

## Antiobesity Effect of Mixture of Black Garlic and *Garsinia cambogia* Extracts in 3T3-L1 Adipocytes and L6 Skeletal Muscle Cells

Young-Mi Jung<sup>1</sup>, Dong-Sub Lee<sup>2</sup>, Seon-Ha Lee<sup>2</sup>, Nam-Ho Jeoung<sup>3</sup> and Bok Jo Kim<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>2</sup>College of Health and Welfare, Kyungwoon University, Gumi 730-739, Korea

<sup>3</sup>Department of Fundamental Medical & Pharmaceutical Sciences, CU-Leader's College, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, 712-702, Korea

The antiobesity effect of the mixture of black garlic and *Garsinia cambogia* extracts (BGG) was investigated by measuring the Oil red O staining and the expressions of adipogenic genes during preadipocyte differentiation by real-time PCR in the 3T3-L1 adipocytes. BGG reduced contents of Oil red O dye in the 3T3-L1 adipocytes. mRNA expression levels of SREBP1c, C/EBP $\alpha$ , aP2/FABP4, and PPAR $\gamma$  which are adipogenic transcription factor, in cells treated with BGG were also significantly down regulated. Also, the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in L6 cells was more increased by BGG. These results indicate that BGG seems to be more attractive compound for application of industry than individual extracts such as black garlic and *Garsinia cambogia*, considering it has two effects not only inhibit the preadipocyte differentiation but also activate the phosphorylation of AMPK unlike other two compound.

**Key Words:** BGG, Antiobesity effect, Adipocyte differentiation, AMP-activated protein kinase

### 서 론

마늘 (*Allium sativum*)은 식재료 및 약재로 사용하기 위하여 세계적으로 오랫동안 재배되고, 이용되어 왔다. 마늘의 주요 생리활성 물질은 allicin으로 알려져 있고, allicin은 항박테리아 (Goncagul et al., 1999), 항진균 (Ankri et al., 1999), 그리고 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Bakri et al., 2005). 최근 연구들은 마늘의 섭취가 동맥경화 (Rajasree et al., 2009), 당뇨병 (Kook et al., 2009), 심혈관질환을 포함한 심장병, 고콜레스테롤 혈증 (Mathew et al., 2004), 고지혈증 (Reinhart et al., 2009) 등의 성인병의 예방 및 치료 효과가 있는 것으로 알려지고 있으며

(Mahmoodi et al., 2006), 노인성 치매 (Alzheimer's disease)를 유발하는 beta-amyloid의 생성을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Chauhan, 2003). 또한 마늘은 유방암, 피부암 (Wang et al., 2005) 등과 같은 다양한 암에 대해, 암세포의 성장 및 전이를 막는 효능이 알려져 왔다 (Seki et al., 2008). 이러한 마늘의 효능은 황화합물의 항산화 효과에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다.

마늘을 일정시간 열을 가하여 숙성시켜 제조한 흑마늘 (black garlic)은 생마늘을 적정온도, 습도, 시간을 유지하면서 자연 숙성시킴으로써 생마늘과는 차별화된 영양성분, 색, 맛, 향, 조직 등을 갖는 생마늘의 1차 가공제품으로 최근 항균, 피로회복, 혈액축진, 정력증강 등 유용한 생리활성이 보고되고 있다.

흑마늘은 수용성 유허아미노산으로 알려진 S-아릴시스테인과 S-메틸시스테인과 폴리페놀계열의 안토시아닌, 그리고 과당 등으로 주로 구성되어 생마늘과는 구성성분에서 차별성이 있다. 특히 의성한지마늘의 경우, 미네랄이 풍부한 화산토질의 특성, 큰 일교차, 그리고 한서의 차이에 의해 한지형 마늘성분의 차이가 야기되어 마늘의 품

\*Received: September 6, 2012 / Revised: September 19, 2012

Accepted: September 19, 2012

†Corresponding author: Bok Jo Kim, College of Health and Welfare, Kyungwoon University, Gumi 730-739, Korea.

Tel: +82-54-479-1281, Fax: +82-54-479-1237

e-mail: bjkim@ikw.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

질이 우수하다고 알려지고 있으며, 이러한 원료를 사용하여 가공된 의성한지흑마늘의 경우 타 원료와는 다른 차별화된 기능성을 기대할 수 있다. 흑마늘에 관한 연구로는 주로 항산화 및 고지혈증 관련 성분 분석 및 시험동물을 활용한 전임상 효능 평가 등이 최근 활발히 수행되어지고 있으나 (Jung et al., 2009), 아직 흑마늘 관련 효능에 관한 학술적 보고는 미비한 실정이다.

가르시니아 캄보지아 (*Garsinia cambogia*) 추출물은 지방세포 분화를 저해함으로써 체지방 감소에 관한 기능성을 현재 국내 식약청에서 인정받은 건강기능성 식품 개별인정형 원료로 항비만 관련 소재이며, 이의 응용범위는 원료단독으로뿐만 아니라 여러 천연 식품원료와의 조합으로 효능을 극대화 및 안전성 개선을 위한 개발이 관련 산업계를 중심으로 활발히 진행 중이나, 천연물 복합 조성물에 대한 문헌적 보고는 아직 이루어지지 않고 있다.

본 실험에서는 흑마늘 열수추출 분말을 가르시니아 캄보지아 추출물과 최적 비율로 혼합하여 제조한 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)이 가지는 항비만 관련 효과를 지방세포 합성과 관련된 3T3-L1 세포주와 지방세포 분해와 관련된 L6 세포주를 이용하여 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG) 제조

흑마늘은 경상북도 의성군 소재 의성농산영농조합에서 공급받은 당도 34 brix의 흑마늘 열수 추출물을 이용하여 대형회전농축기 (Rotary evaporator, Buchi, Switzerland)로 45°C에서 감압 농축하여 동결건조 시킨 분말을 사용하였다. 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)은 상기에서 수득한 흑마늘 분말과 충청북도 청원군 소재 (주)텍스진바이오텍에서 공급받은 가르시니아 캄보지아 추출 분말을 1:0.02, 1:0.2, 1:0.4, 1:0.6, 1:0.8, 1:1.0, 1:2.0 (w/w)으로 혼합하여 유리병에 넣어 40°C에서 5일간 원적외선을 조사시키면서 2차 숙성시킨 후, 100 mesh로 체질하여 시료로 사용하였다.

### SOD (superoxide dismutase) 활성 분석

시료의 항산화 활성 분석은 대표적인 항산화 효소인 SOD 활성을 SOD assay kit (Dojindo Molecular Technologies, INC., Japan)을 사용하여 측정하였다 (Jang et al., 2008). 시험 방법은 식품공전에 따라 수행하였으며, 반응 후 분광광도계를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정 후 아래와

같이 SOD 활성을 계산하였다.

$$\text{SOD (\%)} = (1 - (A - B) / C) \times 100$$

A: xanthine oxidase 시약에 시료 첨가 후 흡광도를 측정

B: xanthine oxidase 시약 대신 blank buffer 첨가 후 흡광도 측정

C: xanthine oxidase 시약에 증류수 첨가 후 흡광도 측정

### 지방세포 분화 시험을 위한 세포주 및 시약

3T3-L1 preadipocyte는 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; high glucose 4.5 g/L), fetal bovine serum (FBS), bovine calf serum (FCS)는 Invitrogen (Grand Island, YK, USA)에서 구입하였다. 사용된 일반 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 bioreagent급을 구매하였다.

### 3T3-L1 preadipocyte의 배양

본 연구에 사용된 3T3-L1 preadipocyte는 25 mM glucose, 10% FCS, penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도로 유지되는 배양기에서 유지하였다. Preadipocyte의 기능을 유지하기 위하여 약 60% 정도의 포화도에서 세포를 회수하여 계대배양 하였다. 계대배양을 위한 세포의 회수는 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 바닥에서 분리하였다.

### CCK-8 assay를 이용한 3T3-L1 지방전구세포 생존율의 측정

추출물들을 세포에 처리한 뒤 cell counting kit (CCK)-8을 이용하여 추출물의 세포독성을 평가 하였다. 3T3-L1 세포를 2.0 × 10<sup>4</sup> cells/well의 농도가 되도록 10% FBS containing RPMI 1640 배지에 현탁하여 96-well plate에 100 µl씩 seeding 하였다. 추출물을 처리된 농도로 처리한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 그 이후 각 well 당 cell counting kit 용액 (Dojindo, Tabaru, Japan) 50 µl씩을 첨가 하였다. 30~90분간 배양 뒤 microplate reader을 이용하여 흡광도 (450 nm)를 측정하였다.

### 3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화

3T3-L1 preadipocyte의 지방세포로의 분화는 Elmendorf 등 (Elmendorf et al., 1998)이 사용한 방법을 이용하였다. 분화용 배지는 25 mM glucose, 10% FBS, 1 mg/ml insulin, 1 mM dexamethasone (Dex), 0.5 mM isobutyl-1-methylxanthine

(IBMX)가 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 지방세포로의 분화는 3T3-L1 preadipocyte가 배양접시에 100% 포화되었을 때, 분화용 배지로 치환하여 4일간 배양하고, 계속해서 25 mM glucose, 10% FBS, 1 mg/ml insulin이 포함된 DMEM 배지로 교환하고 4일간 더 배양하였다. Insulin 처리가 끝나면 25 mM glucose, 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 치환하여 사용할 때까지 배양하였다. 배양하는 동안 배지는 매 2일 마다 같은 필요한 배지로 교환해 주었다. 흑마늘 추출물의 처리는 주어진 농도를 분화용 배지에 첨가하여 처리하였으며, 분화가 끝날 때까지 계속해서 배지 교환 시 같이 처리하였다. 분화가 끝나는 시점을 분화 시작 후, 10일로 설정하였다.

#### Oil-red O 염색

분화가 끝나면, 배양용 배지를 제거하고, 고정액 (10% formalin)을 5분간 처리하여 세포를 고정하였다. 그리고 고정액을 버리고, 다시 새로운 고정액을 처리하여 1시간 이상 처리하여 세포를 완전히 고정하였다. 고정이 끝나면 고정액을 버리고 60% isopropanol로 세포를 세척하고, 완전히 말린다. 세포 내 지방은 Oil-Red O를 이용하여 염색하였다 (Janderova et al., 2003).

#### Total RNA 분리 및 cDNA 합성

배양된 세포에서 유전자 발현 분석을 위한 total RNA의 추출은 Trizol 용액을 사용하였으며, 분리한 Total RNA의 농도는 nanodrop spectrophotometer를 사용하여 정량하였다. 5 mg total RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였으며, cDNA의 합성은 reverse transcriptase법 (Takara, Japan)을 제조사의 방법에 따라 수행하였다 (Ziemke and Mantzoros, 2007). 유전자 발현 정도는 Real-time PCR (ABI 7500, ABI, USA)은 cybergreen labeling 방법을 이용하여 실시하였다 (Han et al., 2009).

#### PCR용 프라이머 유전자

지방세포 분화 관련 유전자 발현 분석에 사용된 프라이머 유전자 서열은 SREBP1c/ADD1 (5'-AGA GGG TGA GCC TGA CAA-3' 및 5'-CCT CTG CAA TTT CCA GAT-3' C/EBP $\alpha$  (5'-TGC GAG CAC GAG ACG TCT AIA G-3' 및 5'-GCC AGG AAC TCG TCG TTG A-3'), aP2/FABP4 (5'-CCA TCC GGT CAG AGA GTA CTT-3' 및 5'-CGA ATT CCA CGC CCA GTT-3'), 그리고 PPAR $\gamma$  (5'-CAC AAG AGC TGA CCC AAT GGT-3' 및 5'-GAT CGC ACT TTG GTA TTC

TTG-3') 각각 다음과 같으며, 사용된 real-time PCR용 primer들은 Macrogen (Deajeon, Korea)에서 합성하였다.

#### AMPK 활성 측정을 위한 Western blot 분석

AMPK 활성 측정을 위한 L6 myotube 세포주는 (주)티지바이오텍으로부터 분양받아 사용하였으며, 배양한 L6 세포를 lysis buffer (20 mM Tris, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM phenyl methylsulfonyl fluoride, 50 mM NaF)에서 30분간 용해시킨 후, 단백질 정량을 시행하였다. 이후 phosphoAMPK (Thr-172, Cell Signaling, Beverly, MA)와 total AMPK에 대한 일차 항체와 4°C에서 밤 동안 반응시켰다. 수 차례 세척 과정 후 anti-rabbit 항체 (GIBCOBRL, Gaithersburg, MD, USA)에 차례로 반응시켜 발색을 유발하였다. 대조군으로는 2형 당뇨병 치료제인 metformin (1,1-dimethyl biguanide, Sigma, St. Louis, USA)을 2 mM 농도로 처리하였다.

#### 통계처리

실험 결과는 means  $\pm$  SD (standard deviation)으로 표시하였고, 유의성 차이는 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

#### 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)의 최적 혼합 비율 도출

흑마늘 추출물 (BG)과 가르시니아 캄보지아 추출물 (G)을 활용하여 기존 흑마늘이 가지는 생리활성을 극대화 시키고저 혼합물을 제조하였다. 생리활성 강화에 적합한 최적 비율을 도출하기 위하여 흑마늘 추출물의 증량을 고정시킨 후, 가르시니아 캄보지아 추출 분말의 혼합 비율을 1:0.02, 1:0.2, 1:0.4, 1:0.6, 1:0.8, 1:1.0, 1:2.0 (w/w)로 변화시키면서 1차로 혼합한 후, 40°C에서 5일간 원적외선을 조사하면서 2차 숙성을 시켜 최종 혼합물을 제조하였다.

혼합 비율이 다른 상기 물질의 생리활성 중 흑마늘이 가지는 대표적인 기능인 항산화 활성을 SOD kit를 활용하여 분석 비교하였다. 그 결과 흑마늘과 가르시니아 캄보지아 추출물 혼합 비율이 1:0.4 (w/w)까지는 SOD 활성에 큰 영향을 주지 않았으나, 1:0.6 (w/w) 이상으로 증가될 경우는 급격히 흑마늘이 가지는 SOD 활성이 낮아지는 양상을 나타내었다 (Table 1). 따라서 흑마늘과 가르시니아 캄보지아 추출물의 최적 혼합 비율을 주된 생리활성 중의 하나인 SOD 활성이 거의 비슷하게 유지되는

**Table 1.** Determination of optimal mixture ratio of black garlic and *Garsinia cambosia* extracts

| Black garlic (g) | Garsinia cambosia (g) | Ratio  | SOD activity (%) |
|------------------|-----------------------|--------|------------------|
| 10               | 0                     | 1:0.0  | 10.6             |
| 10               | 0.2                   | 1:0.02 | 10.2             |
| 10               | 2                     | 1:0.2  | 9.9              |
| 10               | 4                     | 1:0.4  | 9.8              |
| 10               | 6                     | 1:0.6  | 6.2              |
| 10               | 8                     | 1:0.8  | 3.9              |
| 10               | 10                    | 1:1.0  | 1.3              |
| 10               | 20                    | 1:2.0  | 0.8              |

1:0.4 (w/w)로 결정하였으며, 도출된 비율로 혼합시킨 분말을 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)로 명명하였다.

#### 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)의 주요 무기성분 함량 분석

흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)의 주요 무기성분인 마그네슘 (Mg), 칼륨 (K), 아연 (Zn), 인 (P), 그리고 황이온 (S)의 함량을 ICP 분석법 (Kim et al., 2011)으로 혼합하지 않은 상태의 흑마늘과 가르시니아 캄보지아 추출물 각각과 비교 분석하였다. 그 결과 흑마늘 가르시니아 혼합물의 경우 생리활성에 직·간접적으로 영향을 미칠 수 있는 무기성분 중 칼륨 (143 ppm), 인 (58 ppm), 마그네슘 (47 ppm), 황 (32 ppm), 그리고 아연 (1.1 ppm) 순으로 함유되어 있으며, 또한 혼합하지 않은 상태의 흑마늘과 가르시니아 캄보지아 추출물들에 비해 다소 높은 무기성분 함량을 나타내었다 (Table 2).

#### 3T3-L1 지방전구세포의 생존율에 미치는 마늘 추출물의 영향

흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG) 처리에 따른 3T3-L1 지방전구세포의 생존율을 알아 보기 위하여 CCK-8 assay를 실시하였다. BGG 처리군에서 100 µg/ml의 농도까지는 단일 흑마늘 추출물 (BG)과 가르시니아 캄보지아 추출물 (G)에서와 비슷하게 증식억제 효과가 거의 없는 것으로 나타났으며, 150 µg/ml 처리부터는 다소 증식억제 효과가 미미하게 관찰되는 결과에 의거하여 추출물 세 종류의 시료 모두에서 생존율 및 증식에 큰 영향을 미치지 않는 100 µg/ml의 농도까지를 실험 조건으로 설정하였다 (Fig. 1).

**Table 2.** Contents of minerals in Black Garlic Garsinia mixture (BGG), Black Garlic (BG), and *Garsinia cambogia* (G) extracts

| Minerals | (Unit: ppm) |     |              |
|----------|-------------|-----|--------------|
|          | BGG         | BG  | G            |
| Mg       | 47          | 34  | 15           |
| K        | 143         | 78  | 102          |
| Zn       | 1.1         | 0.9 | Not detected |
| P        | 58          | 24  | 45           |
| S        | 32          | 27  | 19           |

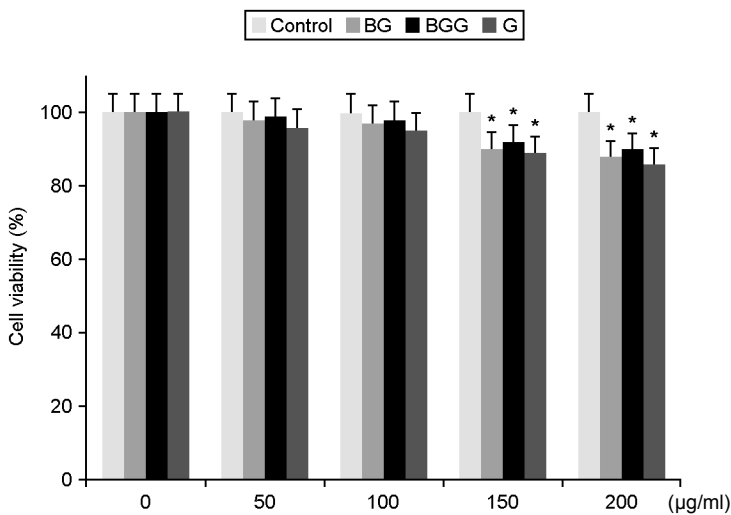
#### 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)이 3T3-L1 preadipocyte의 분화에 미치는 영향

흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)의 항비만 관련 효능을 검토하고자, 3T3-L1 preadipocyte에 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)과 흑마늘 추출물 (BG)를 각각 처리하여 지방세포 분화에 미치는 영향을 비교 검토하였다. Oil-Red O 염색을 통한 흡광도 측정에서 흑마늘 추출물만을 단독 처리하였을 경우 지방세포 내 지방 축적 저해에는 크게 영향을 미치지 못하는 양상을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 최근 박 등 (Park et al., 2011)이 보고한 결과와도 일치하는 경향을 보였다. 하지만, 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)를 처리하였을 경우에는 현격하게 지방세포의 분화가 저해되는 양상을 확인할 수 있었으며 (data not shown), 또한 세포 내 지방 축적도 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이는 C57BL/6J mice에서 고지방 식이에 의한 체중 증가의 감소 효과가 있다고 알려져 있는 가르시니아 캄보지아 추출물의 기능이 주로 작용한 것으로 추측할 수 있다 (Kim et al., 2008).

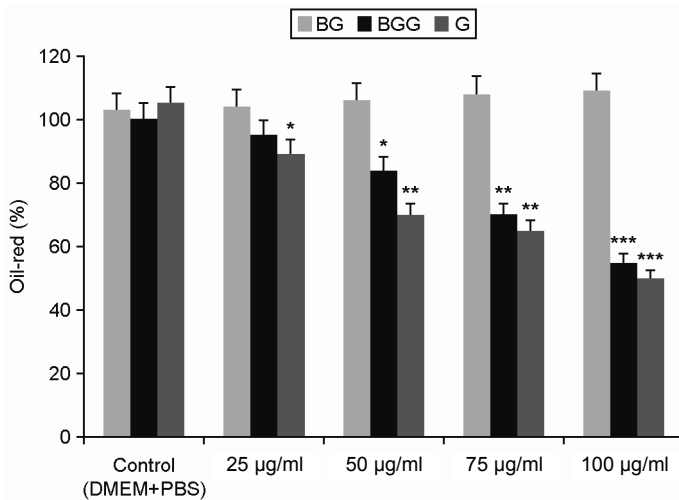
특히 의성 흑마늘 추출물이 혼합되어진 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)의 경우, 가르시니아 캄보지아 원료만 단독 처리한 경우와 Oil-red O 염색을 통한 흡광도 변화 기울기가 거의 유사한 양상을 보임으로서 세포 내 지방 축적 억제 효과가 비슷한 것으로 추측되는 바, 흑마늘 추출물과의 혼합 속성에 의해 가르시니아 캄보지아 추출물이 가지는 adipogenesis 저해 효과가 다소 상승되었음을 의미하며, 이에 관한 정확한 기작규명에 대해서 추가 연구가 필요하다 (Fig. 2).

#### 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)에 의한 지방세포 분화 조절 유전자의 발현

지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 adipogenesis 과



**Fig. 1.** Inhibition of cell growth of 3T3-L1 preadipocyte cells by black garlic extract (BG), black garlic and garcinia mixture (BGG), and garcinia cambogia extract (G). 3T3-L1 preadipocyte cells were treated with the indicated concentrations of BG, BGG, and G for 48 hr and cell viability was estimated by a CCK-8 assay. \* $P < 0.05$ , compared with relative control as determined by student's  $t$  test.

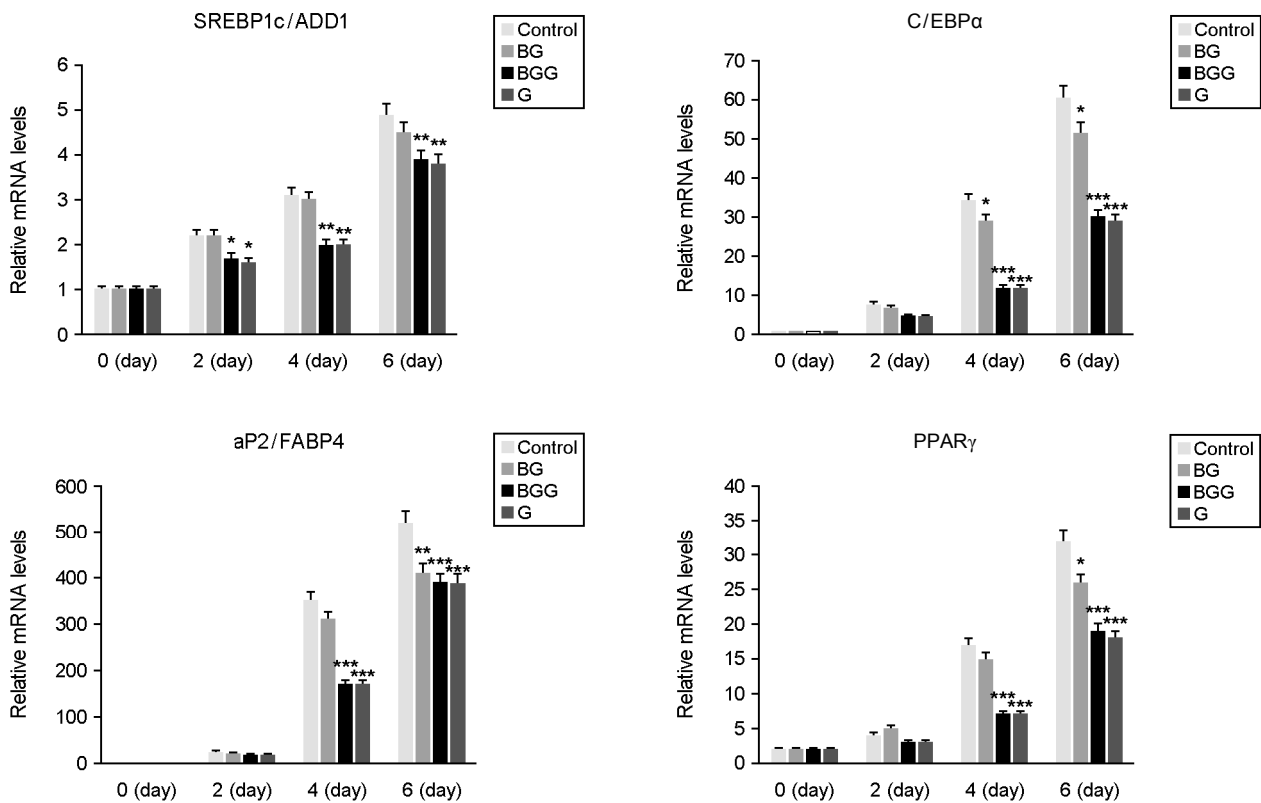


**Fig. 2.** Comparisons of lipid of adipocytes between BG, BGG and G compounds. 3T3-L1 preadipocytes were differentiated by Dex/IBMX/insulin treatment. On the first day of differentiation, the cells were treated with black garlic extract (BG), black garlic and garcinia mixture (BGG), and *Garcinia cambogia* extract (G) by the indicated concentration. During adipocyte differentiation, BG, BGG and G compounds were continuously treated when the medium were changed. After fully differentiated, the lipid was stained by Oil-Red O method. The quantification of lipid of adipocytes was determined by Oil-Red O content. After staining, the Oil-Red O was extracted by 100% of isopropanol and measured the absorbance at 500 nm. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , compared with relative control as determined by student's  $t$  test.

정은 많은 종류의 전사조절인자들의 단계적인 조절에 의해 유발되는 것으로 알려지고 있다 (Eljack et al., 1999). 특히 이러한 전사인자들 중에서 C/EBP (Fox et al., 2006) 및 PPAR family가 주요 역할을 하는 것으로 알려지고 있다 (Hamm et al., 2001). 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)에 의해 3T3-L1 preadipocyte의 지방분화 정도가 감소함을 확인한 상기 결과가 실제 지방 생합성에 관여하는 주요 유전자의 발현에 기인하는지를 규명하기 위하여, 주요 adipogenic transcription factor에 포함되는 SREBP1c, C/EBP $\alpha$ , aP2/FABP4와 PPAR $\gamma$ 의 유전자 발현 양상을 분석하였다.

흑마늘 추출물 (BG), 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG), 가르시니아 캄보지아 추출물 (G)을 각각 100 µg/ml로 처

리하면서 각 분화 단계에서 유전자 발현 정도를 real-time PCR을 통해서 확인하였다. 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)과 가르시니아 캄보지아 추출물 (G)를 처리하였을 경우, 유사한 경향성을 나타내었으며, 각각 흑마늘 단독 처리 시에 비해 처리 농도가 증가함에 따라 지방세포의 분화를 조절하는 4종류의 master 전사조절인자들의 발현이 모두 유의적으로 현저히 감소되는 양상을 확인할 수 있었다. 이로부터 흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)은 흑마늘 추출물을 단독 처리했을 때 보다 지방세포로의 분화를 억제시킬 수 있는 효과가 강화되었다고 추정할 수 있다 (Fig. 3).



**Fig. 3.** Effects of BG, BGG and G compounds on the expression of adipogenic genes during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. 3T3-L1 preadipocytes were differentiated by Dex/IBMX/insulin treatment. On the first day of differentiation, the cells were treated with 100  $\mu$ g/ml of three compounds, respectively. On the indicated day, total RNA was purified by Trizol method and cDNA synthesis for real-time PCR analysis. One  $\mu$ g of the cDNA was added into real-time PCR mixture. Real-time PCR were carried out by ABI thermocycler. The actin gene was used for input control. \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001, compared with relative control as determined by student's  $t$  test.

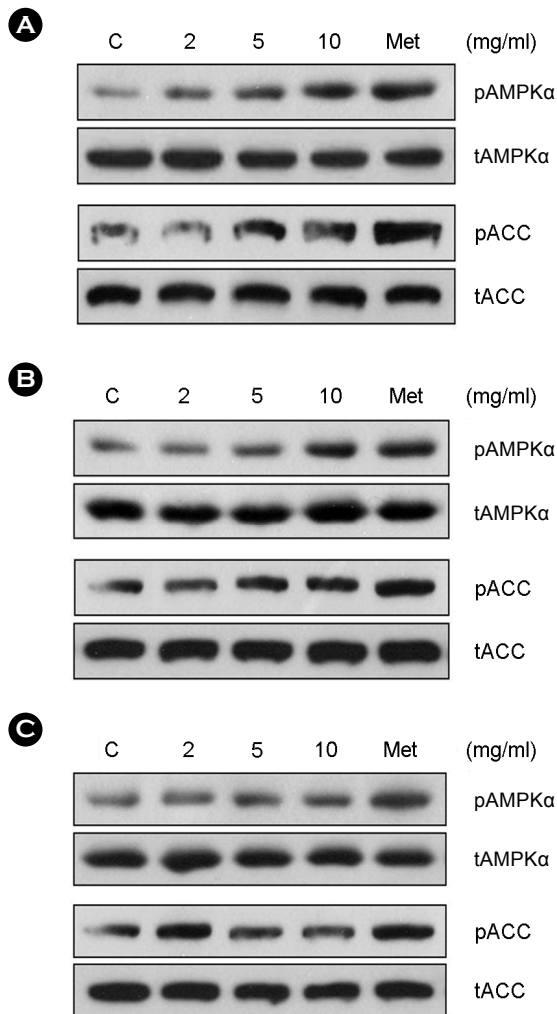
### 흑마늘 가르시니아 혼합물이 AMPK 활성화에 미치는 영향

흑마늘 가르시니아 혼합물 (BGG)이 지방산 산화와 관련된 주요 효소인 AMP activated protein kinase (AMPK) 활성화에 미치는 영향을 L6 세포주를 활용하여 분석하였다. 활성화된 AMPK는 몇몇 하위 단계에 있는 기질을 인산화하여 지방산 콜레스테롤 합성과 같은 ATP 소비경로를 차단하면서, 지방산 산화나 당분해와 같은 ATP 생성경로를 활성화 시키는 것으로 알려지고 있다. 특히 지질 대사와 관련된 AMPK의 중요한 조절기작은 단백질 인산화를 통해 Acetyl-CoA carboxylase (ACC) 효소 활성을 억제함으로써 지방산 산화 증가에 따른 체지방 감소에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 또한 L6 세포주는 비만 발생 시 AMPK 활성화도가 일반적으로 낮은편으로 알려지고 있어 이를 이용한 흑마늘 가르시니아 혼합물의 AMPK 발현 양상에 미치는 영향을 검토하였다 (Kim et al., 2001).

흑마늘 가르시니아 혼합물을 처리 최적 농도를 결정하고자 CCK-8 assay를 통한 L6 세포의 생존율을 검토한 결과 BGG 처리군에서 10 mg/ml의 농도까지는 단일 흑마늘 추출물 (BG)과 가르시니아 캄보지아 추출물 (G)에서와 비슷하게 증식억제 효과가 거의 없는 것을 확인하여 이를 실험 조건으로 설정하였다 (data not shown).

흑마늘 가르시니아 혼합물을 처리하였을 경우 처리 농도가 2, 5, 10 mg/ml로 증가함에 따라 농도 의존적으로 활성이 증가되는 양상을 확인하였으며, 흑마늘 추출물 단독 처리 시 (A)에도 다소 비슷한 양상을 나타내었다 (Fig. 4). 하지만 가르시니아 캄보지아 추출물 단독으로 처리하였을 경우 (C)는 AMPK가 거의 활성화 되지 않은 양상을 나타내었다. 이로 보아 흑마늘 추출물이 지방산 산화에 영향을 줄 수 있는 후보물질로 판단되며 이는 흑마늘에 함유된 황화아미노산 등의 성분과 관련될 것으로 추측된다 (Fig. 4).

상기 결과를 종합해 볼 때 흑마늘과 가르시니아 캄보



**Fig. 4.** Effect of BG, BGG and G compounds on phosphorylation of AMPK $\alpha$  and ACC. L6 cells were treated with various concentration (2, 5, 10 mg/ml) of black garlic extract (BG), black garlic and garcinia mixture (BGG), and garcinia cambogia extract (G). Western blotting analysis for phosphorylated ACC (p-ACC), total ACC (t-ACC), AMPK $\alpha$  phosphorylated on Thr172 (p-AMPK $\alpha$ ) and total AMPK $\alpha$  (t-AMPK $\alpha$ ) was examined as described in Materials and Methods. Phosphorylation of AMPK $\alpha$  was increased by (A) BG and (B) BGG for 2 h in L6 cells without changing total AMPK $\alpha$  levels, respectively, however, not influenced by (C).

지아 추출물과의 복합 숙성을 통해 제조된 흑마늘 가르시니아 복합 조성물 (BGG)은 기존 흑마늘 추출물에서 나타나는 지방 산화 과정인  $\beta$ -oxidation과 관련된 AMPK를 활성화 시킬 뿐만 아니라, 저농도에서도 지방세포 생합성을 억제하는 기능까지 강화된 천연물 후보소재로 향후 항비만 관련 식품으로의 활용이 가능할 것으로 유추되며, 상세한 작용기작규명을 위해서는 후속 연구가 필요한 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

본 연구는 지식경제부에서 시행하는 지역연고산업육성사업 (RIS)의 일환으로 경운대학교 RIS 사업단 (B0011538)의 지원을 받아 수행한 결과입니다.

#### REFERENCES

- Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 1999. 1: 125-129.
- Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 2005. 50: 645-651.
- Chauhan NB. Anti-amyloidogenic effect of *Allium sativum* in Alzheimer's transgenic model Tg2576. *J Herb Pharmacother.* 2003. 3: 95-107.
- Eljack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR gamma and C/EBP alpha. *J Biol Chem.* 1999. 274: 7946-7951.
- Elmendorf JS, Chen D, Pessin JE. Guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTP gamma S) stimulation of GLUT4 translocation is tyrosine kinase-dependent. *J Biol Chem.* 1998. 273: 13289-13296.
- Fox KE, Fankell DM, Erickson PF, Majka SM, Crossno Jr. JT, Klemm DJ. 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 gamma2. *J Biol Chem.* 2006. 281: 40341-40353.
- Goncagul G, Ayaz E. Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*). *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 1999. 5: 91-93.
- Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBP beta in regulating peroxisome proliferator activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2001. 276: 18464-18471.
- Han SH, Sakuma I, Shin EK, Koh KK. Antiatherosclerotic and anti-insulin resistance effects of adiponectin: basic and clinical studies. *Prog Cardiovasc Dis.* 2009. 52: 126-140.
- Janderova L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR. Human mesenchymal stem cells as an *in vitro* model for human adipogenesis. *Obes Res.* 2003. 11: 65-74.
- Jang EK, Seo JH, Lee SP. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) Extract. *Korean J Food Sci Technol.* 2008. 40: 443-448.
- Jung YM, Lee SH, Lee DS, You MJ, Chung IK, Cheon WH,

- Kwon YS, Lee YJ, Ku SK. Fermented garlic protects diabetic, obese mice when fed a high-fat diet by antioxidant effects. *Nutrition Research*. 2011. 31: 387-396.
- Kim IH, Jeong CH, Park SJ, Shim KH. Nutritional components and antioxidative activities of Jujube (*Zizyphus jujuba*) fruit and leaf. *Korean J Food Preserv*. 2011. 18: 341-348.
- Kim JM, Yoon MY, Choi SL, Kang IS, Kim SS, Kim YS, Choi YK, Ha JH. Effects of stimulation of AMP-activated protein kinase on insulin-like growth factor 1 and epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem*. 2001. 276: 19102-19110.
- Kim KY, Lee HN, Kim YJ, Park T. Garcinia cambogia extract ameliorates visceral adiposity in C57BL/6J mice fed on a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008. 72: 1772-1780.
- Kook S, Kim GH, Choi K. The antidiabetic effect of onion and garlic in experimental diabetic rats: meta-analysis. *J Med Food*. 2009. 12: 552-560.
- Mahmoodi M, Islami MR, Asadi Karam GR, Khaksari M, Sahebghadam Lotfi A, Hajizadeh MR, Mirzaee MR. Study of the effects of raw garlic consumption on the level of lipids and other blood biochemical factors in hyperlipidemic individuals. *Pak J Pharm Sci*. 2006. 19: 295-298.
- Mathew BC, Prasad NV, Prabodh R. Cholesterol-lowering effect of organosulphur compounds from garlic: a possible mechanism of action. *Kathmandu Univ Med J*. 2004. 2: 100-102.
- Park JA, Han MH, Kim BW, Chung YH, Choi YH. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by aged black garlic extracts in 3T3-L1 preadipocytes, *J. Life Science*. 2011. 21: 720-728.
- Rajasree CR, Rajmohan T, Augusti KT. Antiatherogenic and antiperoxidative effects of garlic and soy proteins in alcohol fed rats. *Indian J Exp Biol*. 2009. 47: 169-175.
- Reinhart KM, Talati R, White CM, Coleman CI. The impact of garlic on lipid parameters: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Res Rev*. 2009. 22: 39-48.
- Seki T, Hosono T, Hosono-Fukao T, Inada K, Tanaka R, Ogihara J, Ariga T. Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2008. 17: 249-252.
- Wang HC, Yang JH, Hsieh SC, Sheen LY. Allyl sulfides inhibit cell growth of skin cancer cells through induction of DNA damage mediated G2/M arrest and apoptosis. *J Agric Food Chem*. 2005. 58: 7096-7103.
- Ziemke F, Mantzoros CS. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr*. 2007. 91: 258-261.
-