

고지방 식이로 유도된 비만 쥐에서 실리빈 (Silybin)이 체중 및 내당 능에 미치는 영향

허행전, 황진택*

Effect of Silybin on Body Weight and Glucose Tolerance in High-fat-diet Induced Obese Mice

Haeng Jeon Hur and Jin Taek Hwang*

접수: 2010년 9월 16일 / 게재승인: 2011년 1월 17일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract In this study, we investigated the effects of silybin on body weight and glucose tolerance in mice fed high fat diet mice. We found that body weight, plasma TG contents, fat size, glycerol, 3-hydroxybutyrate and total cholesterol were significantly decreased in silybin (500 mg/kg) supplemented groups compared to high fat diet group. Whereas, total food intake was not changed between high fat diet group and high fat diet plus silybin group. Furthermore, supplement of high fat elevated the glucose intolerance and was improved in silybin supplement group. Finally, we examined the effect of silybin on circulating adipocytokine level to explore the possible mechanism by which silybin improves high fat diet-induced obesity and diabetes. The silybin supplement significantly reduced the level of adipocytokine, such as leptin, resistin, IL-6, and MCP-1 induced by high fat diet. These results suggest that silybin can be used to improve obesity and diabetes.

Keywords: silybin, anti-obesity, high fat diet, glucose intolerance, adipocytokine

1. 서론

불규칙적인 식습관 및 스트레스는 현대인에게 있어 다양한

질병을 유발하고, 이들을 치료하기 위하여 국가적으로 많은 손실비용을 감당하게 된다. 다양한 질환들 가운데 특히 최근에는 소아로부터 노인에 이르기까지 비만인구가 폭발적으로 증가되고 있으며, 이 비만은 2차성 질환인 당뇨병, 고혈압, 심혈관 계 질환, 고지혈증 및 암까지도 유발하여 매우 심각하다고 할 수 있다.

이러한 비만을 극복하기 위하여 약물투여, 수술, 식이요법 및 운동 등의 요법들이 좋은 효과를 나타내고 있으며, 특히 최근에는 천연물 유래의 항비만 소재의 연구가 활발히 진행되고 있다. 항비만 치료약물은 두통, 구토 등의 여전히 많은 부작용으로 인하여 비만 치료 과정중 문제가 되고 있기 때문에 비교적 안전하다고 알려진 식품소재를 통하여 부작용이 덜한 항비만 기능성식품 소재의 발굴에 대한 관심이 집중되고 있다.

실리빈 (silybin)은 밀크씨슬 (milk thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn) 또는 영경퀴라고도 불리는 국화과 식물의 주요 활성성분으로서 밀크씨슬은 약 2000년 전부터 유럽 등에서 간질환에 사용되어 온 식물이다. 보고에 의하면 실리빈은 항산화 및 항암 효능을 나타내고 있다 [1,2]. *In vitro* 또는 동물모델을 이용한 연구에서 실리빈은 간독성에 대하여 보호능을 나타내고 있으며 전립선암 세포, 에스트로젠 의존성 또는 비의존성 유방암 세포주, 자궁경부암 세포, 대장암 세포, 폐암 세포 등에서 항암 효능을 나타내는 것으로 보고되었다 [1-3]. 또한 안전성테스트에서 비교적 안전성이 입증되었기에 천연 의약소재로서 사용될 수 있음을 알 수 있다 [4].

최근 보고에 의하면, 실리빈은 3T3-L1 지방세포의 분화를 억제하고 이 억제 효과는 adipogenic 타겟 단백질인 CAAT/enhancer binding protein- α , fatty acid synthase, sterol response

한국식품연구원 바이오제론 연구단
Biogeront Research Group, Korea Food Research Institute, Songnam
463-746, Korea.
Tel: +82-31-780-9315, Fax: +82-31-709-9876
e-mail: jthwang@kfri.re.kr

element binding protein 1 c, adipocyte-specific lipid binding protein, peroxisome proliferator-activated receptor γ 및 lipoprotein lipase의 발현 억제를 수반하며, 반대로 preadipocyte 마커단백질인 preadipocyte factor-1의 증가를 수반하는 것으로 알려졌다 [5].

그럼에도 불구하고, 실리빈의 비만예방 및 치료에 대한 연구는 아직까지 미미하고, 특히 동물모델을 이용한 비만예방 및 치료 효능에 대한 연구가 아직 이루어지지 않고 있다. 이에 본 연구진은 고지방 식이 모델을 이용하여 실리빈이 비만 개선에 효과가 있는지, 그리고 혈액 및 조직의 지질개선 효과를 나타내는지를 규명하고, 이와 더불어 비만에 의해 유도된 내당 능력 장애에 있어 실리빈이 개선 효과를 나타내는지를 규명하고자 실험을 진행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

실리빈은 Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. 정상 식이 (10% 지방 칼로리, 제품번호 D12450B)와 고지방 식이 (60% 지방 칼로리, 제품번호 D12492)는 Research Diets (New Brunswick, New Jersey, USA)에서 구입하였다.

2.2. 실험동물 사육

실험동물은 4주령 C57BL/6J 수컷 쥐를 나라 바이오텍 (서울, 한국)으로부터 구입하였다. C57BL/6J 쥐는 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 항온, 50% 습도 항습, 그리고 12시간 광주기의 일정한 환경에서 polycarbonate 쥐장에 하나당 두 마리를 사육하였으며 구매 후 일 주일의 적응기간이 지난 뒤 실험에 사용하였다. 실험 기간 동안 사료와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2.3. 식이제조

각 실험군의 식이조성은 Table 1에 표시하였다.

Table 1. Composition of the experimental diet

Ingredients	Normal (g)	High fat diet (g)	Silybin diet (g)
Silybin	0	0	1.25
Casein, lactic	473.91	646.12	646.12
L-Cystine	7.11	9.69	9.69
Corn starch	746.41	0.00	0.00
Maltodextrin 10	82.93	403.83	403.83
Sucrose	829.34	222.27	222.27
Cellulose, BW200	118.48	161.53	161.53
Soybean oil	59.24	80.77	80.77
Lard	47.39	791.50	791.50
ETC	135.18	184.31	184.31

2.4. 고지방식이로 유도한 비만 모델

쥐 30마리를 임의로 세 군-정상군 (Normal), 고지방 식이군 (Si 0), 그리고 실리빈 처리군 (Si 500)으로 나눈 다음 정상군은 정상식이를 고지방 식이군은 고지방식이를 실리빈 처

리군은 고지방식이에 실리빈을 500 mg/kg의 농도로 첨가한 식이를 각 군의 쥐들에게 55일간 제공하였다. 일주일에 한 번씩 쥐 무게와 식이 섭취량을 측정하고 식이를 교환하여 제공하였다. 실험 종료 시점에 12시간 정도 절식한 쥐를 졸레틸로 마취시킨 다음에 안와정맥을 통해 채혈하였다. 그 후 경추탈골을 통해 희생시키고 간과 지방을 적출한 다음 무게를 측정하고 일부는 포르말린에 고정시키고 나머지는 액체질소에 노출시켜 급냉한 다음 저온냉장고에서 -70°C 로 보관하였다.

2.5. 혈액분석

분리한 혈액을 4°C 에서 10분간 1000 G로 원심 분리하여 혈청을 분리하여 분석이 이용하였다. 혈중 중성지방과 콜레스테롤 농도는 아산제약 (서울, 한국)으로부터 구입한 분석 키트를 이용하여 분석하였다. 혈중 글리세롤 농도는 시그마 알드리치에서 구입한 Free glycerol reagent를 이용하여 분석하였다. 혈중 3-hydroxybutyrate 농도는 BioAssay Systems (Hayward, CA, USA)에서 구입한 분석 키트를 이용하여 분석하였다.

2.6. 혈중 아디포카인 (adipokine) 분석

혈중 leptin, resistin, interleukin-6 (IL-6), 그리고 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) 농도는 샌드위치 효소면역법 (Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 원리로 하는 분석 키트를 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다. 요약하면 384 well immunoplate (SPL, 포천, 한국)에 포획항체 인산염 완충액 (phosphate-buffered saline, PBS) 4°C 에서 밤새도록 (overnight) 부착시킨 다음 1% 소혈청 알부민을 2시간 동안 반응시킨다 (blocking). 혈청과 표준물질을 2시간 동안 반응시킨 뒤에 검출항체 (detection antibody)를 한 시간 동안 반응시킨다. Streptavidin-horseradish peroxidase를 반응시킨 다음 발색기질 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA, Sigma-Aldrich, MN, USA)과 반응시킨 다음 반응정지액 (1 N 황산)으로 반응을 종결시킨 다음 450 nm에서 흡광도를 측정한 다음 표준물질을 이용하여 혈청의 아디포카인 농도를 분석하였다.

2.7. 당 부하 검사

당내성을 측정하기 위하여 식이를 8주간 급여한 쥐를 12시간 동안 절식한 다음 실험에 이용하였다. 포도당을 1 g/kg body weight의 농도로 복강에 주입한 다음 0, 0.5, 1, 1.5, 2시간이 지난 뒤에 꼬리정맥에서 분리한 혈액으로부터 혈당 (Accu-Check, Roche, Basel, Switzerland)을 측정하였다.

2.8. 통계처리

실험결과는 SPSS 9.0 (SPSSInc., Chicago, IL)프로그램을 이용하여 실험군당 평균 \pm SD로 표시하였고 각 군사이의 통계적 유의성은 one-way ANOVA를 실시하여 다 군간의 차이는 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test로 검증하였다.

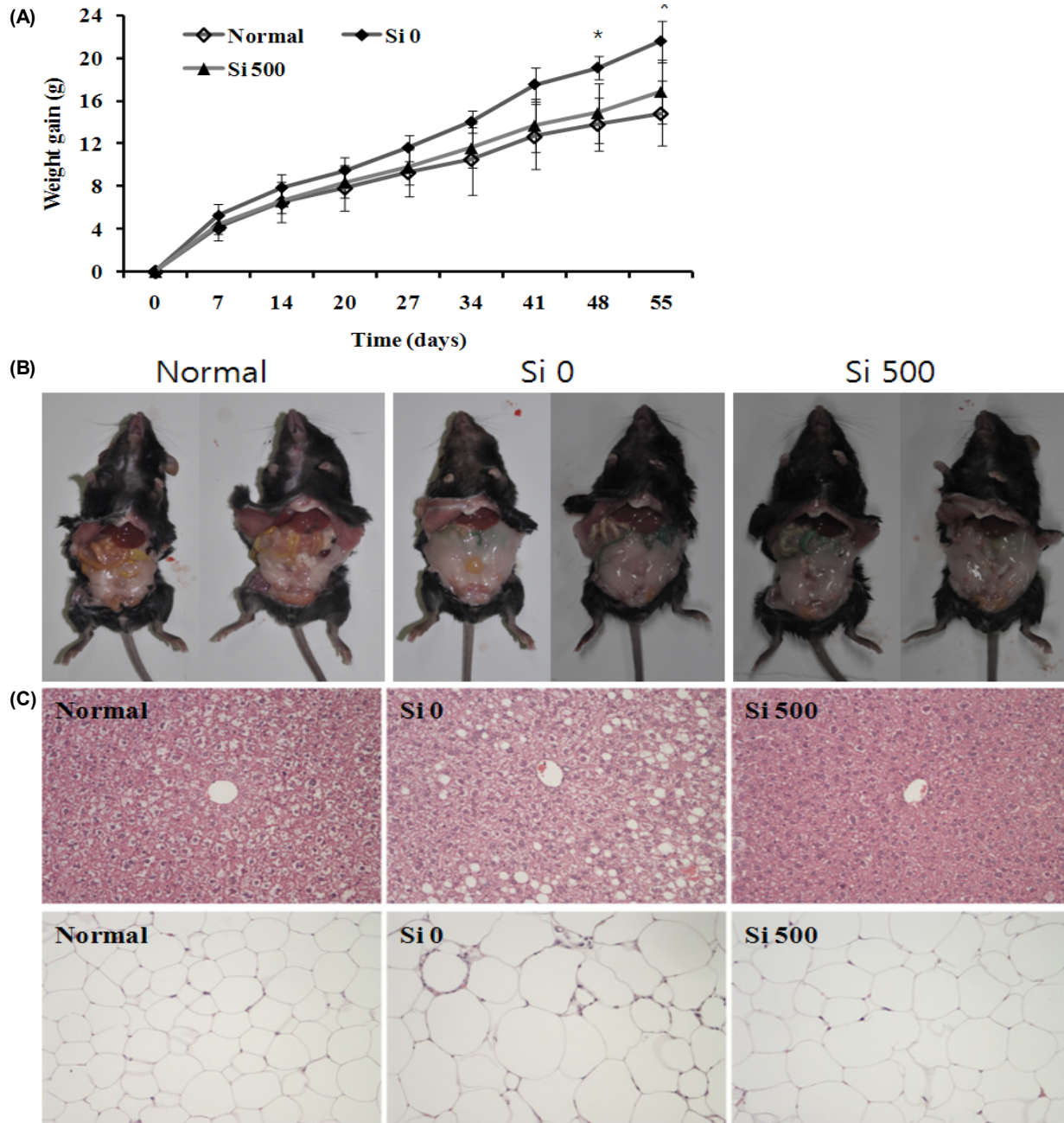


Fig. 1. The effects of silybin on weight gain and body fat size in mice fed a high fat diet. Data are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$; significant difference between high fat diet and high fat diet plus silybin.

3. 결과 및 고찰

3.1. 실리빈의 체중 및 식이 섭취량에 미치는 영향

실리빈의 항 비만 효능을 검증하기 위하여, 고지방식을 급여한 마우스 모델에서 체중 및 식이 섭취량에 미치는 영향을 측정하였는데, Fig. 1(a)와 (b)에서 보여주는 바와 같이 실험식이 초기에는 변화가 없었으나 시간이 지남에 따라 고지방식이군 (Si 0)은 정상 식이군 (Normal)에 비해 유의적인 체중증가를 나타냈다. 같은 조건하에서 고지방식이와 실리빈 (500 mg/kg)을 같이 급여한 그룹에서는 체중이 유의하게

감소되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이때 총 식이 섭취량은 고지방 식이군이 정상군에 비해 약간 낮은 경향을 나타내었으나 열량 섭취량은 별 다른 차이를 나타내지 않았으며, 식이섭취량의 경우, 고지방 식이군이나 고지방 식이군과 실리빈을 같이 급여한 군에서 유의적인 차이가 없었다 (Table 2). 이들 결과는 실리빈의 체중감소효과는 식이 섭취에 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 아울러 본 연구에서 지방세포를 염색하여 각각의 크기를 측정하였는데 Fig. 1의 C에서 보는 바와 같이 고지방식이에 의해 (Si 0) 지방세포의 크기가 상당히 증가하는 것을 관찰 할 수 있었고 이는 실리빈 급여에 의

해 감소하는 것으로 나타났다.

Table 2. Effect of silybin on body weight, food in take, calorie intake in mice fed a high fat diet

	Normal	Si0	Si500
Weight gain (g)	15.67 ± 1.92	22.53 ± 1.92	17.98 ± 2.69
Total food intake (g/cage)	456.5 ± 59.8	336.6 ± 19.5	316.6 ± 25.5
Calorie intake	1755 ± 230	1765 ± 102	1690 ± 92

Mean ± SD (n = 6).

Ka *et al.*의 보고에 따르면 실리빈은 3T3-L1 지방세포의 분화를 억제하고 이 억제 효과는 adipogenic 타겟 단백질의 발현 억제 또는 활성을 수반한다고 보고하였다 [5]. 그럼에도 불구하고 실리빈의 동물모델에서의 효능은 아직 보고된 바가 없어 본 연구에서 고지방식이 동물모델을 이용하여 실리빈의 항비만 효능을 증명하고자 하였다. 본 연구에서 고지방식이 비만유도 모델에서도 역시 실리빈이 체중을 감소시킬 수 있음을 확인하여 Ka *et al.*의 세포모델의 결과와 일치함을 증명하였다. 또한 실리빈의 안전성은 이미 증명되어 있는데 다양한 동물모델을 이용하여 oral과 intravenous route로 투여하였을 때 어떠한 toxicity도 나타나지 않았다고 알려져 있다.

본 연구에서도 선행 연구들과 마찬가지로 고지방식이와 실리빈을 같이 급여했을 때 정상 군과 비교하여 체중감소는 나타나지 않았고, 간의 무게 역시 정상 군과 고지방식이 및 실리빈 동시급여 군 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이로서 실리빈은 보고된 바와 같이 안전성에 문제가 없는 것으로 향후 항비만 천연물 소재로서 쓰일 수 있음을 예상하게 되었다.

3.2. 실리빈의 Glucose tolerance test에 미치는 영향

다음으로 실리빈의 투여가 고지방 식이에 의해 유도된 혈당 상승에 미치는 영향을 알아보기 위해 포도당을 경구투여한 후 시간별로 당 부하 검사를 실시하였다. 잘 알려진 바와 같이 체중이 증가함에 따라 당뇨, 심장질환, 고혈압 등의 여러 가지 이차성 질환을 수반하게 된다 [6,7].

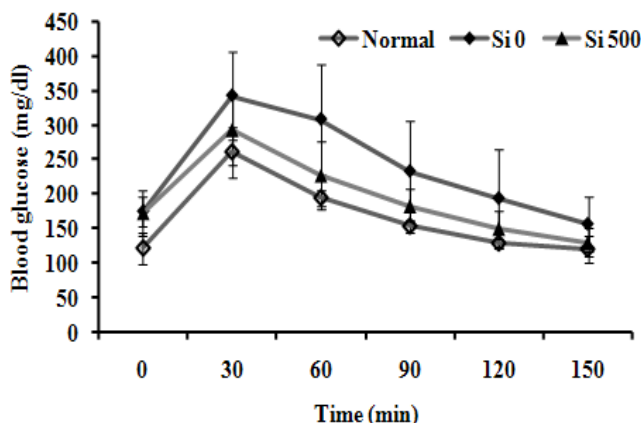


Fig. 2. The effect of silybin on blood glucose level in mice fed a high fat diet.

본 연구에서 고지방 식이를 (Si 0) 급여한 마우스는 정상 군 (Normal)에 비해 유의적으로 높은 혈당수치를 나타내었는데 이는 비만이 원인을 알 수 있다. 이때 고지방식에 실리빈 (Si 500 mg/kg)을 첨가하여 투여한 그룹에서는 혈당 수치를 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 이들의 결과로 실리빈의 투여는 고지방식에 의해 유도된 체중의 증가를 유의적으로 감소하며 또한 체중증가에 의한 혈당 상승을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 이들의 결과를 토대로, 향후 실리빈의 내당 능 장애 및 인슐린 저항성 개선에 관한 연구와 수반되어지는 작용기작에 대한 연구가 심층적으로 이루어져야 할 것이다.

3.3. 실리빈의 지질함량에 미치는 영향

실리빈의 체중 감소 및 혈당 강화 효과와 더불어 혈중지질에 미치는 영향에 대하여 혈장의 지질 함량을 분석하였다. 표에서 보여주듯 실험식이 초기에는 아무런 변화가 없었으나 시간이 지남에 따라 고지방식이군은 정상 식이 군에 비해 유의적으로 plasma TG contents, glycerol, 3-hydroxybutyrate 이 total cholesterol 함량이 증가하였다. 이들의 증가는 고지방식이와 실리빈을 같이 급여한 그룹에서 유의하게 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Table 3).

Table 3. Effect of silybin on glycerol, 3-hydroxybutyrate, TG, and total cholesterol levels in mice fed a high fat diet

	Normal	Si0	Si500
Glycerol (mM)	0.96 ± 0.20	1.12 ± 0.23	0.81 ± 0.32
3-hydroxybutyrate (mM)	1.00 ± 0.23	1.55 ± 0.41	1.08 ± 0.50
TG (mg/dl)	97.2 ± 12.2	112.0 ± 24.2	96.9 ± 35.9
Total cholesterol (mg/dl)	230.3 ± 55.3	253.6 ± 56.5	212.6 ± 40.0

Mean ± SD (n = 6).

중성지질의 증가는 고혈압과 같은 심혈관 질환을 일으키는 중요한 요소로 알려져 있는데, 실리빈은 이러한 중성지질의 증가를 효과적으로 감소시킬 수 있음이 확인되었다. 이로서 실리빈은 비만을 억제하는 것 뿐만 아니라 심혈관 질환의 위험 또한 감소시킬 수 있음을 시사하는 결과로 볼 수 있다. 이전의 연구들에서 잘 보고된 바와 같이 실리마린은 실리빈을 major component로 가지고 있으며, 간염, 및 간 경화증 등의 간질환에 쓰이고 있다 [3]. 또한 이것은 hypercholesterolemia를 효과적으로 개선시킬 수 있음이 보고되어 있다 [8]. 본 연구에서 고지방 식이에 의해 유도된 콜레스테롤 수치의 상승은 hypercholesterolemia를 일으키고 이는 실리빈의 급여에 의해 개선되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 이전의 연구와 우리의 결과는 일치한다고 할 수 있다.

3.4. Adipocytokine분비에 미치는 영향

비만에 의한 지방세포로부터 유리된 사이토카인들은 비만 유래 이차성 질환인 심장질환 및 인슐린 저항성을 유발하는 중요한 요소가 된다 [9,10]. 따라서 이들 지방세포에서 유리되는 adipocytokine의 억제는 비만유래 이차성 질환을

예방하는 타겟이 된다. 본 연구에서 마지막으로 고지방식이에 의해 분비가 증가된 adipocytokine에 실리빈급여가 어떠한 영향을 미치는지를 분석하였다. Table 4에서 보듯이 leptin, resistin, IL-6, 및 MCP-1은 고지방식이 급여에 의해 혈장으로의 분비가 정상 식이군에 비해 유의적으로 증가되었다. 이는 보고된 바와 같이 고지방식이에 의한 adipocytokine의 분비는 Fig. 2의 결과에서와 같이 내당능 장애를 일으켰을 것이라 추정하게 되었다.

Table 4. Effect of silybin on adipocytokine such as leptin, resistin, IL-6, and MCP-1 levels. Mean \pm SD

	Normal	HFD	Silybin
Leptin (ng/mL)	83.6 \pm 25.0	106.1 \pm 16.4	54.1 \pm 18.6
Resistin (ng/mL)	49.7 \pm 16.4	75.8 \pm 11.2	50.6 \pm 19.4
IL-6 (ng/mL)	3.44 \pm 1.66	5.26 \pm 1.65	4.56 \pm 0.35
MCP-1 (ng/mL)	21.6 \pm 9.2	37.0 \pm 9.7	18.0 \pm 8.9

Mean \pm SD (n = 6).

Leptin의 혈액 내 circulation은 지방이 축적됨에 따라 증가하게 되고 이는 인슐린 저항성을 촉진하는 것으로 알려져 있다 [11]. Leptin과 더불어, 비만 유래 다양한 염증관련 adipocytokine인 resistin, IL-6, MCP-1 등은 마찬가지로 비만에 의해 분비가 촉진되며, 이들 역시 인슐린 저항성을 촉진하는 중요한 factor로서 작용하게 된다. 본 연구에서 이들 인슐린 저항성을 유도하는 비만유래 adipocytokine들의 분비는 고지방식이와 실리빈을 같이 급여한 그룹에서 유의적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 실리빈의 체중감소효과 및 인슐린 저항성 개선 효능은 지방세포로부터 분비되는 adipocytokine들을 억제함으로써 나타내는 것임을 추정할 수 있었다.

4. 결론

본 연구를 통하여 실리마린의 Major compound인 실리빈이 고지방 식이로 유도된 비만마우스의 체중, 지질함량, 콜레스테롤, 내당능 및 염증관련 사이토카인의 분비에 미치는 영향을 관찰하였다. C57/BL/6마우스를 이용하여 정상식이, 고지방식이, 실리빈처리 고지방식이를 급여한 군들을 비교한 결과, 체중증가량은 고지방식이 군에 비해 실리빈처리 고지방식이군에서 유의하게 감소시키는 것을 관찰하였다. 이와 더불어 총콜레스테롤 함량, 혈장의 TG농도 역시 실리빈처리 고지방식이군에서 고지방식이군에 비하여 유의하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 한편 고지방식은 정상식에 비하여 혈당과 내당 능을 유의하게 증가시켰고 이때 실리빈처리 고지방식이군에서 혈당변화를 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다. 마지막으로 혈장으로 유리된 adipocytokine

들을 분석한 결과 실리빈처리 고지방식이를 급여한 군에서 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다.

이와 같이 실리마린의 대표성분인 실리빈은 비만유도 마우스에서 혈장의 TG 및 관련 adipokine들의 분비를 억제함으로써 체중조절에 효과를 나타내고, 혈당개선에도 효능이 있는 것을 확인할 수 있었다.

감사

이 연구는 한국식품연구원의 사업연구비 및 Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF) for Bio Food Research program of National Research Foundation (NRF)의 지원을 받아 수행한 연구결과로 이에 감사드립니다.

References

- Cheung, C. W., N. Gibbons, D. W. Johnson, and D. L. Nicol (2010) Silibinin, a promising new treatment for cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* 10: 186-95.
- Gazák, R., D. Walterova, and V. Kren (2007) Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Curr. Med. Chem.* 14: 315-38.
- Flora, K., M. Hahn, H. Rosen, and K. Benner (1998) Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 93: 139-43.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Silibinin>
- Ka, S. O., K. A. Kim, K. B. Kwon, J. W. Park, and B. H. Park (2009) Silibinin attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes through a potential upregulation of the insig pathway. *Int. J. Mol. Med.* 23: 633-7.
- Abete, I., A. Astrup, J. A. Martinez, I. Thorsdottir, and M. A. Zulet (2010) Obesity and the metabolic syndrome: role of different dietary macronutrient distribution patterns and specific nutritional components on weight loss and maintenance. *Nutr. Rev.* 68: 214-31.
- Mathieu, P., I. Lemieux, and J. P. Despres (2010) Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin. Pharmacol. Ther.* 87: 407-16.
- Krecman, V., N. Skottova, D. Walterova, J. Ulrichova, and V. Simanek (1998) Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Planta Med.* 64: 138-42.
- Kobalava, Z. D., S. V. Villevalde, and K. V. Isikova (2009) The role of adiponectin in development and progression of cardiovascular diseases. *Kardiologiia* 49:51-8.
- Guzik, T. J., D. Mangalat, and R. Korbut (2006) Adipocytokines-novel link between inflammation and vascular function?. *J. Physiol. Pharmacol.* 57: 505-28.
- Stofkova A. (2009) Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocr. Regul.* 43: 157-68.