

세포배양 모델을 통한 함초(*Salicornia herbacea* L.) 물 추출물의 항비만 효과 탐색

김미정 · 전현영 · 김정희[†]

서울여자대학교 자연과학대학 식품영양학과

Antiadipogenic Effect of Korean Glasswort (*Salicornia herbacea* L.) Water Extract on 3T3-L1 Adipocytes

Mi Joung Kim, Hyun Young Jun, and Jung Hee Kim[†]

Dept. of Food and Nutrition, College of Natural Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

ABSTRACT As a natural plant ingredients, glasswort (*Salicornia herbacea* L.) contains various physiological activities, mainly anti-oxidative and anti-diabetic activities. However, only a few studies have been carried out on its anti-adipogenic effect. This study investigated the anti-obesity effects of *Salicornia herbacea* L. on 3T3-L1 adipocytes. As adipogenesis of preadipocytes to adipocytes involves proliferation and differentiation of cells, we treated three concentrations (125, 250, and 500 µg/mL) of *Salicornia herbacea* L. water extracts (SLW) in both pre-processing and post-processing stages. When 3T3-L1 adipocytes were differentiated and dyed with Oil Red O, adipocytes size and the value of relative Oil Red O staining were reduced by all concentrations of SLW in post-processing stage. Following adipogenic differentiation, the concentration of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the cell supernatant significantly increased upon treatment with 125 µg/mL of SLW and further rose at concentrations of 250 and 500 µg/mL during post-processing stage. There was no significant difference in glycerol production upon SLW treatment. Leptin production significantly decreased at all SLW concentrations during post-processing stage, whereas peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ) and adiponectin secretions were significantly enhanced. Overall results showed that SLW might have an anti-adipogenic effect via enhancement of TNF- α production, which causes dedifferentiation and inhibits lipid accumulations in adipocyte. Furthermore, SLW might prevent diabetes and cardiovascular disease, as it reduces leptin secretion and enhances production of both PPAR- γ and adiponectin. However, further research is needed to elucidate the exact mechanism and bioactive compounds of glasswort.

Key words: *Salicornia herbacea* L., adipocytes, antiadipogenic effect, TNF- α , leptin

서 론

우리나라는 경제성장에 의해 생활수준이 향상되고 식생활이 서구화 되면서 당질 및 식물성 식품의 섭취량은 감소하는 반면 동물성 식품 및 가공식품에 의한 지방 섭취의 비율이 증가하고 있으며, 이로 인한 비만 인구 역시 급속하게 증가하고 있다. 2010년 보건복지부가 발표한 '국민건강영양조사'에 따르면, 우리나라 성인 전체의 비만 유병률(만 19세 이상, 체질량 지수 25kg/m² 이상)은 30.8%로 1998년 26.0%에 비해 약 4.8%가 증가하였으며, 정상체중인 사람에 비해 비만인 사람에게서 고혈압, 당뇨병, 이상지질혈증이 동반될 위험이 2배 이상 높게 나타났다(1). 이처럼 비만 인구의 증가는 고혈압, 심혈관 질환, 당뇨병 등 비만과 관련된 만성질환의 증가로 이어져 개인만의 문제가 아닌 사회적,

경제적 문제로 대두되고 있다.

비만이란 섭취하는 열량에 비해 소모하는 열량이 적어 체내 지방량이 증가되는 대사성 질환으로 식습관, 운동부족 및 다양한 환경적, 유전적 요인이 관여된 복합증후군이다(2,3). 비만을 개선하기 위한 식사요법, 운동요법, 약물 및 수술요법 등 다양한 치료방법이 있으나, 화학 합성 물질을 기반으로 한 비만 치료제는 신경불안, 불면증, 두통, 어지러움, 혈압상승, 위장장애 등의 많은 부작용을 동반하는 것으로 알려져 있다(4). 따라서 최근에는 건강기능식품에 대한 관심이 높아지면서 보다 안전하고 부작용의 우려 없이 비만을 예방하기 위한 천연식품 소재에 대한 관심이 높아지고 있어 비만치료에 효능을 나타내는 기능성식품 소재의 탐색과 작용기전에 관한 연구가 요구되고 있는 실정이다.

천연물을 이용한 항비만 기능성 소재들로는 키토산, 이눌린, hydroxycitric acid(HCA), 식이섬유, catechin, capsaicin 등이 있으며(5-8), 대부분 지방의 소화흡수를 억제하거나 식욕을 억제하여 섭취되는 열량을 감소시키는 것에 기

Received 11 February 2014; Accepted 29 March 2014

[†]Corresponding author.

E-mail: jheekim@swu.ac.kr, Phone: +82-2-970-5646

인하고 있다. 이 밖에도 소화효소의 활성을 억제함으로써 탄수화물과 지방의 소화 및 흡수를 감소시키는 물질들도 항비만 소재로 이용되고 있다(9). 함초(*Salicornia herbacea* L.)는 우리나라 서해안이나 남해안, 제주도, 울릉도, 백령도 같은 섬지방의 바닷물이 닿는 해안이나 갯벌, 염전 주위에 무리지어 자란다. 우리말로는 통통하고 마디마다 튀어나온 풀이라고 하여 ‘통통마디’라고 부르고 있으며, 맛이 몹시 짜다고 하여 함초 또는 염초라고도 불린다. 함초는 내염성이 강하여 NaCl을 다량 함유하고 있으나 함초 100 g당 칼륨 2,083 mg, 마그네슘 110 mg, 칼슘 20 mg 등 다른 식품에 비해 천연 미네랄도 다량 함유하고 있다(10). 또한 식이섬유소 함량이 높아 콜레스테롤 및 당의 흡수를 억제시키고, 장내에서 식염과 결합하여 불필요한 장내 세균 및 발암물질을 신속하게 배설시키며 숙변을 제거해 주는 것으로 보고되고 있다(11). 그 밖에 필수아미노산과 불포화지방산이 풍부하며 예로부터 숙변을 없애고 변비, 소화불량, 위장병, 간염 및 신장병의 약재로도 이용되고 있다는 보고가 있다(12,13).

최근 천연조미료로서의 함초에 대한 관심이 높아지면서 함초가 갖는 여러 가지 생리활성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 항산화(11,14), 항암(15,16) 및 항당뇨병(17,18) 등에 관한 많은 연구들이 이루어지고 있는 실정이다. 그러나 대부분 연구가 항산화 및 항암효과에 집중되어 있으며, 최근 사회경제적으로 문제가 부각되고 있는 항비만 효과에 관한 연구는 부족하다. 비만과 관련하여 가장 많이 이용되는 세포는 3T3-L1 adipocyte로 preadipocyte가 성숙되기 위해서는 지방세포 수의 증식과정과 지방축적과정으로 나눌 수 있다. 따라서 본 연구에서는 한국산 함초(*Salicornia herbacea* L.)의 항비만 효과를 알아보고자 3T3-L1 adipocytes를 이용하였으며, 지방세포 증식단계와 지방축적단계 중 어느 단계에서 항비만 효과를 나타내는 지 알아보고자 한국산 함초 물 추출물의 처리시점을 지방분화 유도 처리 전과 후로 나누어 실험을 실시하였다. 또한 항비만 효과를 나타내는 함초 물 추출물 처리농도를 알아보고 지방세포 크기 및 지방축적 정도를 조사하였으며, 지방분화와 관련이 있는 다양한 adipokines의 생성량을 측정함으로써 함초의 항비만 효과 관련 기전을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 함초는 전라남도 신안군에서 채취한 함초를 대신함초(Shinan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 함초는 깨끗하게 세척하여 이를 -80°C deep freezer에서 5일 정도 얼린 후 동결건조기로 일주일간 건조하여 분쇄한 후 사용하였다.

함초 물 추출물 추출방법

세포배양모형을 통한 함초의 항비만 효과 탐색을 위한 시

료로 함초 물 추출물을 사용하였다. 동결건조 시킨 함초 분말 150 mg과 3차 증류수 20 mL를 알코올랩프로 직접 가열 교반하여 1시간 반 정도 추출한 후 여과하였다. 여과시킨 모든 추출물은 감압농축 하여 막자사발로 분쇄하여 conical tube에 밀봉하고, 냉동고(-18°C)에 보관하면서 사용하였다.

함초 물 추출물 처리농도 결정

함초 물 추출물의 처리농도 결정을 위해 세포독성효과가 나타나지 않는 최대허용량을 알아보려고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetraazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 세포독성검사를 실시하였다. 96 well plate에 3T3-L1 adipocytes 세포를 1×10^4 cells, 200 μ L/well로 넣고 24시간 배양한 후 배지액에 함초 물 추출물을 일반적 독성검사에서 최대허용량으로 사용하는 용량인 1,000 μ g/mL를 기준으로 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 μ g/mL 농도로 첨가하였으며, 총 물질 처리시간은 24시간, 48시간, 96시간으로 물질 처리시간별 세포독성을 알아보았다. 처리시간을 다르게 한 이유는 지방분화 유도과정 중 어느 단계에서 함초 물 추출물이 효과를 미치는지 알아보려고 물질을 지방분화 유도 처리 전과 후로 나누어 실험을 실시하였는데, 이때 세포가 물질에 노출되는 시간이 다르기 때문에 최대 노출시간인 96시간까지의 세포 독성을 알아보려고 하였다. 물질 처리 완료 후 MTT 용액(5 mg/mL in PBS)을 well당 20 μ L씩 넣고, 37°C의 5% CO₂ incubator(MODEL 5410, Napco Precision Scientific Inc., Chicago, IL, USA)에서 4시간 동안 배양하였다. 배양종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co.) 150 μ L를 가하여 생성된 formazan 결정을 용해시킨 후 540 nm에서 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 물질을 처리하지 않은 well의 흡광도를 기준으로 한 상대적 비율로 계산하여 나타냈다.

3T3-L1 세포배양과 분화

실험에 사용된 3T3-L1 adipocytes로 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)으로 부터 구입하여 사용하였으며, 세포배양에 사용된 모든 배지와 시약은 Gibco Co.(Rockville, MD, USA)로부터 구입하였다. 6 well plate에 3T3-L1 adipocytes 세포(1×10^5 cells)를 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% calf serum, 1% penicilin을 첨가한 배지에 섞어 3 mL/well로 넣고 5% CO₂ incubator(MODEL 5410, Napco Precision Scientific Inc.)에서 5일간 배양하였다. DMEM에 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicilin을 첨가한 배지에 MDI(3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone 및 insulin)를 처리하여 2일간 배양하였다. 그 후 FBS 배지에 insulin을 한 번 더 처리하여 2일간 배양하였고, FBS 배지

교체 후 6일간 분화를 유도하였다.

합초 물 추출물 시료는 전처리와 후처리로 나누어 처리하였는데, 지방분화 유도를 위한 MDI 및 insulin 처리 전 세포 증식과정 중 합초 물 추출의 효과를 알아보기 위해 MDI 처리 하루 전부터 지방분화 유도 과정마다 합초 물 추출물을 농도별로 각각의 FBS 배지에 섞어서 처리하였으며, 지방분화 유도 후 지방축적 과정 중 합초 물 추출물의 효과를 알아보기 위한 후처리는 insulin을 처리하여 2일간 배양한 후 새 배지로 교체할 때 물 추출물을 농도별로 FBS 배지에 섞어서 처리하였다. 3T3-L1 adipocytes의 세포분화 및 지방축적에 미치는 adipokine 분석을 위해 분화가 종료된 후 상등액을 e-tube에 잘 분주하여 -80°C deep freezer에서 보관하였다가 분석 시 꺼내어 사용하였다.

Oil Red O 염색

지방분화 정도의 변화를 살펴보기 위해 배지액을 제거한 분화된 세포에 Oil Red O 염색을 실시하였다. 우선 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후 10% formalin 용액을 5분간 처리하고 다시 formalin을 이용하여 1시간 정도 고정 처리하였다. 70% isopropanol로 세척하여 말린 후 Oil Red O working solution(1 mL/1 well)을 1시간 동안 염색 처리하고 3차 증류수로 4회 washing하여 광학현미경으로 염색된 지방세포를 관찰하였다.

지방분화도 변화 측정

Oil Red O 염색 후 3차 증류수로 washing한 plate를 24시간 동안 상온에서 건조시킨 후 각 well에 DMSO 1 mL를 가하여 염색시약을 모두 녹였다. Oil Red O 염색시약을 녹인 각각의 DMSO 용액을 96 well plate에 200 µL씩 넣고 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다.

Glycerol 농도 측정

지방의 분해 가수산물인 glycerol 농도는 지방분화 종료 후 수집한 3T3-L1 세포의 상등액(media)을 이용하여 분석하였으며, glycerol cell-based assay kit(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices)로 측정하였다.

지방세포 분화 관련 cytokines 농도 측정

지방조직에서 발현되며, 지방세포 분화에 영향을 미치는 것으로 알려진 tumor necrosis factor(TNF)- α , resistin, peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ)와 인슐린 저항성 및 심혈관계 질환과 관련이 있는 것으로 알려진 leptin과 adiponectin 농도는 3T3-L1 세포 지방분화 종료 후 수집한 상등액을 이용하여 분석하였다. TNF- α , resistin, PPAR- γ , leptin과 adiponectin 농도는 각각 상업용 kit[TNF- α : TNF- α mouse enzyme immunoassay

(EIA) kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), resistin: mouse resistin enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(RayBio, Norcross, GA, USA), PPAR- γ : mouse PPAR- γ ELISA kit(Cusabio Biotech Co., Ltd., Wilmington, DE, USA), leptin: leptin mouse/rat EIA kit(SPI-Bio, Montigny-le-Bretonneux, France), adiponectin: adiponectin mouse EIA kit(Invitrogen)]을 사용하였으며, ELISA법으로 plate reader를 이용하여 측정하였다.

통계처리

각 실험을 통해 얻어진 유효성 결과는 Statistical Analysis System(SAS, version 9.1, SAS Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 통계 처리하였다. 모든 측정치는 평균과 표준편차로 표시하였으며, 합초 물 추출물의 농도별 및 처리시기별 효과의 차이를 알아보기 위해 분산분석(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 실시하여 $\alpha=0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

합초 물 추출물의 일반성분 및 미량성분 함량 분석

본 연구에 사용된 합초 물 추출물의 영양성분은 '한국식품연구원'에서 검사하여 Table 1에 제시하였다. 분석 결과 다른 영양성분에 비해 탄수화물(36.8 g/100 g)의 함량과 회분(52.2 g/100 g)의 함량이 매우 높았다. 반면 열량은 182 kcal/100 g으로 낮은 수치를 나타냈는데, 이는 합초 내 많이 함유되어 있는 식이섬유소에 의한 영향으로 사료된다. 식이섬유의 섭취는 장의 연동운동 중 영양소의 이동을 둔화시켜 지질의 흡수율을 감소시키며, 체내 일부 영양소와 결합하여 배출함으로써 비만 억제 효과를 야기한다고 보고되고 있다(19,20). Kim 등(21)에 의하면 야콘 분말에 함유된 식이섬유소인 inulin과 fructo-oligo 당은 지방조직의 체지방 형성

Table 1. Nutrient composition and mineral contents of *Salicornia herbacea* L. water extract

		<i>Salicornia herbacea</i> L. water extract
Nutrient	Calories (kcal/100 g)	182
	Moisture (g/100 g)	3.5
	Fat (g/100 g)	0.9
	Protein (g/100 g)	6.6
	Ash (g/100 g)	52.2
	Carbohydrate (g/100 g)	36.8
Mineral	Al (mg/kg)	23.0
	Ca (mg/kg)	1,740
	Fe (mg/kg)	108.2
	K (mg/kg)	37,650
	Mg (mg/kg)	10,530
	Mn (mg/kg)	94.62
	Na (mg/kg)	181,200
	P (mg/kg)	5,624

을 억제함으로써 항비만 효과 및 체내 지질대사 개선과 심혈관계 질환 예방 효과가 있는 것으로 사료된다고 보고하였다.

‘한국기초과학연구원’에서 함초 물 추출물의 미량성분 함량을 분석한 결과(Table 1)를 살펴보면, Na의 함량은 181.2 g/kg, K은 37.65 g/kg으로 그 함량이 매우 높은 것을 볼 수 있으며, 이외에도 Mg, P, Ca 등의 성분이 풍부하게 존재하는 것을 확인할 수 있었으며, Kim과 Song(10)의 함초 내 무기질 양보다 약 8~9배 높은 것으로 나타났다. 이는 추출과정으로 인해 무기질이 농축된 결과로 사료된다.

함초 물 추출물 농도 및 처리시간에 대한 3T3-L1 adipocytes의 생존율

본 연구에서는 항비만 효능 연구에 많이 이용되는 3T3-L1 adipocytes 세포를 이용하여 함초 물 추출물의 지방분화 억제 정도를 살펴보고자 하였다. 이에 앞서 우선 함초 물 추출물의 처리농도를 결정하기 위해 MTT colorimetric assay 방법을 이용하여 지방세포의 사멸 정도를 살펴보았다(22). 함초 물 추출물을 농도별(0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/mL)로 24시간, 48시간, 96시간 동안 처리하여 알아본 3T3-L1 adipocytes의 생존율은 Fig. 1에 나타내었다. 함초 물 추출물을 처리하지 않은 대조군의 생존율을 100%로 보았을 때, 추출물 농도 1,000 µg/mL로 24시간 처리 시 95.4%, 48시간 처리 시 69.8%, 96시간 처리 시에는 80.7%로 세포 생존율이 크게 감소하여 일부 세포독성이 있는 것으로 나타났다. 함초 물 추출물은 31.25 µg/mL 농도에서부터 24시간 처리 시에 비해 48시간과 96시간 처리 시 서서히 세포 생존비율이 감소하는 것을 볼 수 있는데, 이는 물질 처리시간이 길어짐에 따른 결과로 사료된다. 따라서 함초 물 추출물의 고농도는 48시간 처리 시 생존율이 크게 감소한 1,000 µg/mL 농도를 제외하고, 모든 처리시간에서 80% 이상 생존율을 보인 500 µg/mL를 고농도로, 중간농도

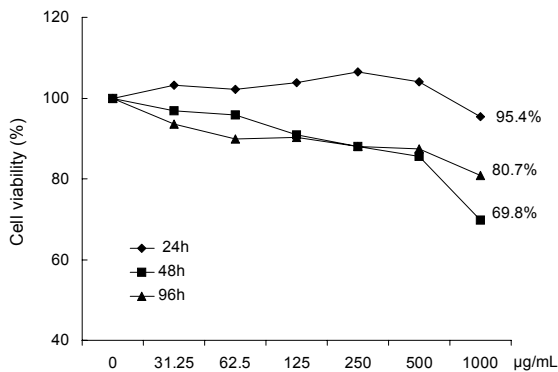


Fig. 1. Effects of 24, 48, 96 hours treatment of *Salicornia herbacea* L. water extract on cell viability of 3T3-L1 adipocytes. The cells were incubated during differentiation with various concentrations of *Salicornia herbacea* L. water extract. The cell viability was determined by MTT assay. The values were calculated as a percentage of cell viability of the non-treated adipocyte cells. Each value is expressed as the mean of four independent experiments.

는 250 µg/mL, 저농도는 125 µg/mL로 범위를 설정하였다.

함초 물 추출물 처리시기에 따른 지방축적 억제 효과

함초 물 추출물 처리시기(전처리, 후처리)에 따른 지방분화 억제 정도를 알아보기 위해 3T3-L1 adipocytes 세포를 MDI로 2일간, 그 후 insulin으로 한 번 더 2일간 처리한 뒤 6일간 분화를 유도한 후(23,24), Oil Red O 시약으로 염색하여 관찰한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. Oil Red O 염색시약은 중성지방 및 cholesterol ester만을 염색하며 그 외 유리지방산과 인지질 등은 염색이 되지 않는데, 지방분화로 인해 축적된 대부분의 지질은 중성지방이므로 지방분화 정도를 살펴볼 수 있다(25). 10×10배율 광학현미경으로 분화된 3T3-L1 지방세포를 관찰한 결과 함초 물 추출물을 후처리 하였을 때 분화된 지방세포 크기가 감소하는 것을 형태학적으로 관찰할 수 있었으며 지방세포의 수에는 차이를 나타내지 않았다.

함초 물 추출물이 처리시기에 따라 지방세포의 지방축적에 미치는 효과를 알아보기 위해 염색한 Oil Red O 시약을 녹여 흡광도를 측정하고 그 농도를 비교해 보았다. 함초 물 추출물 전처리 시 3T3-L1 adipocytes의 지방축적 변화를 Fig. 2(A)에 나타내었다. 함초 물 추출물을 처리하지 않은 전처리 대조군의 지방축적도를 100%로 보았을 때, 물 추출물 저농도인 125 µg/mL와 중간농도인 250 µg/mL에서는 지방축적에 차이가 없었으나 고농도인 500 µg/mL 농도에서는 80.5%로 지방축적이 억제되었다. 그러나 이는 전처리로 인하여 3T3-L1 지방세포가 고농도의 함초 물 추출물에 장시간 노출되어 나타난 결과일 가능성도 배제할 수 없다.

함초 물 추출물 후처리 시 3T3-L1 adipocytes의 지방축적 변화는 Fig. 2(B)에 제시하였다. 함초 물 추출물을 처리하지 않은 후처리 대조군의 지방축적도를 100%로 보았을 때 함초 물 추출물 후처리 시에는 처리시간에 따른 세포독성의 영향이 거의 없는 저농도와 중간농도에서 81.7%와 84.7%로 지방축적 정도가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 위의 결과를 토대로 함초 물 추출물은 지방세포 분화 유도 전보다는 분화 유도 후의 지방축적 과정에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

함초 물 추출물의 leptin 및 adiponectin 생성 정도에 미치는 영향

3T3-L1 세포를 지방분화 시킨 후 수집한 상등액 중 leptin 및 adiponectin 농도에 대한 결과는 Table 2에 제시하였다. Leptin은 주로 지방세포에서 생성, 분비되는 단백질로 시상하부에 작용하여 식욕을 억제하고 여러 가지 대사활동으로 에너지 소비를 증가시켜 비만을 조절하는 호르몬이다(26). 지방세포 내 지방축적량이 높을수록 leptin의 분비량이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 혈중 leptin 농도는 체지방량을 나타내는 지표로 비만연구에 많이 사용되고 있다(27). *In vitro*에서도 지방세포의 지방축적에 비례하여 lep-

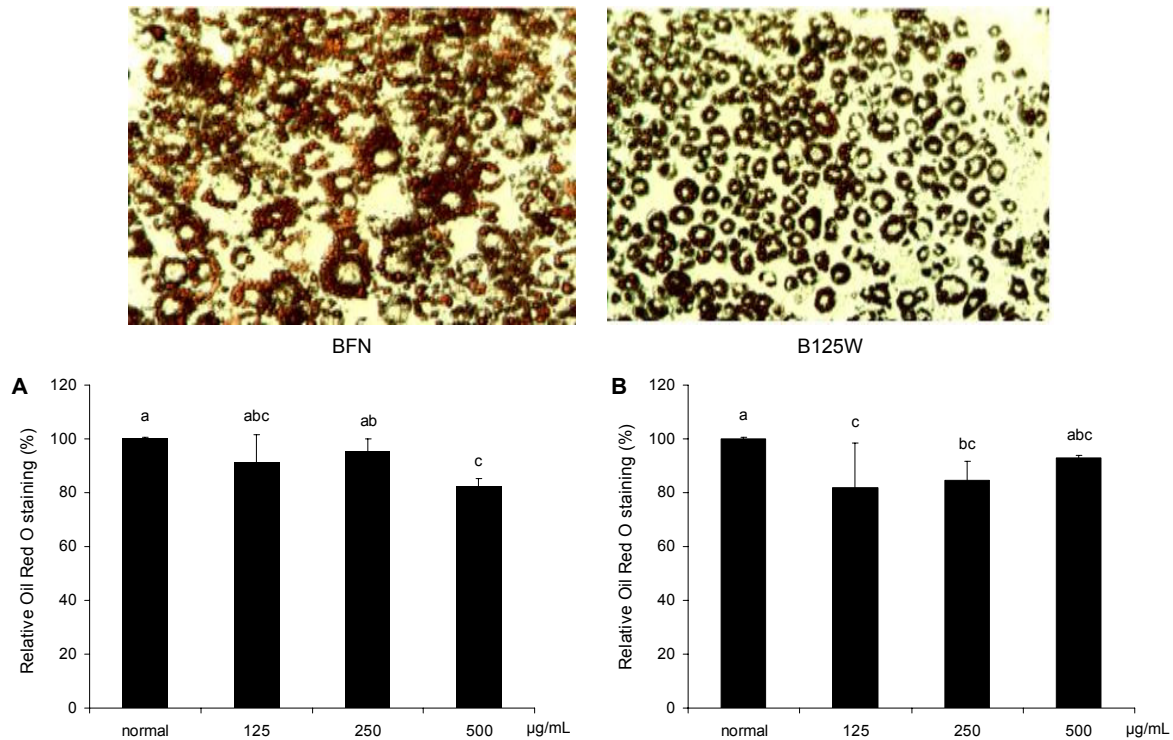


Fig. 2. Effects of various concentration of *Salicornia herbacea* L. water extract on lipid accumulation during adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. BFN: normal group without *Salicornia herbacea* L. water extract (SLW) treatment during post-processing, B125W: SLW 125 µg/mL treatment group during post-processing. A: pre-processing, B: post-processing. Values are mean±SD of four independent experiments and bars with the different letters (a-c) are significantly different among groups at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 2. Effect of *Salicornia herbacea* L. water extract on leptin and adiponectin secretions of 3T3-L1 adipocytes¹⁾

Group	Leptin (pg/dL)	Adiponectin (ng/mL)	Group	Leptin (pg/dL)	Adiponectin (ng/mL)
AFN	7,717.08±417.27 ^{NS}	3,799.20±1,157.88 ^{NS}	BFN	2,199.38±92.81 ^a	1,185.70±1,531.63 ^b
A125W	5,144.69±689.13	4,115.90±1,388.87	B125W	990.00±290.92 ^b	2,733.63±317.46 ^a
A250W	6,094.69±1,504.00	4,585.39±777.39	B250W	1,071.25±98.03 ^b	3,017.81±72.62 ^a
A500W	6,040.00±3,125.93	4,032.74±1,034.46	B500W	1,443.13±337.33 ^b	3,205.74±346.45 ^a

AFN: normal group without *Salicornia herbacea* L. water extract (SLW) treatment during pre-processing. BFN: normal group without SLW treatment during post-processing. A125W: SLW 125 µg/mL treatment group during pre-processing. A250W: SLW 250 µg/mL treatment group during pre-processing. A500W: SLW 500 µg/mL treatment group during pre-processing. B125W: SLW 125 µg/mL treatment group during post-processing. B250W: SLW 250 µg/mL treatment group during post-processing. B500W: SLW 500 µg/mL treatment group during post-processing.

¹⁾Values are mean±SD of four independent experiments.

^{a,b}Means with the different superscripts are significantly different among groups within same column at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. NS: not significantly different.

tin의 분비가 증가한다고 보고되고 있는데(28), 본 연구 결과 함초 물 추출물 후처리 시 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 모든 농도에서 leptin의 양이 유의적으로 감소하였으며, 특히 최소농도인 125 µg/mL에서 가장 크게 leptin의 농도가 감소하였다. 이는 함초 물 추출물을 후처리하였을 때 지방축적의 감소 효과에 의한 것으로 사료된다. Kwon 등(29)에 의하면 식이섬유 물질 중 하나인 펙틴은 3T3-L1 adipocytes 세포에서 leptin의 분비를 유의적으로 억제시킨다고 보고되어 비슷한 결과를 나타내었다.

Adiponectin은 지방세포에서만 생성 및 분비되는 특이적

인 호르몬으로, 비만한 사람에게서 발현양이 감소하며, adiponectin 농도 감소는 심혈관계 질환의 위험을 증가시키는 연관성이 보고되고 있다(30,31). 3T3-L1 세포를 지방분화시킨 후 수집한 상등액 중 adiponectin 농도를 살펴본 결과, 함초 물 추출물 후처리 시 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 모든 농도에서 adiponectin의 양이 유의적으로 증가했으며, 특히 함초 물 추출물의 첨가 농도에 따라 adiponectin의 농도가 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있다. 이는 함초 물 추출물이 지방의 축적을 억제함으로써 adiponectin 분비 증가에 영향을 미친 것으로 사료되며, 나아가 심혈관 질환의

Table 3. Effect of *Salicornia herbacea* L. water extract on glycerol production of 3T3-L1 adipocytes¹⁾

Group	Glycerol (µg/mL)	Group	Glycerol (µg/mL)
AFN	47.60±15.37 ^{NS}	BFN	21.92±7.61 ^{NS}
A125W	51.54±11.15	B125W	28.27±6.80
A250W	56.86±11.63	B250W	29.52±9.70
A500W	41.44±19.93	B500W	31.88±10.71

Groups are the same as in Table 2.

¹⁾Values are mean±SD of four independent experiments.

NS: not significantly different.

예방 효과도 기대된다.

지방축적 억제에 관련한 glycerol 및 adipokine 분비량

지방세포가 성숙한 지방세포로 분화되기 위하여 지방축적이 필수적이다. 이때 지방축적에 관련된 기전으로는 지방합성 및 지방분해가 관여할 수 있는데 중성지방이 분해되면 free fatty acid와 glycerol로 분해가 되며, 지방의 분해가 잘 일어날수록 지방세포에서 glycerol의 분비가 많아져 배지의 glycerol 농도가 높아진다(32). 따라서 함초 물 추출물의 지방축적 억제 효과가 지방분해와 관련이 있는지 알아보기 위해 지방세포로부터 분비된 glycerol 농도를 측정하였다(Table 3). 그 결과 함초 물 추출물 전, 후처리 모두 모든 농도에서 glycerol 분비량에 유의한 효과를 나타내지 못하였고, 이는 함초 물 추출물의 지방축적 억제 효과가 지방분해보다는 지방합성에 관련되어 있을 가능성을 시사한다.

3T3-L1 세포를 지방분화 종료 후 수집한 상등액 중 TNF-α, resistin 및 PPAR-γ 농도에 대한 결과는 Table 4에 제시하였다. TNF-α는 대식세포에서 생성되는 염증성 cytokine의 하나로 지방세포에서도 발현되며 식욕감퇴 및 이화작용 촉진을 통해 체중감소를 유도하고, 인슐린 저항성을 촉진시키는 물질로 알려져 있다(33). 비만인 사람의 혈중 TNF-α 농도는 지방세포 증가로 인해 정상인에 비해 높음이 보고되고 있고(33), 이렇게 증가된 TNF-α는 지방세포에서 인슐린 신호전달을 억제하여 직접적으로 인슐린 저항성을 높이는 것으로 알려져 있다(34). 반면 TNF-α는 지방세포 분화 단계에서 지방세포의 탈분화를 유도하여 지방세포 내 중성지방의 양을 감소시키는 작용을 하는 것으로 보고되고 있다(35). 본 실험결과에서 함초 물 추출물을 세포분화 전에

전처리하였을 때에는 모든 농도에서 TNF-α 농도에 영향을 미치지 않았으나 세포분화 유도 후 후처리 시에는 125 µg/mL 농도에서 대조군에 비해 TNF-α 농도가 유의하게 증가하였다. 또한 다른 농도에서도 유의하지는 않지만 TNF-α 수준이 증가하는 경향을 보여 세포분화 유도 후 함초 물 추출물 처리에 의해 지방세포의 탈분화를 유도하는 TNF-α의 생성이 증가됨을 관찰할 수 있었다.

Resistin은 12.5-kDa의 cysteine 잔기 아미노산으로 구성된 단백질로 지방세포에서 분비되는 호르몬으로(36), 지방세포 조직에서 발현되어 비만에 의해 분비가 증가된다(37). Resistin 역시 인슐린 저항성과 관련이 있는 adipokine 중 하나로 알려져 있으며, adipogenesis에 관여함으로써 지방세포 분화를 억제하는 것으로 보고되고 있다(38). 또한 Shojima 등(39)은 TNF-α 및 혈당강하 물질에 의해 resistin의 발현이 억제된다고 보고하였다. 본 실험결과, 함초 물 추출물 전처리 시 지방세포에서 분비된 resistin의 농도가 함초 물 추출물 500 µg/mL 고농도 처리 시 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 함초 물 추출물 처리 농도에 따라 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 그러나 후처리 시에는 함초 물 추출물 처리에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 세포분화 유도 후 함초 물 추출물에 의해 분비가 증가된 TNF-α가 지방세포의 탈분화를 유도하면서 resistin의 발현을 억제하였을 가능성을 시사하고 있어 Shojima 등(39)의 TNF-α에 의해 resistin 발현이 억제한다는 결과와 일부 일치하는 것으로 사료된다.

지방세포 분화를 조절하는 대표적인 지방전사 조절인자인 peroxisome proliferator-activated receptors(PPARs)는 탄수화물과 지질 대사 조절에 관여하며, 특히 PPAR-γ는 지방세포 분화 및 지방 생합성을 촉진시키고 인슐린 민감성을 증가시키는 등 당대사에 관여한다(40). 본 실험결과 함초 물 추출물 후처리 시 모든 물질 처리농도에서 생성된 PPAR-γ의 농도가 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. Sharma 등(41)의 연구에서 감귤류의 flavonoids 중 하나인 naringin이 간과 신장의 PPAR-γ의 발현을 증가시켰다고 보고하고 있어 본 실험에 사용한 함초의 항산화 성분이 영향을 미쳤을 것으로 추정된다.

지방분화와 관련해서는 본 실험의 결과만으로는 함초 물

Table 4. Effect of *Salicornia herbacea* L. water extract on TNF-α, resistin, and PPAR-γ secretions of 3T3-L1 adipocytes¹⁾

Group	TNF-α (pg/mL)	Resistin (pg/mL)	PPAR-γ (pg/mL)	Group	TNF-α (pg/mL)	Resistin (pg/mL)	PPAR-γ (pg/mL)
AFN	1.04±0.63 ^{NS}	5,739.00±80.14 ^b	15,934.19±5,425.80 ^{NS}	BFN	0.59±0.00 ^b	6,142.33±14.14 ^{NS}	5,372.90±54.74 ^b
A125W	1.34±0.44	5,936.78±85.01 ^{ab}	16,418.06±5,442.88	B125W	1.58±0.43 ^a	5,997.89±136.23	10,160.00±1,094.88 ^a
A250W	1.19±0.28	5,985.67±141.37 ^{ab}	17,585.81±4,362.30	B250W	1.04±0.34 ^{ab}	5,981.50±168.66	10,947.10±1,192.97 ^a
A500W	1.68±0.77	6,022.33±170.90 ^a	15,708.39±4,490.37	B500W	1.29±0.59 ^{ab}	5,999.00±88.02	11,495.48±515.00 ^a

Groups are the same as in Table 2.

¹⁾Values are mean±SD of four independent experiments.

^{a,b}Means with the different superscripts are significantly different among groups within same column at P<0.05 by Duncan's multiple range test. NS: not significantly different.

추출물의 작용기전을 파악하기에는 명확하지 않다. 하지만 주목할 점은 함초 물 추출물을 세포분화 유도 후 처리하였을 때 지방세포의 탈분화를 유도하는 TNF- α 분비가 유의하게 증가함으로써 지방세포의 크기와 지방축적이 유의하게 감소하였다는 점이다. 이는 함초 물 추출물이 지방세포 분화 단계보다는 지방분화 후 더 효과적으로 작용하며, 또한 지방 분해보다는 지방생합성 단계를 조절함으로써 지방축적을 억제하는 것으로 여겨진다. 본 실험결과 함초 물 추출물 후처리 시 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 모든 농도에서 glycerol 분비량에 유의한 차이를 보이지 않은 것 역시 함초 물 추출물이 지방분해보다는 지방합성에 관련하여 지방세포의 지방축적을 억제할 가능성이 있음을 뒷받침한다. 또한 이러한 지방축적 감소로 인해 지방세포에서 분비되는 인슐린 저항성과 관련된 leptin 및 resistin 생성은 감소하였으며, adiponectin 및 PPAR- γ 의 생성은 증가한 것으로 나타났다. Maeda 등(42)은 PPAR- γ ligand가 지방세포에서 adiponectin의 발현을 증가시켜 체내 순환하는 혈중 adiponectin 농도를 증가시킨다고 보고하고 있으며, PPAR- γ 유사물질이 동맥경화의 혈관손상을 억제시키는 것으로 알려져 있다. 또한 Harmon 등(43)에 의하면 3T3-L1 세포에서 flavonoids 처리가 지방세포 분화를 억제하며, 특히 genistein은 insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation을 억제함으로써 지방분화 유도 후 지방축적을 감소시킨다고 보고하고 있다. 그리고 여러 함초의 항산화 기능에 관련된 연구에서 함초가 flavonoids를 함유하고 있다는 연구들이(16,44) 보고되고 있다. 따라서 함초의 flavonoids 성분이 지방합성을 억제하고, 심혈관계 질환 발생 및 인슐린 저항성 기전에 관여하는 여러 adipokine 생성에 영향을 미침으로 인슐린 저항성과 심혈관계 질환 예방 효과를 나타내고 있을 가능성이 있는 것으로 추측된다. 그러나 이를 명확하게 하기 위해서는 기능성 성분이 무엇인지 밝히고, 정확한 관련 기전에 대한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 염생식물의 하나인 한국산 함초(*Salicornia herbacea* L.) 물 추출물의 항비만 효과를 알아보고자 지방세포를 이용하여 실험을 실시하였다. 3T3-L1 adipocytes 세포의 지방분화 억제 효과를 살펴보기 위해 함초 물 추출물을 농도별(125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$), 처리시기별(전처리, 후처리)로 처리한 결과, 함초 물 추출물을 후처리 하였을 때 지방세포의 크기와 지방축적 정도가 감소하였다. 또한 함초 물 추출물 후처리 시 125 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포로부터의 TNF- α 의 생성이 유의하게 증가하였고, 세포로부터 분비된 glycerol 양에는 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 함초 물 추출물이 지방분화 유도 후 지방이 축적되는 과정에서 지방분해보다는 지방합성 과정에 관련하여 지방세포 분화

를 억제하는 효과가 있는 것으로 여겨진다. 함초 물 추출물 후처리 시 지방축적 감소로 인해 지방세포에서 분비되는 인슐린 저항성과 관련된 leptin 및 resistin 생성은 감소하였고, 인슐린 민감성을 증가시키고 지방세포로의 에너지원 유입을 증가시키는 PPAR- γ 및 이로부터 발현이 유도되어 심혈관계 질환 예방에 관련된 adiponectin 생성을 증가시켜 인슐린 민감성과 관련된 당뇨병 및 심혈관계 질환 예방 효과를 가질 가능성이 있을 것으로 나타났다. 그러나 정확한 관련 기전에 대한 더 많은 연구와 함초 물 추출물의 기능성 성분을 밝히는 추후 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 연구개발사업(과제번호: IPET109147-3)으로 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ministry of Health and Welfare. 2010. Report of 2009 Korean National Health and Nutritional Examination Survey, KNHANES IV. 2009. http://www.mw.go.kr/front_new/jb/sjb030301vw.jsp?PAR_MENU_ID=03&MENU_ID=031604&CONT_SEQ=264574&page=1 (accessed April 2011).
2. Albu J, Allison D, Boozer CN, Heymsfield S, Kissileff H, Kretser A, Krumhar K, Leibel R, Nonas C, Pi-Sunyer X, VanItallie T, Wedral E. 1997. Obesity solutions: report of a meeting. *Nutr Res* 55: 150-156.
3. Grundy SM. 1998. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J Clin Nutr* 67: 563S-572S.
4. Aronne LJ. 1998. Modern medical management of obesity: the role of pharmaceutical intervention. *J Am Diet Assoc* 98: S23-S26.
5. Zacour AC, Silva ME, Cecon PR, Bambirra EA, Vieira EC. 1992. Effect of dietary chitin on cholesterol absorption and metabolism in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 38: 609-613.
6. Delzenne NM, Cani PD, Daubioul C, Neyrinck AM. 2005. Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *Br J Nutr* 93: S157-S161.
7. Oh SJ, Kim YS, Park CY, Kim SW, Yang IM, Kim JW, Choi YK, Paeng JR, Shin HD. 2000. Body fat decreasing mechanisms of red ginseng compound. *Korean J Obesity* 9: 209-218.
8. Rhee SJ, Kim KR, Kim HT, Hong JH. 2007. Effects of catechin on lipid composition and adipose tissue in obese rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 540-547.
9. Jeon JR, Kim JY, Lee KM, Cho DH. 2005. Anti-obese effects of mixture contained pine needle, black tea and green tea extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 375-381.
10. Kim CS, Song TG. 1983. Ecological studies on the halophyte communities at western and southern coasts in Korea (IV) - The halophyte communities at the different salt marsh habitats. *Korean J Ecol* 6: 167-176.
11. Kim KR, Choi JH, Lee SK, Woo MH, Choi SW. 2006. Effect of enzymatic hydrolysate of Hamcho (*Salicornia herbacea* L.) on antioxidative defense system in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1356-1362.

12. Do JR, Kim EM, Koo JG, Jo KS. 1997. Dietary fiber contents of marine algae and extraction condition of the fiber. *J Korean Fish Soc* 30: 291-296.
13. Jo YC, Ahn JH, Chon SM, Lee KS, Bae TJ, Kang DS. 2002. Studies on pharmacological effects of glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Korean J Medicinal Crop Sci* 10: 93-99.
14. Song HS, Kim DP, Jung YH, Lee MK. 2007. Antioxidant activities of red Hamcho (*Salicornia herbacea* L.) against lipid peroxidation and the formation of radicals. *Korean J Food & Nutr* 20: 150-157.
15. Jung BM, Park JA, Bae SJ. 2008. Growth inhibitory and quinone reductase induction activities of *Salicornia herbacea* L. fractions on human cancer cell lines *in vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 148-153.
16. Kong CS, Kim YA, Kim MM, Park JS, Kim JA, Kim SK, Lee BJ, Nam TJ, Seo Y. 2008. Flavonoid glycosides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells. *Toxicol In Vitro* 22: 1742-1748.
17. Bang MA, Kim HA, Cho YJ. 2002. Hypoglycemic and antioxidant effect of dietary Hamcho powder in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 840-846.
18. Kim SH, Ryu DS, Lee MY, Kim KH, Kim YH, Lee DS. 2008. Anti-diabetic activity of polysaccharide from *Salicornia herbacea*. *Kor J Microbiol Biotechnol* 36: 43-48.
19. Vahouny GV, Roy T, Gallo LL, Story JA, Kritchevsky D, Cassidy M. 1980. Dietary fibers. III. Effects of chronic intake on cholesterol absorption and metabolism in the rat. *Am J Clin Nutr* 33: 2182-2191.
20. Kuda T, Fujii T, Saheki K, Hasegawa A, Okuzumi M. 1992. Effects of brown algae on faecal flora of rats. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 307-314.
21. Kim AR, Lee JJ, Lee YM, Jung HO, Lee MY. 2010. Cholesterol-lowering and anti-obesity effects of *Polymnia sonchifolia* Poepp. & Endl. powder in rats fed a high fat-high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 210-218.
22. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
23. Smas CM, Sul HS. 1995. Control of adipocyte differentiation. *Biochem J* 309: 697-710.
24. Gregoire FM. 2001. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)* 11: 997-1002.
25. McNeel RL, Mersmann HJ. 2003. Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation. *J Nutr Biochem* 14: 266-274.
26. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. 1996. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 45: 1455-1462.
27. Yang S, Koteish A, Lin H, Huang J, Roskams T, Dawson V, Diehl AM. 2004. Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 39: 403-411.
28. Norman D, Isidori AM, Frajese V, Caprio M, Chew SL, Grossman AB, Clark AJ, Michael Besser G, Fabbri A. 2003. ACTH and α -MSH inhibit leptin expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes: model for a central-peripheral melanocortin-leptin pathway. *Mol Cell Endocrinol* 28: 99-109.
29. Kwon JY, Ann IS, Park KY, Cheigh HS, Song YO. 2005. The beneficial effects of pectin on obesity *in vitro* and *in vivo*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 13-20.
30. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. 2004. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 29-33.
31. Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. 2005. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett* 579: 5163-5169.
32. Ashima RS, Flier JS. 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11: 327-332.
33. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91.
34. del Aguila LF, Claffey KP, Kirwan JP. 1999. TNF- α impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol* 276: E849-E855.
35. Engelman JA, Berg AH, Lewis RY, Lisanti MP, Scherer PE. 2000. Tumor necrosis factor α -mediated insulin resistance, but not dedifferentiation, is abrogated by MEK1/2 inhibitors in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 14: 1557-1569.
36. Levy JR, Davenport B, Clore JN, Stevens W. 2002. Lipid metabolism and resistin gene expression in insulin-resistant Fischer 344 rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E626-E633.
37. Zhang J, Qin Y, Zheng X, Qiu J, Gong L, Mao H, Jia W, Guo J. 2002. The relationship between human serum resistin level and body fat content, plasma glucose as well as blood pressure. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 82: 1609-1612.
38. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. 2001. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 276: 11252-11256.
39. Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M, Onishi Y, Ono H, Inukai K, Abe M, Fukushima Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. 2002. Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes* 51: 1737-1744.
40. Pakala R, Kuchulakanti P, Rha SW, Cheneau E, Baffour R, Waksman R. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: its role in metabolic syndrome. *Cardiovasc Radiat Med* 5(2): 97-103.
41. Sharma AK, Bharti S, Ojha S, Bhatia J, Kumar N, Ray R, Kumari S, Arya DS. 2011. Up-regulation of PPAR- γ , heat shock protein-27 and -72 by naringin attenuates insulin resistance, β -cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2 diabetes. *Br J Nutr* 106: 1713-1723.
42. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. 2001. PPAR- γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50: 2094-2099.
43. Harmon AW, Harp JB. 2001. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C807-C813.
44. Kang S, Kim D, Lee BH, Kim MR, Chiang M, Hong J. 2011. Antioxidant properties and cytotoxic effects of fractions from glasswort (*Salicornia herbacea* L.) seed extracts on human intestinal cells. *Food Sci Biotechnol* 20: 115-122.