
EHD250 (n=10)	High fat diet + EEc 250mg/kg/day
EHD500 (n=10)	High fat diet + EEc 500mg/kg/day
EHD1000 (n=10)	High fat diet + EEc 1000mg/kg/day



**Table 2. The composition of experimental diets.**

(g/kg diet)

Ingredients <sup>1)</sup>	ND	HFD	GHD	EHD250	EHD500	EHD1000
casein	200	169.60	169.60	169.60	169.40	169.60
DL-methionine	3	2.54	2.54	2.54	2.54	2.54
sucrose	500	424.00	424.00	424.00	423.50	423.50
corn starch	150	127.20	127.20	127.20	127.05	127.05
cellulose	50	42.40	42.40	42.40	42.35	42.35
corn oil	50	42.40	42.40	42.40	42.35	42.35
mineral mix	35	29.68	29.68	29.68	29.65	29.65
vitamin mix	10	8.48	8.48	8.48	8.47	8.47
choline bitartate	2	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70
lard		144.16	144.16	144.16	143.99	143.99
cholesterol		8.48	8.48	8.48	8.47	8.47
sample			2.50	2.50	5.00	10.00
total (g)	1000	1000.64	1000.90	1000.90	1000.00	1000.05
calorie	3850	4562.24	4562.24	4562.24	4556.86	4556.86
fat	450	1679.04	1679.04	1679.04	1677.06	1677.06
fat (% calorie)	11.7	36.80	36.80	36.80	36.80	36.80

<sup>1)</sup> The diets compositions were based on AIN-76.

## ② 실험동물의 혈액 및 장기 회수

실험동물의 혈액은 실험 종료 전 24시간 절식시킨 다음 zoletil (Virbac, France)과 rompun (Bayer, Germany)으로 마취한 후 복강대정맥에서 heparin 처리된 주사기로 채혈하였다. 채혈된 혈액은 2,500 rpm에서 20분간 원심분리한 다음 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다. 간, 신장, 부고환 및 주변지방은 적출하여 생리 심염수에 세척하고 여과지로 수분을 제거한 후 중량을 측정하였으며, 혈청 및 장기는 분석 직전까지 70 °C deep freezer에 보관하였다.

## ③ 체중변화, 식이섭취량 측정 및 식이효율 계산

실험동물의 급이는 1일 1회 매일 일정한 시간에 규칙적으로 이루어졌으며, 다음 날 같은 시간에 잔량을 조사하여 1일 식이섭취량을 기록하였다. 체중은 7일에 1회 일정한 시간에 측정하였으며, 예비사육 직후의 체중을 초기 (initial) 체중으로 하고 9주 후의 체중을 마지막 (final) 체중을 하여 체중증가량을 계산하였다. 식이효율 (food efficiency ratio, FER)은 체중증가량을 9주간의 총 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

$$\text{Food efficiency ratio} = \text{Body weight gain (g)} / \text{Food intake (g)}$$

## ④ 혈청 지질 함량 측정

EEc섭취에 따른 혈청 중 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol의 변화를 혈액생화학측정기 (Thermo fisher Scientific, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈청 triglyceride 함량은 TG 측정 kit (Asan Pharm, Korea)를 이용하였다. 효소시액 3 ml을 기준으로 표준액을 이용하여 정량선을 확인한 후 혈청 20 ul을 혼합하여 37 °C incubator에

서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### ⑤ 혈청 Glucose 함량 및 Leptin 농도 측정

효소법 (5분법)으로 혈청 중 glucose의 농도를 측정하였다. 효소시액 3 ml을 기준으로 표준액을 통해 정량선을 작성한 후 혈청 20 ul을 혼합하여 37 °C incubator에서 5분간 반응시킨 다음 분광광도계 (Ultraspec 2001 pro. Amersham Phamacia Biotech, UK)로 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. Leptin ELISA kit (Enzo Life sciences, Switzerland)를 이용하여 혈청 leptin농도를 측정하였다. Assay buffer 100ul 기준으로 표준액을 이용하여 정량선을 확인한 후 혈청 100 ul을 혼합하여 실온에서 1시간동안 shaking하여 반응시킨 다음 PBS용액으로 3회 반복하여 washing 하였다. 이어서 100 ul씩 blue conjugate 분주하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS용액으로 3회 반복하여 washing 하였다. TMB substrate solution 100 ul를 분주하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 100 ul 씩 stop solution 을 취하여 450 nm에서 증류수를 대조군으로 흡광도를 측정하였다.

#### ⑥ 혈청 중의 GOT, GPT 측정

EEc 섭취에 의한 간 손상 정도를 측정하기 위해 혈액생화학측정기 (Thermo fisher Scientific, USA)를 이용하여 혈청 중 Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 의 농도를 측정하였다.

#### ⑧ 간 조직의 Triglyceride 함량 측정

간 조직을 세절하여 PBS buffer에 넣고 균질화한 다음 12,000 rpm, 4

℃에서 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 효소시액 3 ml을 기준으로 표준액을 이용하여 정량선을 확인한 후 상층액 20 ul을 혼합하여 37 ℃ incubator에서 10분간 반응시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### ⑨ Western blot 분석

간 조직을 RIPA buffer (1 % NP-40, 0.25 % sodium deoxycholate, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)에 homogenizer를 이용하여 마쇄한 후 12,000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. BCA protein Assay kit (Pierce Biotechnology, USA)로 단백질 농도를 측정하여 20 ug/lane의 동일한 양을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 전기영동으로 분리한 다음 dual color marker를 표준분자량으로 사용하여 Polyvinylidene fluoroide (PVDF) membrane (Millipore Co., USA)으로 transfer 하였다. 단백질이 전이된 PVDF membrane을 1 % BSA/TBS-T로 실온에서 1시간 30분 동안 blocking 시킨 후 1차 antibody를 1 : 1,000으로 희석하여 4 ℃에서 18시간 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane을 TBS-T 용액으로 15분간 2회 washing한 다음 2차 antibody를 1 : 10,000 비율로 희석하여 40분간 반응시키고, 다시 TBS-T 용액으로 10분간 3회 반복하여 washing하였다. Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution과 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution (Pierce Biotechnology, USA)을 사용하여 KODAK X-ray film에 감광시킨 후 단백질 발현을 확인하였다.

#### 4) 통계학적 처리

모든 실험결과는 각 군별의 평균과 표준편차 (mean ± S.D.)로 나타내었으며, 각 실험군 간의 유의성은 SPSS ver. 18.0 프로그램을 사용하여

통계처리 하였다. 각 군에 대한 유의성 검증은 ANOVA test와 Duncan's multiple range test를  $p < 0.05$  수준에서 분석하였다.



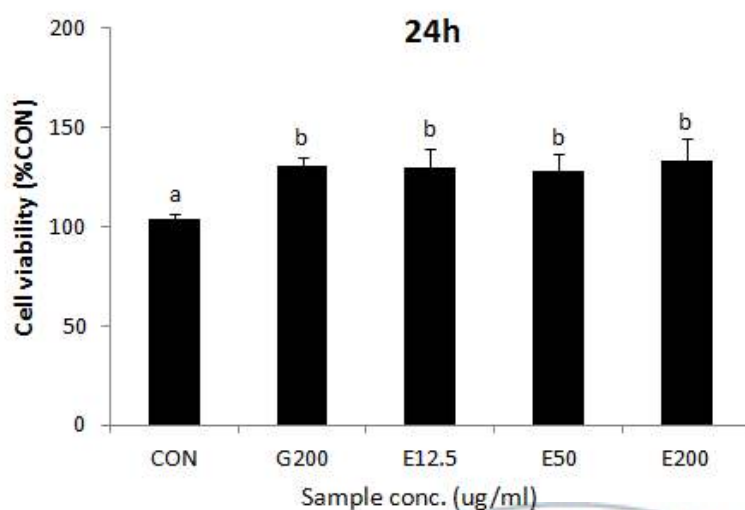
### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 세포실험 결과

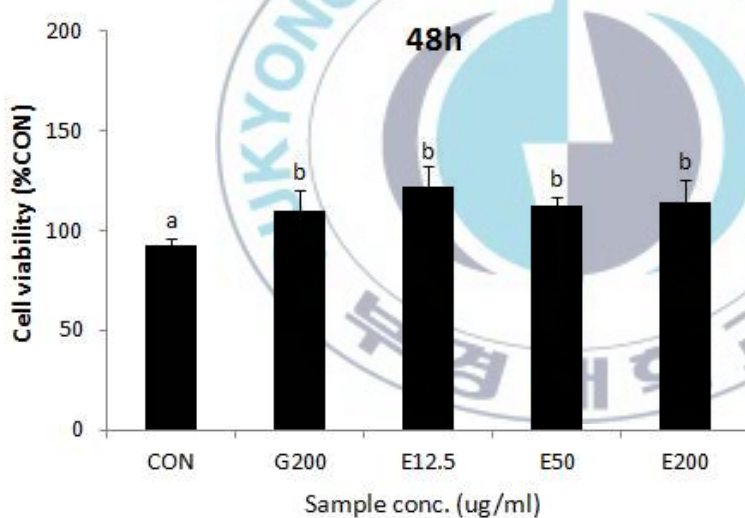
##### 1) 3T3-L1 preadipocyte의 세포생존율

EEc 처리에 따른 3T3-L1 preadipocyte에서 세포증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아본 결과는 Fig. 1과 같다. Garcinia추출물 200  $\mu\text{g/ml}$  및 EEc 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 및 48시간 처리한 후 세포 생존율을 측정된 결과, 모든 시험물질 처리군에서 대조군에 비교했을 때 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 측정되었다. Positive 대조군인 Garcinia추출물 처리군 (G200)과 EEc 최고 농도군인 E200군에서도 생존율의 감소가 관찰되지 않았고, 24시간 및 48시간 처리조건에서도 세포생존율에 대한 유의적인 감소가 관찰되지 않았다. 이러한 실험결과를 바탕으로 EEc 처리농도는 세포생존율에 영향을 미치지 않는 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 최고 농도로 설정하고 24시간을 본 실험의 기준 배양 시간으로 설정하여 EEc의 기능성을 검증하였다.

(A)



(B)



**Fig. 1. Cell viability of 3T3-L1 preadipocytes.**

3T3-L1 cells were treated with EEC in various concentrations (12.5 ug/ml, 50 ug/ml, 200 ug/ml) for 24hr (A) and 48hr (B).

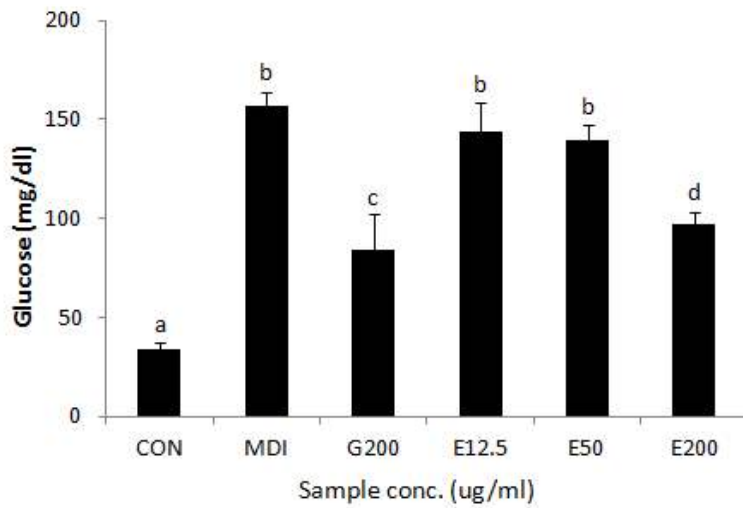
Cell viability was measured by MTS assay.

Values are mean  $\pm$  SD.

Within each column, values with different superscripts are significantly from each other ( $p < 0.05$ ), as determined by Duncan's multiple range test.

## 2) 세포 내 Glucose 함량의 변화

EEc가 세포 내 glucose 함량에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. EEc를 처리함으로써 세포 배양액 중의 물질들이 세포 내로의 이동을 억제할 것으로 추측하였다. 본 실험결과 MDI (0.5 mM Methylisobutylxanthine, 0.25  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin)만 처리한 군 (MDI)은 insulin으로 인하여 세포 내로 glucose의 유입이 증가하였다. 반면, Garcinia추출물 200  $\mu$ g/ml 농도 처리군 및 EEc 200  $\mu$ g/ml 농도 처리군은 세포 내 glucose의 유입이 저해되었다 (Fig. 2). 3T3-L1 지방세포에 insulin을 처리하면 세포막에 insulin이 결합하여 PI3 kinase 신호전달체계를 활성화시키고, Akt와 AMPK를 활성화시킨다 (Saltiel and Kahn, 2001). 그 결과 GLUT-4가 세포막으로 translocation되어 glucose의 세포 내 유입을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Ko et al., 2007). 본 실험 결과 insulin이 존재하는 조건하에서 EEc 처리에 의해 glucose의 세포 내 유입이 억제됨을 확인하였고, EEc가 지방세포의 에너지를 차단함으로써 지방세포 생성 억제 효과를 나타낼 것으로 사료된다.



**Fig. 2. Effects of EEc on intracellular glucose in 3T3-L1 adipocytes.**

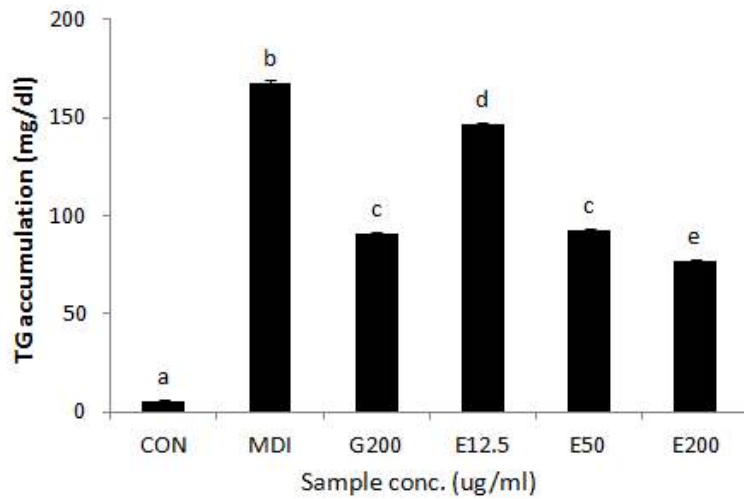
3T3-L1 cells were treated with EEc in various concentrations (12.5 ug/ml, 50 ug/ml, 200 ug/ml).

Values are mean  $\pm$  SD.

Within each column, values with different superscripts are significantly from each other ( $p < 0.05$ ), as determined by Duncan's multiple range test.

### 3) 세포 내 Triglyceride 함량의 변화

Triglyceride는 glucose와 함께 지방세포의 주요 에너지원으로 알려져 있으며, 여분의 triglyceride는 지방세포에 흡수, 저장됨으로써 비만을 일으킨다 (Hafiz et al., 2004; Labreuche et al., 2009). EEc의 triglyceride 합성 저해 효과를 확인하기 위하여 3T3-L1 preadipocyte에 Garcinia추출물 및 EEc를 처리한 결과 (Fig. 3), MDI (0.5 mM Methylisobutylxanthine, 0.25  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin)를 처리한 군 (MDI)은 triglyceride의 축적량이 유의적으로 증가한 반면, Garcinia추출물 처리군 (G200)과 EEc 처리군 (E12.5, E50, E200)에서는 농도 의존적인 감소경향을 확인할 수 있다. 특히 E200군의 triglyceride의 축적량이 positive대조군인 G200군 보다 감소하는 것으로 나타났으며, EEc는 세포 내 glucose 유입량을 감소시키고 (Fig.2) triglyceride의 축적을 저해하는 것으로 볼 수 있다.



**Fig. 3. Effects of EEC on intracellular glucose in 3T3-L1 adipocytes.**

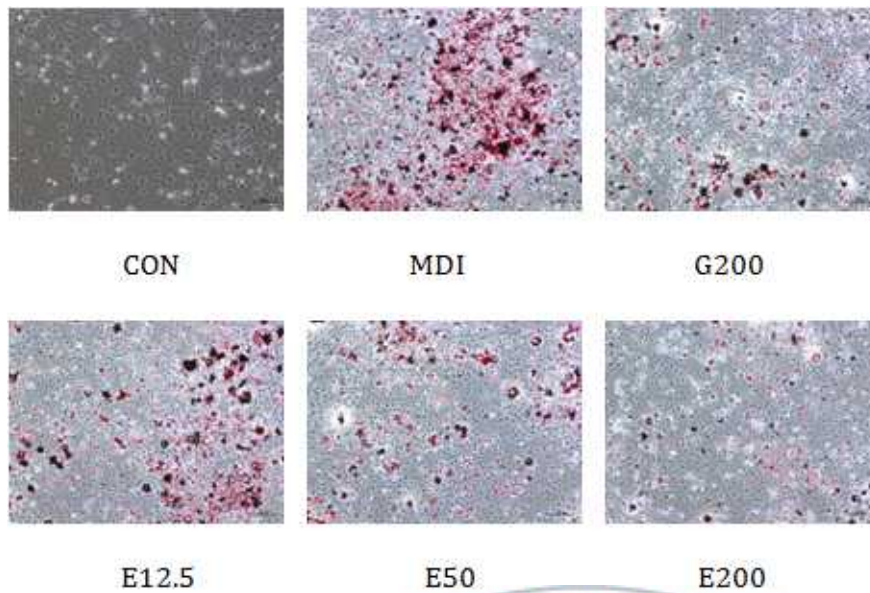
3T3-L1 cells were treated with EEC in various concentrations (12.5 ug/ml, 50 ug/ml, 200 ug/ml).

Values are mean  $\pm$  SD.

Within each column, values with different superscripts are significantly from each other ( $p < 0.05$ ), as determined by Duncan's multiple range test.

#### 4) Lipid droplet 생성에 미치는 영향

분화를 유도한 3T3-L1 지방세포에 EEc를 처리하였을 때, lipid droplet 생성의 변화를 Oil red O 염색을 통해 관찰하고자 하였다 (Fig. 4). Lipid droplet은 triglyceride로 구성된 비활성 소낭으로, precursor fibroblast에서 지방세포로 분화하는 과정에서 나타난다 (Park et al., 2011). 이는 adipogenic transcription factor들에 의해 조절되며, lipid droplet은 LPL에 의한 triglyceride 유입과 adipose triglyceride lipase (ATGL) 및 hormone sensitive lipase (HSL) 의한 triglyceride 유출에 의해 조절된다고 알려져 있다 (Ahmadian et al. 2010 : Zimmermann et al., 2004). 본 실험 결과, MDI (0.5 mM Methylisobutylxanthine, 0.25  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin)를 처리한 군 (MDI)에 비하여 Garcinia추출물 처리군 (G200)과 EEc 처리군 (E12.5, E50, E200)에서 lipid droplet 형성이 농도 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다. 또 EEc 처리군 (E12.5, E50, E200)의 경우 lipid droplet의 크기 및 개수가 농도 의존적으로 크게 감소하는 경향을 보였으며, 특히 E200군은 positive 대조군인 G200보다 lipid droplet의 형성 억제 효과가 큰 것으로 나타났다. 따라서 EEc가 3T3-L1 지방세포 분화유도 과정에 효과를 나타내어 농도 의존적으로 지방량이 축적되는 정도를 유의하게 감소시킨다는 것을 확인하였다.



**Fig. 4. Effects of EEc on Oil red O stained material in 3T3-L1 adipocytes.**

3T3-L1 cells were treated with EEc in various concentrations (12.5 ug/ml, 50 ug/ml, 200  $\mu$ g/ml).

Lipid droplet formation in mature adipocytes were observed ( $\times$  200).

## 5) 세포 수준에서 adipogenesis 저해활성 (Western blot)

지방세포의 분화에는 많은 종류의 adipogenic transcription factor들이 단계적으로 관여한다. 이러한 transcription factor들은 지방세포 분화 과정 중 서로 다른 시기에 각기 발현이 유도되며, 서로 상호작용을 통하여 특이유전자들의 발현을 조절하고 지방세포의 분화를 유도한다 (조혜진 등., 2002). 지방세포의 분화에서 가장 중요한 조절인자로 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBPs), adipocyte determination and differentiation dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c (ADD1/SREBP1c), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )가 있으며 (Morrison and Farmer, 2000; Rosen and Macdougald. 2006), 본 연구에서는 EEc에 의한 C/EBPs의 발현 정도를 확인하고자 하였다. EEc를 12.5 ug/ml, 50 ug/ml, 200  $\mu$ g/ml의 농도로 3T3-L1 preadipocyte에 처리하고 분화를 유도하여 C/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ 의 발현을 확인한 결과, EEc 처리농도에 따라 세 가지 transcription factor 모두 발현이 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 이는 EEc가 3T3-L1 peradipocyte에서 C/EBPs의 발현을 억제함으로써 세포 내 triglyceride의 생성을 감소시키고 지방세포로의 분화를 억제시킬 것으로 사료된다.

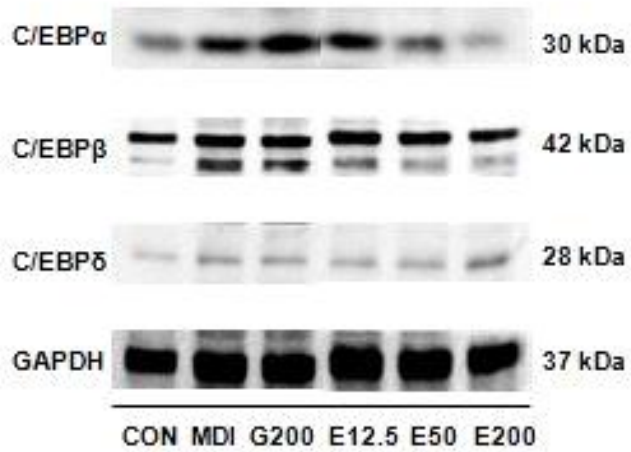


Fig. 5. Effects of EEc on C/EBPs protein expression in differentiated 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were treated with EEc in various concentrations (12.5 ug/ml, 50 ug/ml, 200 ug/ml).

C/EBPs protein expression were determined by Western blot analysis.

## 2. 동물실험 결과

### 1) 체중변화, 식이섭취량 및 식이효율

9주간 실험 식이를 섭취하는 동안의 체중변화와 식이섭취량 및 식이효율 (FER)을 관찰한 결과는 Fig. 6과 Table 3에 나타내었다. 고지방식이군 (HFD)의 체중증가량이  $15.51 \pm 1.86$  g으로 정상식이군 (ND)과 positive 대조군인 Garcinia추출물식이군 (GHD)에 비하여 유의적으로 증가하였으며, EEC식이군 (EHD250, EHD500, EHD1000)은 고지방식이군 (HFD)에 비하여 유의적으로 감소하였다. EEC식이군 중에서 특히 EHD1000군은  $6.40 \pm 0.34$  g으로 정상식이군 (ND)  $7.21 \pm 0.27$  g보다 낮은 체중증가량을 나타내어 EEC에 의한 체중감소효과를 확인하였다. 식이섭취량은 고지방식이군 (HFD)이 2.78 g/day로 다른 군에 비하여 증가를 보였지만 유의적인 차이는 없었으므로 EEC가 식욕을 저하시키지는 않는 것으로 사료된다. 식이효율(FER)을 계산한 결과 고지방식이군 (HFD)이  $0.56 \pm 0.07$ 로 가장 높았으며 정상식이군 (ND)  $0.31 \pm 0.01$ 에 비해 80.64 %의 증가율을 보였다. 또 EEC식이군은 정상식이군 (ND) 및 Garcinia추출물식이군 (GHD)과 유사한 수준으로 감소하였으며, EHD1000군에서 가장 낮은 식이효율을 나타내었다.

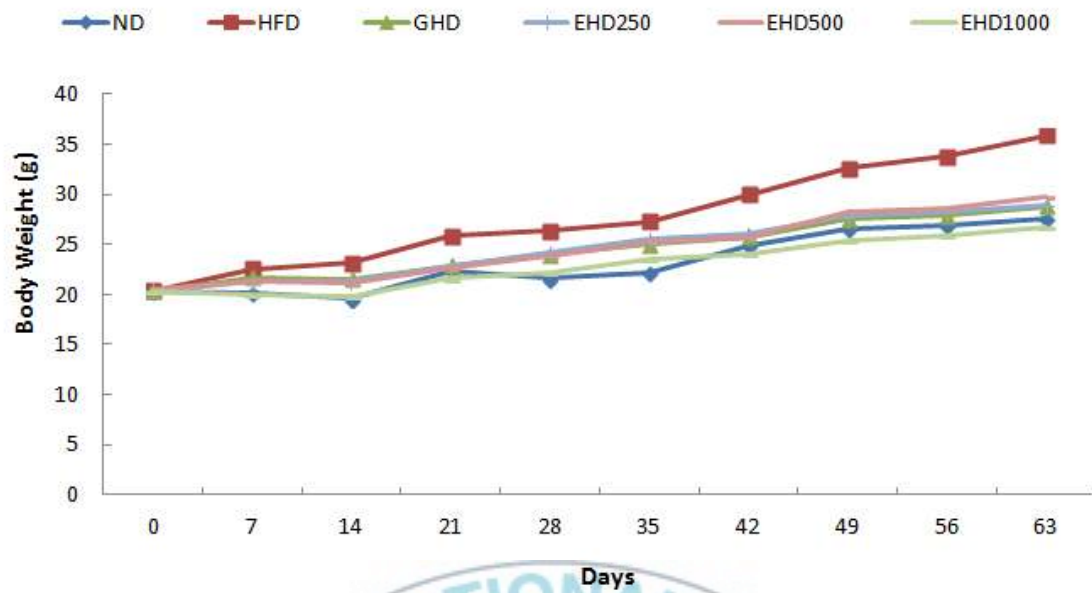
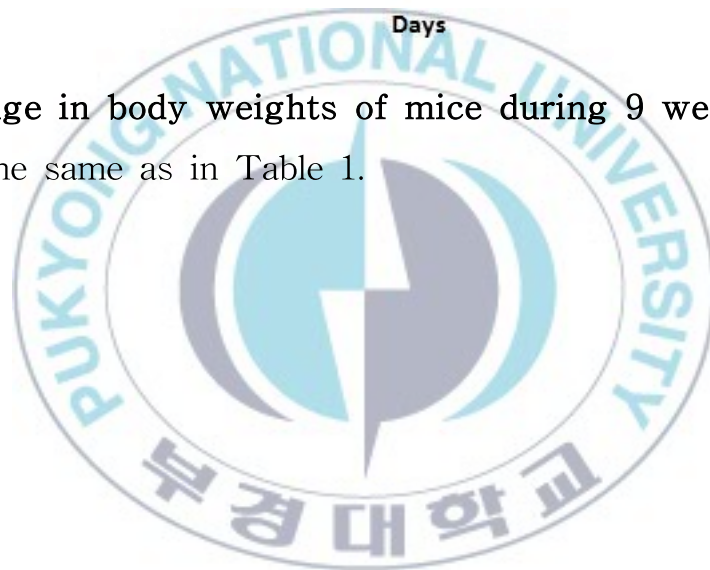


Fig. 6. Change in body weights of mice during 9 weeks. Groups are the same as in Table 1.



**Table 3. Effects of EEc on the weight gain, food intake and FER of mice.**

	ND	HFD	GHD	EHD250	EHD500	EHD1000
Body weight (g)						
Initial	20.31±0.66 <sup>ns1)</sup>	20.34±0.64	20.36±0.65	20.34±0.70	20.40±0.71	20.39±0.73
Final	27.53±0.79 <sup>ac</sup>	35.86±2.45 <sup>b</sup>	28.76±0.66 <sup>ad</sup>	28.97±0.38 <sup>d</sup>	29.79±0.89 <sup>d</sup>	26.79±0.60 <sup>c</sup>
Food intake (g / day)	2.32±0.30 <sup>a</sup>	2.78±0.52 <sup>b</sup>	2.45±0.29 <sup>ab</sup>	2.47±0.31 <sup>ab</sup>	2.47±0.34 <sup>ab</sup>	2.51±0.28 <sup>ab</sup>
Body weight gain (g / 9week)	7.21±0.27 <sup>a</sup>	15.51±1.86 <sup>b</sup>	8.40±0.22 <sup>c</sup>	8.63±0.40 <sup>cd</sup>	9.39±0.47 <sup>d</sup>	6.40±0.34 <sup>a</sup>
Food efficiency ratio (FER)	0.31±0.01 <sup>a</sup>	0.56±0.07 <sup>b</sup>	0.34±0.01 <sup>ac</sup>	0.35±0.02 <sup>cd</sup>	0.38±0.02 <sup>d</sup>	0.26±0.01 <sup>e</sup>

Groups are the same as in Table 1.

Values are mean ± SD.

Within each column, values with different superscripts are significantly from each other ( $p < 0.05$ ), as determined by Duncan's multiple range test.

<sup>1)</sup> NS: not significant.

## 2) 장기 및 주변 지방량의 변화

간, 신장, 부고환의 조직 및 주변 지방의 중량 변화는 Table 4에 나타내었다. 간의 중량은 비만이 유도된 고지방식이군 (HFD)이  $1.54 \pm 0.12$  g으로 가장 높았고, EEC식이군 중에서도 EHD1000군이  $1.01 \pm 0.14$  g으로 고지방식이군 (HFD)에 비해 34.42 %의 감소율을 보였다. 신장 및 주변 지방조직의 중량을 측정한 결과 정상식이군 (ND)  $0.43 \pm 0.05$  g, 고지방식이군 (HFD)  $0.74 \pm 0.11$  g, Garcinia추출물식이군 (GHD)  $0.38 \pm 0.03$  g, EEC식이군 (EHD250, EHD500, EHD1000)  $0.36 \pm 0.02$  g,  $0.37 \pm 0.01$  g,  $0.36 \pm 0.04$  g으로 고지방식이군 (HFD)에서 유의적인 증가를 나타내었고, GHD 군 및 EHD군에서는 유의적인 감소를 나타내었다. 부고환 및 주변 지방의 중량은 고지방식이군 (HFD)이  $0.59 \pm 0.11$  g으로 가장 높았고, 고지방식이군 (HFD)에 비하여 모든 군에서 유의적인 감소를 보였다. 비만을 유도한 마우스는 고지방식이에 의해 에너지 과잉공급이 이루어지면서 체내 장기에 지방을 축적한다 (Lee and Kim, 2009). 간 무게의 증가는 간내 중성지방 및 콜레스테롤의 축적에 의한 것이며 (Jayasooriya et al., 2000), 이로 인하여 간 기능 저하와 함께 간 비대, 지방간으로 발전될 수 있다 (Seo et al., 2009). 신장 및 부고환 주변 지방은 백색지방으로 주로 체내 잉여에너지를 저장하며 복부 지방량의 지표가 된다 (Whitney and Rolfes, 2005). 복부비만은 지방간의 위험인자로 알려져 있으며, 비만인 경우 체지방량이 같더라도 복부지방량이 많을수록 비만합병증에 걸릴 확률이 높아진다 (Avram et al., 2005; Jang and Choi, 2003). 본 연구의 결과, EEC식은 체중감소효과를 나타내며, 체내 장기에 지방이 축적되는 것을 억제하여 지방간 및 복부비만 억제에도 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

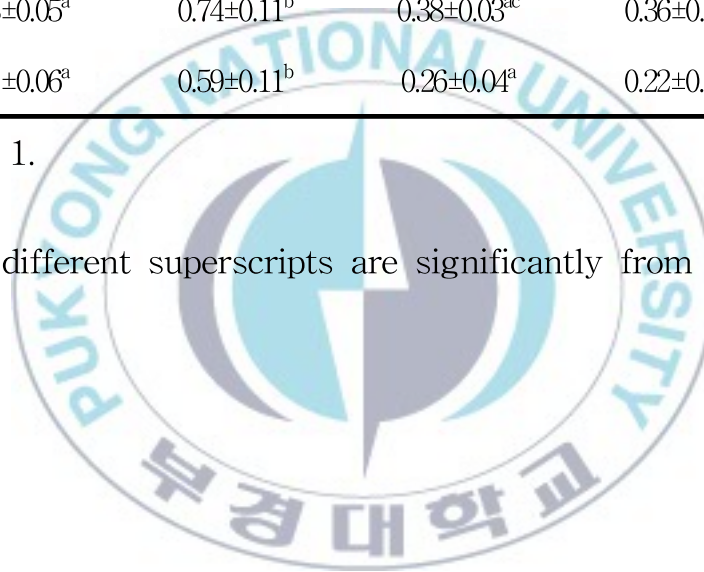
**Table 4. Effects of EEc on the lipid profiles of mice.**

	ND	HFD	GHD	EHD250	EHD500	EHD1000
Liver (g)	1.08±0.05 <sup>ac</sup>	1.54±0.12 <sup>b</sup>	1.17±0.07 <sup>a</sup>	1.09±0.06 <sup>ac</sup>	1.08±0.07 <sup>ac</sup>	1.01±0.14 <sup>c</sup>
Perirenal fat (g)	0.43±0.05 <sup>a</sup>	0.74±0.11 <sup>b</sup>	0.38±0.03 <sup>ac</sup>	0.36±0.02 <sup>c</sup>	0.37±0.01 <sup>ac</sup>	0.36±0.04 <sup>c</sup>
Epididymal fat (g)	0.21±0.06 <sup>a</sup>	0.59±0.11 <sup>b</sup>	0.26±0.04 <sup>a</sup>	0.22±0.04 <sup>a</sup>	0.24±0.02 <sup>a</sup>	0.22±0.05 <sup>a</sup>

Groups are the same as in Table 1.

Values are mean ± SD.

Within each column, values with different superscripts are significantly from each other (p<0.05), as determined by Duncan's multiple range test.



### 3) 혈청 지질의 변화

혈청 triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, total cholesterol의 함량의 변화는 Table 5와 같다. 혈청 중 triglyceride의 함량은 고지방식이군 (HFD)이  $80.95 \pm 5.83$  mg/dl로 정상식이군 (ND)  $67.44 \pm 2.57$  mg/dl에 비하여 증가하는 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. EEc식이군 (EHD)에서는 고지방식이군 (HFD)에 비하여 유의적 감소를 보였으며, 농도에 따른 유의차를 나타내지는 않았다. HDL-cholesterol을 측정 한 결과, 고지방식이군 (HFD)에 비하여 유의적인 증가는 없었으나 EHD250군에서  $129.33 \pm 8.32$  mg/dl로 소량 증가하였다. 반면 LDL-cholesterol은 고지방식이군 (HFD)이  $24.57 \pm 2.44$  mg/dl로 정상식이군 (ND)  $14.44 \pm 2.70$  mg/dl에 비하여 유의적으로 증가하였고, Garcinia추출물식이군 (GHD) 및 EEc식이군 (EHD)에서 유의적으로 감소하였다. 혈청 중 total cholesterol의 함량은 고지방식이군 (HFD)은  $173.44 \pm 5.79$  mg/dl로 정상식이군 (ND)  $78.87 \pm 2.98$  mg/dl에 비해 급격한 증가를 나타냈으며, EEc식이군 (EHD)은 positive 대조군인 Garcinia추출물식이군 (GHD)에 비해서도 유의적 감소를 나타내었다. 혈중 지질 함량은 비만, 심혈관계 질환, 당뇨병, 고지혈증 등의 진단지표로 이용된다 (Park et al. 2012). 혈청 HDL-cholesterol은 소장 및 간세포에서 합성되어 혈액으로 이동하며, 체세포에 존재하는 cholesterol을 간으로 운반하여 동맥경화의 발병률을 낮추는 역할을 한다 (Stephan and Wald, 1990). 반면, LDL-cholesterol은 lipoprotein이라는 거대분자의 형태로 혈액 내에 존재하면서 활성산소, free radical에 의해 산화되어 동맥경화를 유발한다 (Imano et al., 2011; Park et al., 2009). 본 실험에서 EEc를 고지방식기와 혼합하여 9주간 급이한 결과 혈청 중의 cholesterol 함량에 변화를 나타내는 것으로 보이며, 특히 고지혈증의 지표인 triglyceride, LDL-cholesterol 및 total cholesterol의 함량을 유의적으로 감소시켜 EEc가 동맥경화 및 심혈관질환이 예방에 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

Table 5. Triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, Total cholesterol in serum of mice.

(mg/dl)

	ND	HFD	GHD	EHD250	EHD500	EHD1000
Triglyceride	67.44±2.57 <sup>ab</sup>	80.95±5.83 <sup>b</sup>	54.28±6.45 <sup>a</sup>	54.07±2.58 <sup>a</sup>	62.48±4.02 <sup>a</sup>	61.69±5.65 <sup>a</sup>
HDL-C	89.37±3.54 <sup>a</sup>	118.86±8.67 <sup>b</sup>	117.09±6.86 <sup>b</sup>	129.33±8.32 <sup>b</sup>	123.92±15.82 <sup>b</sup>	101.75±1.88 <sup>a</sup>
LDL-C	14.44±2.70 <sup>a</sup>	24.57±2.44 <sup>b</sup>	20.38±2.10 <sup>c</sup>	16.51±2.69 <sup>d</sup>	16.26±0.94 <sup>d</sup>	18.47±1.66 <sup>cd</sup>
Total-C	78.87±2.98 <sup>a</sup>	173.44±5.79 <sup>b</sup>	113.81±6.72 <sup>c</sup>	96.02±7.36 <sup>d</sup>	98.78±4.04 <sup>d</sup>	104.28±7.15 <sup>d</sup>

Groups are the same as in Table 1.

Values are mean ± SD.

Within each column, values with different superscripts are significantly from each other (p<0.05), as determined by Duncan's multiple range test.

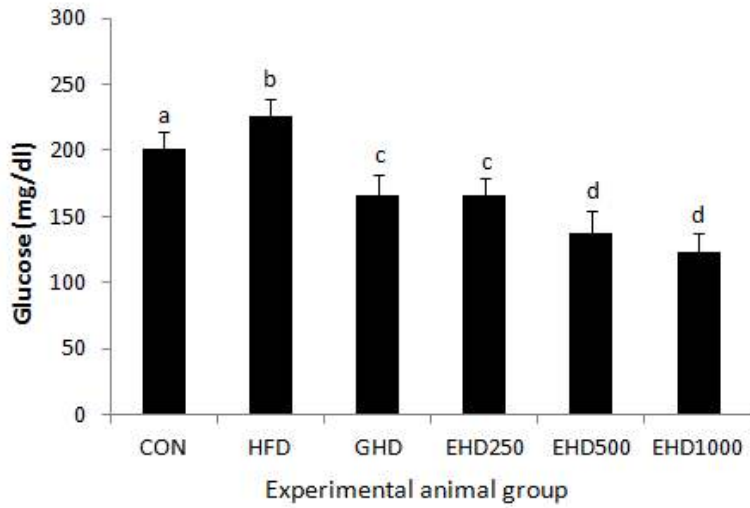
#### 4) 혈청 glucose 및 leptin 농도의 변화

EEc가 고지방식이로 유도된 비만 mouse의 혈청 glucose 함량에 미치는 영향을 측정한 결과 (Fig. 7), EEc식이군 (EHD)은 고지방식이군 (HFD)에 비하여 유의적 감소를 보였다. 특히, EHD500군과 EHD1000군은  $137.86 \pm 16.44$  mg/dl,  $123.03 \pm 14.04$  mg/dl로 positive 대조군인 Garcinia추출물식이군 (GHD)  $165.84 \pm 16.36$  mg/dl보다 유의적으로 감소하였다. Glucose의 혈장 농도에 따라 insulin의 분비가 조절되고 insulin은 GLUT4에 의해 포도당을 세포 내로 이동시키는 역할을 한다 (Ko et al. 2007) 또 insulin분비는 지방분해를 억제하고 지방합성효소의 생성을 촉진한다 (Hwang, 2009). 본 실험의 결과 EEc식이군 (EHD)에서 혈청 glucose의 함량이 낮아졌으며, 이는 insulin에 의한 지방합성이 감소될 수 있을 것으로 사료된다. 혈청 glucose 함량과 insulin 농도 변화에 관한 다른 연구들을 살펴보았을 때 (Lee et al., 2004), EEc에 의해 혈당이 조절됨에 따라 비만에 의한 insulin 저항성 개선에도 효과가 있을 것으로 사료된다.

비만의 주요지표인 leptin의 농도에 대한 EEc의 효과는 Fig. 8과 같다. Leptin은 지방세포에서 분비되는 호르몬으로 시상하부에 있는 leptin receptor에 결합하여 식욕을 조절하고 에너지대사를 조절한다 (Hong et al., 2001). 혈중 leptin 농도는 체지방 양과 밀접한 관계가 있으며, 비만일 경우 적절한 농도를 유지하지 못하고 혈중 농도가 높아지는 것으로 알려져 있다 (Park et al., 2001; Ruhl and Everhart, 2011). 본 실험의 혈청 leptin의 농도는 고지방식이군 (HFD)  $637.36$  pg/ml에 비하여 모든 실험군에서 유의적 감소를 나타내었고, 특히 EHD1000군의 leptin 농도는  $171.9$  pg/ml로 고지방식이군 (HFD)에 비해 약 73 % 감소하였다. Hong 등의 연구에서 고지방식은 체중증가 및 혈중 leptin의 농도를 증가시켰다고 보고하였으며 (Hong et al., 2011), Jang과 Choi의 연구에서는 인진쑥올리 고당이 혈청 leptin의 농도를 현저하게 감소시켰다고 보고하였다 (Jang

and Choi, 2003). Table 4에서 고찰한 바와 같이 체중저하 및 장기 주변 지방량의 감소를 볼 때 EEc가 지방조직의 축적을 저해하여 혈청 leptin의 분비량이 줄어든 것으로 사료된다.



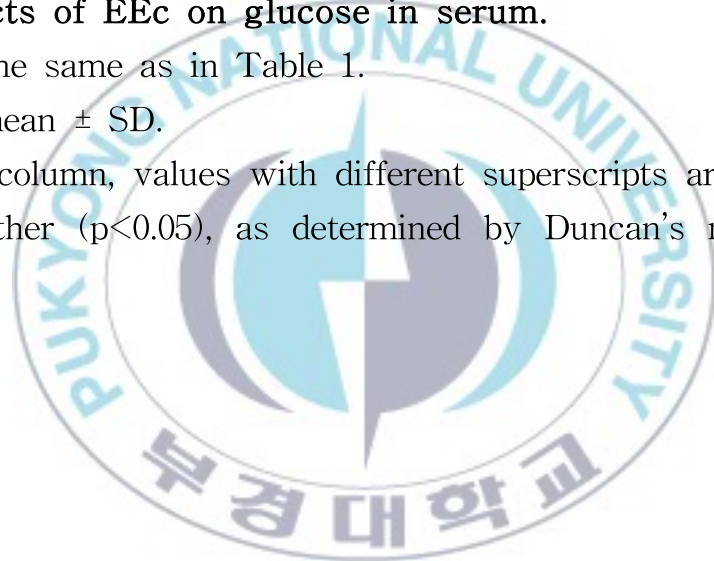


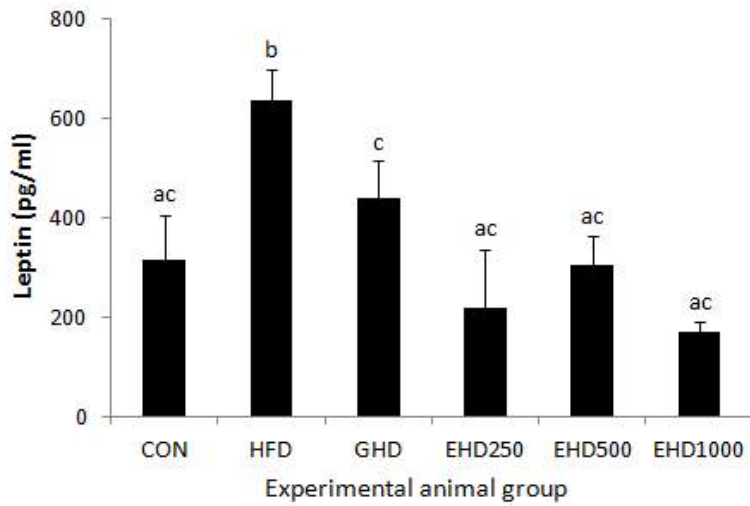
**Fig. 7. Effects of EEC on glucose in serum.**

Groups are the same as in Table 1.

Values are mean  $\pm$  SD.

Within each column, values with different superscripts are significantly from each other ( $p < 0.05$ ), as determined by Duncan's multiple range test.



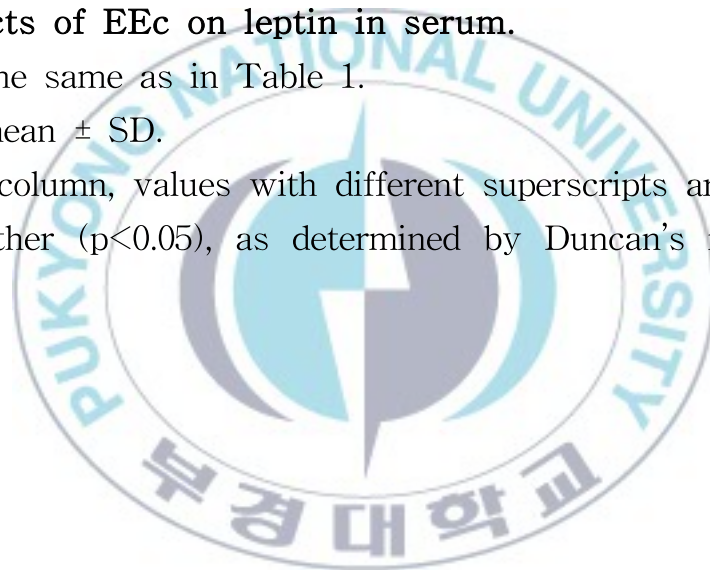


**Fig. 8. Effects of EEC on leptin in serum.**

Groups are the same as in Table 1.

Values are mean  $\pm$  SD.

Within each column, values with different superscripts are significantly from each other ( $p < 0.05$ ), as determined by Duncan's multiple range test.

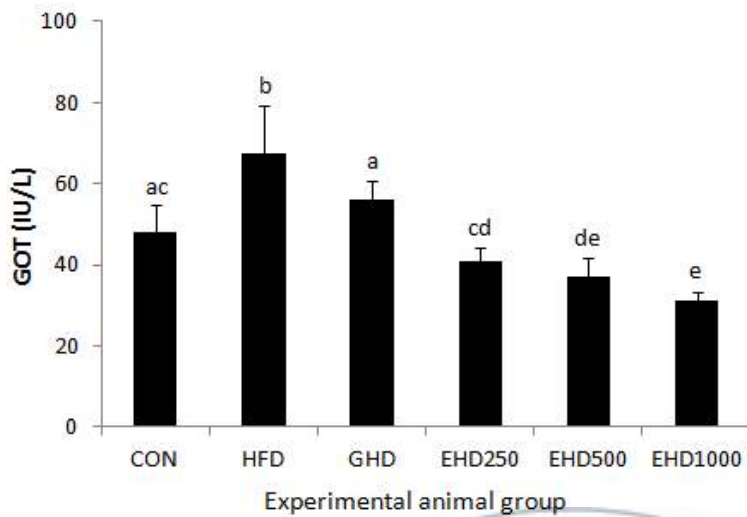


## 5) 혈청 중의 GOT, GPT 활성 변화

Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT)는 간 손상 시 혈액으로 유출되어 그 수치가 증가함으로써 간 손상의 정도를 알 수 있는 지표이다 (Friedman et al., 2003). EEc를 고지방식이와 혼합하여 급이하였을 때 혈청 중 GOT 및 GPT의 활성을 측정한 결과는 Fig. 9에 제시하였다. GOT 활성은 고지방식이군 (HFD)이  $67.35 \pm 11.82$  IU/L로 정상식이군 (ND)  $48.03 \pm 6.89$  IU/L에 비하여 유의적으로 증가하였고, Garcinia추출물식이군(GHD) 및 EEc식이군 (EHD250, EHD500, EHD1000)은 고지방식이군 (HFD)에 비하여 유의적인 감소를 나타내었다.

GPT 활성 또한 GOT와 유사한 경향을 나타내었다. 고지방식이군 (HFD)이  $47.58 \pm 16.21$  IU/L로 정상식이군 (ND)  $18.64 \pm 2.83$  IU/L에 비하여 약 2.5배 유의적 증가를 나타내었고, EHD250군, EHD 500군은 정상식이군 (ND) 수준으로 감소하였으며, EHD1000군이  $11.91 \pm 0.49$  IU/L로 가장 감소하였다. 본 실험 결과, 고지방식으로 인하여 증가된 GOT, GPT의 활성이 EEc식에 의해 저하된 것을 볼 수 있으며, 이는 EEc가 간 독성을 저해하고 간 기능을 회복하는데 효과가 있을 것으로 사료된다.

(A)



(B)

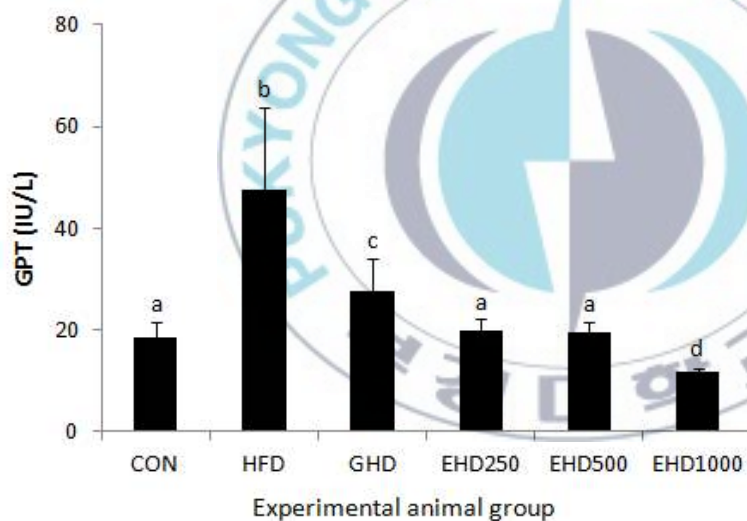


Fig. 9. Effects of EEc on GOT (A) and GPT (B) activities in serum.

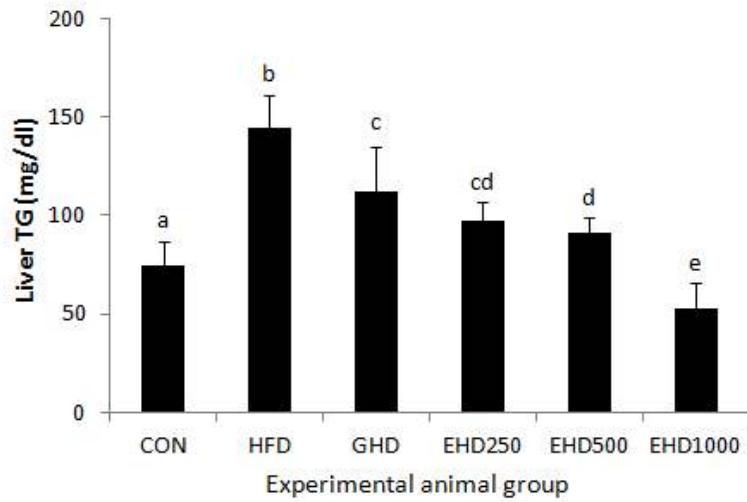
Groups are the same as in Table 1.

Values are mean  $\pm$  SD.

Within each column, values with different superscripts are significantly from each other ( $p < 0.05$ ), as determined by Duncan's multiple range test.

## 6) 간 조직 내 triglyceride 함량의 변화

EEc를 고지방식이와 혼합하여 급이한 mouse의 간 조직 내 triglyceride의 함량 변화를 측정한 결과는 Fig. 10과 같다. 고지방식이군 (HFD)이  $144.59 \pm 16.25$  mg/dl로 정상식이군 (ND)  $74.42 \pm 12.84$  mg/dl에 비하여 약 1.9배 증가하였으며, 특히 EHD1000군이  $52.53 \pm 13.34$  mg/dl로 EEc식이군 중에서 triglyceride의 축적이 가장 저해되었음을 확인하였다. triglyceride는 간 조직 내의 지방세포에 흡수, 저장되어 간 기능을 떨어뜨리고 비만의 원인이 된다. 간 조직 내의 지질 함량의 감소는 항비만 효과의 중요 지표가 되며, Kwon의 연구에서 감태에서 추출한 seanol을 고지방식이와 함께 급이한 결과 간 조직 내 triglyceride 함량이 최대 47%까지 감소하였다고 보고하였다 (Kwon, 2013). 또 돼지감자의 이눌린, 연잎, 허브 병합식이가 간 조직 지질함량에 미치는 영향에 대한 연구 결과에서도 다이어트 식이군을 섭취한 비만흰쥐의 혈청 지질의 감소와 함께 간 조직 내 지질함량에도 감소 효과가 있었다고 보고되어 (Lee et al., 2007) 본 연구와 비슷한 결과를 보여주었다.

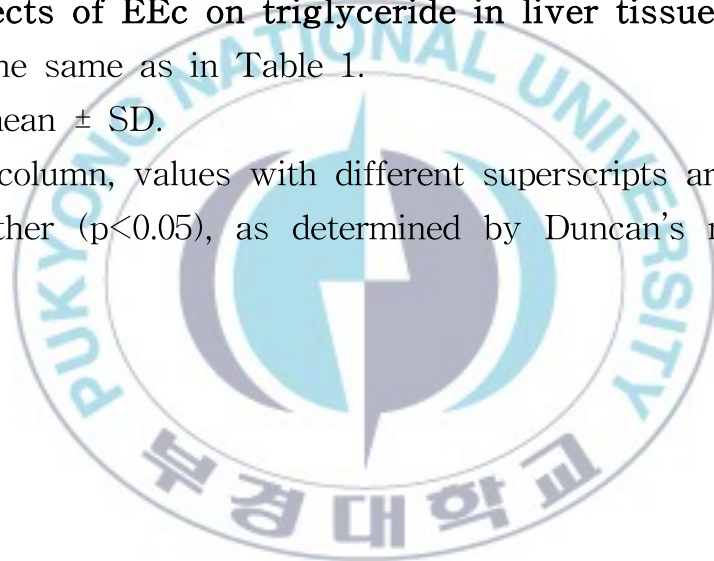


**Fig. 10. Effects of EEC on triglyceride in liver tissue.**

Groups are the same as in Table 1.

Values are mean  $\pm$  SD.

Within each column, values with different superscripts are significantly from each other ( $p < 0.05$ ), as determined by Duncan's multiple range test.



## 7) 간 조직에서 adipogenesis 저해활성 (Western blot)

Fig. 5에서는 EEc 처리에 의해 3T3-L1 preadipocyte에서 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBPs)의 발현이 억제됨을 확인하였고, EEc의 이러한 anti-adipogenesis가 생체 내에서도 동일하게 작용하는지 확인하였다 (Fig. 11). 9주간 실험식이를 섭취한 마우스의 간에서 얻어진 단백질로 western blot을 실시한 결과, 고지방식이군 (HFD)에서는 C/EBPs의 발현이 유의적인 증가를 나타내었고, EEc식이군 (EHD)에서는 농도의존적인 감소를 나타내었다. C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ 는 homo-heterodimer를 형성하며, 백색지방세포와 갈색지방세포에서 발현되는 adipogenic transcription factor로 C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ 는 지방세포 분화 초기단계에서, C/EBP $\alpha$ 는 지방세포 분화의 후기단계에서 발현이 증가된다 (Cowherd et al., 1999). C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ 의 발현은 cAMP와 dexamethasone에 의해 증가되며, PPAR $\gamma$ 의 발현을 유도하고, PPAR $\gamma$ 의 발현증가는 C/EBP $\alpha$ 의 발현을 유도하여 지방세포의 증식과 insulin 민감도 향진에 관여한다 (El-Jack et al., 1999; Fox et al., 2006; Hamm et al., 2001). C/EBPs는 AMP-activated protein kinase (AMPK) 경로를 활성화 시키고 에너지대사조절에 관여하여 항비만 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Cho et al., 2010). 본 실험의 결과 마우스의 간에서 얻어진 단백질에서도 C/EBPs의 발현 감소를 확인하였고, 이는 EEc가 세포 수준에서 뿐만 아니라 생체 내에서도 triglyceride 생성을 감소시키고 지방세포 분화과정을 억제시킬 것으로 사료된다.

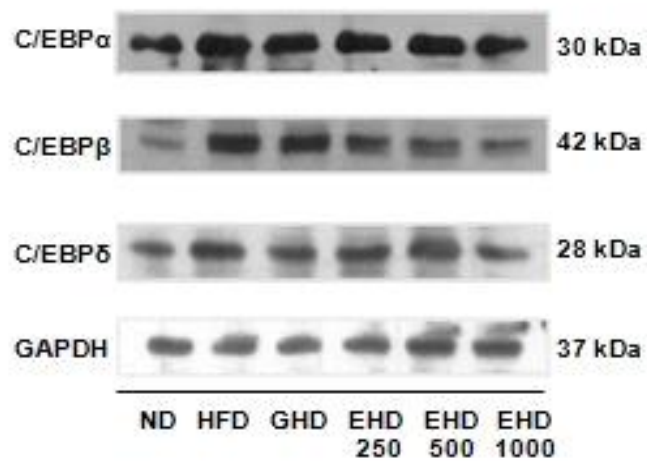
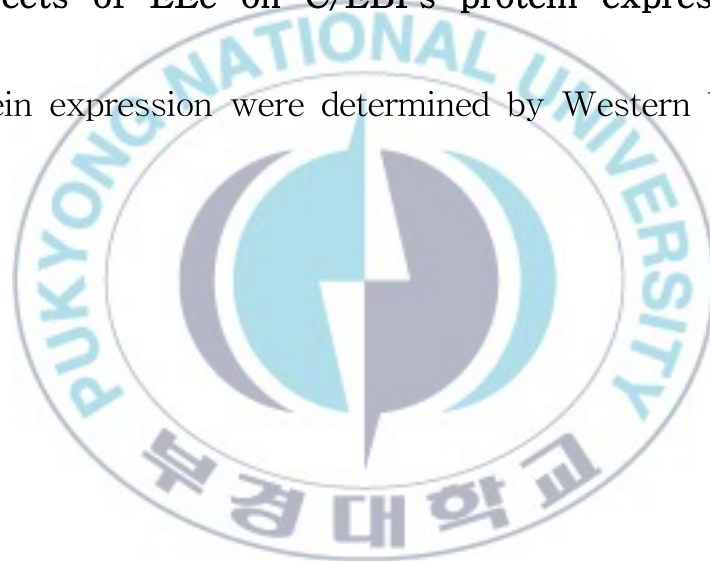


Fig. 11. Effects of EEc on C/EBPs protein expression in liver tissue.

C/EBPs protein expression were determined by Western blot analysis.



#### IV. 결론 및 요약

본 연구는 효소를 이용한 감태분획물 (EEc)의 항비만 효능을 확인하기 위하여 3T3-L1 preadipocyte에 EEc를 농도별 (12.5 ug/ml, 50 ug/ml, 200 ug/ml)로 처리하여 세포생존율 및 adipogenesis 저해활성을 검증하였다. 3T3-L1 preadipocyte에 EEc를 처리하여 24시간 및 48시간 배양한 결과, EEc는 세포생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 세포 내 glucose 유입량은 분화유도인자인 MDI를 처리한 군에서 증가하였고, Garcinia 및 EEc 200 ug/ml 농도처리군에서는 insulin이 존재하는 조건하에서도 glucose의 유입량이 유의적으로 감소하였다. 세포 내 triglyceride의 축적량을 확인한 결과, MDI군에서 유의적으로 증가하였고, EEc 처리에 따라 그 축적량이 감소됨을 확인하였다. Oil red O 염색을 통해 EEc가 농도의존적으로 lipid droplet 생성을 억제시키는 것으로 확인하였다. 또한 EEc는 adipogenic transcription factor인 C/EBPs의 발현을 감소시켜 3T3-L1 peradipocyte가 지방세포로 분화하는 과정을 억제하는 것으로 관찰되었다.

이러한 세포실험의 결과를 바탕으로 생체 내에서도 EEc의 항비만 효능이 동일하게 적용되는지 C57BL/6NTac mouse를 이용하여 검증하였다. 실험동물을 정상식이군 (ND), 고지방식이군 (HFD), Garcinia 고지방혼합식이군 (GHD), EEc 고지방혼합식이군 (EHD250, EHD500, EHD1000)으로 나누었으며, EEc식이군은 mouse의 체중(kg) 당 250mg, 500mg, 1000mg으로 나누어 사육하였다. 9주간 식이섭취량과 체중증가량은 고지방식이군에서 유의적으로 높았으며, EEc식이군에서 유의적으로 감소하였다. 체중증가량과 식이섭취량을 바탕으로 식이효율 (FER)을 계산한 결과 EHD1000군에서 가장 낮은 식이효율을 나타내었다. 고지방식이군 (HFD)에서 간, 신장 및 부고환의 조직과 주변지방의 중량이 다른 군에 비해 유의적으로 증가하여 고지방식이에 의해 간 및 복부에 지방축적이 유도되었음을 확인하였고, EEc식이군 (EHD)의 장기 및 주변지방의 무게는 정상

식이군 (ND)이나 Garcinia식이군 (GHD) 수준으로 감소하였다. EEc를 섭취한 비만 mouse에서 얻은 혈청으로 지질 패턴을 분석한 결과, HDL-cholesterol에서 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, triglyceride와 LDL-cholesterol의 혈청 함량이 유의적으로 감소하였다. 혈청 total cholesterol의 함량은 고지방식이군 (HFD)에 비해 EEc식이군 (EHD)에서 40 %정도 감소율을 나타내어 EEc의 섭취가 체내 cholesterol 수치를 감소시키는 효과가 있을 것으로 판단되었다. 혈중 glucose의 경우 EEc를 섭취한 모든 군에서 유의적인 감소를 나타내었고, 특히 EHD500군과 EHD1000군은 Garcinia추출물식이군 (GHD)보다 더욱 감소하는 결과를 나타내었다. Leptin의 혈청 농도는 모든 실험군이 고지방식이군 (HFD)에 비하여 유의적인 감소를 나타내었고, EHD1000군은 약 73 %의 감소를 보여 EEc섭취가 혈중 leptin 농도에 상당한 영향을 주고 있음을 확인하였다. EEc를 9주간 섭취한 mouse의 간 독성 및 간 조직 내 triglyceride 함량의 변화를 확인하였다. 혈청 GOT, GPT를 측정된 결과, 고지방식이군 (HFD)에서 유의적 증가를 나타내었고, EEc식이군 (EHD)에서 유의적 감소를 나타내었다. 또 간 조직 내 triglyceride의 축적량의 경우, 고지방식이군에 비해 EHD1000군에서 63 %의 감소율을 보여 고지방식이에 의해 손상된 간 기능이 EEc에 의해 회복되었음을 확인하였다. C/EBPs의 발현 정도를 mouse의 간에서 얻어진 단백질로 western blot을 실시한 결과, EEc식이군 (EHD)에서 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이는 앞서 검증한 3T3-L1 지방세포의 C/EBPs 발현 정도를 측정된 결과와 일치하며, EEc가 세포 및 생체 내에서 지방세포의 생성 및 분화를 억제하는 것으로 판단된다.

비만은 비만으로 인한 외형적인 문제뿐만 아니라 고혈압, 당뇨병, 심장 질환 등 사망률이 높은 질병을 유발하는 위험인자로 작용하기 때문에 지방세포분화 및 지질대사 조절에 대한 관심이 더욱 집중되고 있다 (조혜진 등., 2005). 본 연구에 사용한 감태는 우리나라 제주도 연안에 주로 서식하는 해조류로써, 최근 들어 생리활성에 대한 연구가 활발하게 진행되면

서 상업적 이용가치가 요구되는 천연물질 중 하나이다 (Kwon, 2013). 본 연구에서는 감태의 유효성분의 분리 및 정제를 위하여 Rapidase press L 과 Rohament CL을 이용하여 EEc를 획득하였고, 이상의 실험들로 항비만 효능을 검증하고자 하였다. 위의 결과들을 종합해 보면 EEc 처리에 의해 3T3-L1 preadipocyte에서 C/EBPs의 발현을 억제하고 lipid droplet 및 triglyceride의 축적을 저해하여 anti-adipogenesis 활성이 나타나는 것을 확인하였다. 또한 EEc의 섭취는 비만 mouse에서 체중 및 복부지방량의 감소 효과와 함께 혈청 지질 및 간 기능 개선에도 효과가 있는 것으로 확인되었고, leptin을 조절하여 식욕 및 에너지소비율에도 영향을 미칠 것으로 판단된다. 따라서 감태를 이용하여 비만치료제 및 기능성 제품 개발에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.



## V. 참고 문헌

- 조혜진, 이윤석, 박지영, 김재범. 2002. 체내 에너지 항상성 조절에 관여하는 지방세포의 기능. *대한소아내분비학회지*. 7(2); 145-149.
- Ahima RS and Flier JS. 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trend Endocrinol Metab*. 11(8); 327-332.
- Ahmadian M, Y. Wang and Sul HS. 2010. Lipolysis in adipocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 42; 555-559.
- Avram AS, Avram MM, James WD. 2005. Subcutaneous fat in normal and diseased status: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J Am Acad Dermatol*. 53; 671-683.
- Cho YM, Lee SM, Kim YH, Jeon GU, Sung JH, Jeong HS and Lee JS. 2010. Defatted grape seed extracts suppress adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 39(6); 927-931.
- Choi HJ, Kil JH, Bak SS, Kong CS, Park KY, Seo YW and Lim SY. 2006. Inhibitory effects of solvent extracts from seven brown algae on mutagenicity and growth of human cancer cells. *J Life Sci*. 16; 1080-1086.
- Cowherd RM, Lyle RE and McGehee Jr RE. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol*. 10; 3-10.
- El-Jack, AK, Hamm JK, Pilch PF, and Farmer SR. 1999. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and C/EBPalpha. *J. Biol. Chem*. 274; 7946-7951.
- Fox KE, Fankell DM, Erickson PF, Majka SM, Crossno Jr JT and Klemm DJ. 2006. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells

- ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. *J. Biol. Chem.* 281; 40341-40353.
- Friedman SF, Martin P and Munoz JS. 2003. Laboratory evaluation of the patient with liver disease. *Hepatology, a textbook of liver disease. Philadelphia; Saunders publication.* 1; 661-709.
- Gesta S, Tseng YH and Kahn CR. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 131; 242-256.
- Hafiz MS, Arslan MI, Banarjee S and Obaidullah M. 2004. Studies on serum triglyceride level in patients with myocardial infarction. *Mymensingh. Med. J.* 13; 185-187.
- Hamm JK, Park BH, and Farmer SR. 2001. A role for C/EBP beta in regulating peroxisome proliferator activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 276; 18464-18471.
- Hong KH, Kang SA and Kim SH. 2001. Effects of high fat diet on serum leptin and insulin level and brown adipose tissue UCP1 expression in rats. *Korean J Nutrition.* 34(8); 865-871.
- Hwang EY, Hong JH, Choi JH, Lee EJ and Lee IS. 2009. Study on anti-obesity and hypoglycemic effects of *Lycium chinense* mill extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 38(11); 1528-1534.
- Imano H, Noda H, Kitamura A, Sato S, Kiyama M, Sankai T, Ohira T, Nakamura M, Yamagishi K, Ikeda A, Shimamoto T and Iso H. 2011. Low-density lipoprotein cholesterol and risk of coronary heart disease among Japanese men and women: the circulatory risk in communities study (CIRCS). *Prev Med.* 52; 381-386.
- Jang JY and Choi HJ. 2003. Effects of artemisia *Iwayomogi oligosaccharide* on the blood lipids, abdominal adipose tissues and

- leptin levels in the obese rats. *Korean J Nutr.* 36(5); 437-445.
- Jayasooriya AP, Sakono M, Yukizaki C, Kawano M, Yamamoto K and Fukuda N. 2000. Effects of *Momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol-free and cholesterol enriched diets. *J Ethnopharmacol.* 72; 331-336.
- Joo DS, Lee JK, Chol YS, Cho SY, Je YK and Chol JW. 2003. Effect of seatangle oligosaccharide drink on serum and hepatic lipids in rats fed a hyperlipidemic diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 32; 1364-1369.
- Jung AP, Park C, Han MH, Kim BW, Chung YH and Choi YH. 2011. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by aged black garlic extracts in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Life Science.* 21(5); 720-728.
- Jung JY, Kim KBWR, Lee CJ, Kwak JH, Kim MJ, Kim DH, Sunwoo C, Kim TW and Ahn DH. 2011. Inhibitory effect of *Ecklonia cava* extracts against lipase activity and stability effect of temperature and pH on their activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 40(7); 969-974.
- Kang SR and Kim MY. 2009. The effect of *Ecklonia cava* extracts on bone turnover markers in ovariectomized rats. *J Life Sci.* 19(12); 1841-1846.
- Ko BS, Kwon DY, Hong SM and Park SM. 2007. In vitro anti-diabetic effects of crude extracts of *Platycodi radix*. *Korean J Food Sci Technol.* 39(6); 701-707.
- Ko DU. 2004. Effect of Job's tears on the obesity range of rat. Ph.D. Thesis, Graduate School of Yongin University.
- Kown KH, Kwak JJ and Park SH. 2003. Relationship of adiponectin to

body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: in healthy premenopausal women. *Korean Circulation J.* 33(11); 1004-1010.

Kwon HJ. 2013. Biological activities and anti-obesity effect of Gam-Tae (*Ecklonia cava*). M.S. Thesis, Graduate School of Gyeongsang National University.

Labreuche J, Touboul PJ and Amarenco P. 2009. Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review of the epidemiological studies. *Atherosclerosis.* 203; 331-345.

Lee EH, Lee YJ, Choi OB and Kang SM. 2007. Effects of a combined diet of *Jerusalem Artichoke's* inulin, *Ootus leaf* and herb extracts in obesity-induced white rat with fat diet. *J. Korean Socm Appl. Biol. Chem.* 50(4); 295-303.

Lee HS, Choi JH, Kim YG and Lee CH. 2012. Effect of dietary intake of *Salicornia herbacea L.* hot water extract on anti-obesity in diet-induced obese rats. *J Korea Soc Food Sci Nutr.* 41(7); 950-956.

Lee JA, Ahn EK, Hong SS and Oh JS. 2012. Anti-obesity effect of ethyl acetate extracts from *Agrimonia pilosa Ledeb.* in 3T3-L1 preadipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 41(2); 161-167.

Lee KS and Kim JB. 2009. Effects of the *Sarcodon aspratus* on the high level of blood lipid and obesity induced by high fat-diet in rat. *Journal of Life Science.* 19(9); 1265-1270.

Lee KS, Choi YS and Seo JS. 2004. Sea tangle supplementation lowers blood glucose and support antioxidant systems in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food.* 7; 130-135.

Lee SG. 2010. Effects of chestnut inner shell extract on 3T3-L1

- preadipocyte differentiation. *Korean J. Oriental Physiology and Pathology*. 24(2); 266-271.
- Morrison RF and Farmer SR. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr*. 130; 3116S-3121S.
- Ordovas JM and Mooser V. 2004. Nutrigenomic and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol*. 15; 101-108.
- Park HA, Kim YS and Sung MY. 2001. Relationships between leptin and gender, obesity indices, cardiovascular risk factor, and diet in korean adolescents. *J Korean Acad Fam Med*. 22(3); 303-314.
- Park JH, Choi SY, Lee KW, Kim SS, Cho KD and Han CK. 2012. Effect of diets with red yeast sweet potato powder supplement on fecal amount and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 41(4); 487-493.
- Park MJ. 2005. Recent advances in regulating energy homeostasis and obesity. *Korean Journal of Pediatrics*. 48(2); 126-134.
- Park YM, Febbraio M. and Silverstein RL. 2009. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *Journal of Clinical Investigation*. 119(1); 136-145.
- Rosen ED and Macdougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7; 885-896.
- Ruhl CE, Everhart JE. 2001. Leptin concentrations in the United States: Relations with demographic and anthropometric measures. *Am J Clin Nutr*. 74; 295-301.
- Saltiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414; 799-806.
- Seo DJ, Chung MJ, Kim DJ and Choe M. 2009. Anti obese effects of

- diet containing medicinal plant water extracts in high fat diet-induced obese mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 38(11); 1522-1527.
- Shin HC, Hwang HJ, Kang KJ and Lee BH. 2006. An anti-oxidative and antiinflammatory agent for potential treatment of osteoarthritis from *Ecklonia cava*. *Arch pharm Res.* 29; 165-171.
- Shin HC. 2011. Nutraceutical application of seanol. *Food Industry and Nutrition.* 16(1); 5-11.
- Shin MK and Han SH. 2006. Effects of Lotus (*Nelumbo Nucifera Gaertner*) leaf powder on lipid concentrations in rats fed high fat diet rats. *Korean Food Culture.* 21; 202-208.
- Sim JM. 2003. Studies on the nutritional evaluation of *Ecklonia cava kjellman* and *Ecklonia Residues* and their dietary effects on immunocompetence and productivity in chicken. Ph.D. Thesis, Graduate School of Konkuk University.
- Stephan AM, Wald NJ. 1990. Trends in individual consumption of dietary fat in the United States 1920-1984. *Am J Clin Nutr.* 52; 457-464.
- Visscher TL and Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health.* 22; 355-375.
- Whitney EN and Rolfes SR. 2005. Understanding nutrition. 10th ed. *Thomson Wadsworth, Belmont, CA, USA.* 264-280.
- Wi MY, Hwang EK, Kim SC, Hwang MS, Baek JM and Park CS. 2008. Regeneration and maturation induction for the free-living gametophytes of *Ecklonia cava Kjellman*. *J. Korea Fish. Soc.* 41; 381-388.
- Yoon NY, Eom TK, Kim MM and Kim SK. 2009. Inhibitory effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on mushroom

tyrosinase activity and melanin formation in mouse B16F10 melanoma cell. *J Agric Food Chem.* 57; 4124-4129.

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A and Zechner R. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 306; 1383-1386.

