

Antiobesity Activity of *Chrysanthemum zawadskii* Methanol Extract

Jung Ae Park¹, Kyong-Suk Jin¹, Hyun Ju Kwon^{1,2} and Byung Woo Kim^{1,2*}

¹Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

²Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science & Human Ecology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received November 3, 2014 / Revised January 27, 2015 / Accepted January 27, 2015

Chrysanthemum zawadskii, a herbaceous perennial plant belonging to the Compositae, grows wild in Asian countries, including Japan, China, and Korea. The biological, antioxidative, anti-inflammatory, and antibacterial activities of *C. zawadskii* have been reported, its antiobesity activity has not been elucidated. In the present study, the effect of *C. zawadskii* methanol extract (CZME) on pancreatic lipase enzyme activity, adipocyte differentiation, and adipogenesis was investigated using an *in vitro* assay and a cell model system. CZME effectively suppressed lipase enzyme activity in a dose-dependent manner. CZME also inhibited insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (MDI)-induced adipocyte differentiation, lipid accumulation, and the level of triglyceride in 3T3-L1 preadipocytes in a dose-dependent manner, without cytotoxicity. The antiobesity effect of CZME might be modulated by gene and protein expression of cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine (CCAAT)/enhancer binding proteins (C/EBP) α , C/EBP β , and the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). CZME also triggered lipolysis in a dose-dependent manner in MDI-induced 3T3-L1 preadipocytes. Taken together, these results provide important new insights into the antiobesity activities of *C. zawadskii*, showing that they involve pancreatic lipase inhibition, as well as antiadipogenic and lipolysis effects. CZME might be a promising source in the field of nutraceuticals. However, the active compounds that confer the antiobesity activities of CZME need to be identified.

Key words : Anti-obesity activity, anti-adipogenic and lipolysis effect, *Chrysanthemum zawadskii*, lipase inhibition activity

서 론

비만은 과량의 에너지 섭취 또는 에너지 소비 저하로 인한 열량대사의 불균형으로 체내에 지방이 축적되고 이로 인해 고혈압, 심혈관계질환, 당뇨병, 암과 같이 식이와 관련한 만성 질환들을 유발하는 원인이 됨으로 장기적으로 관리가 필요하다[4]. 비만의 증가 추세는 국내외적으로 확산되고 있으며 그 대상자도 아동기에서 장년기에 이르기까지 전 연령층에서 나타나고 있다[26]. 세계보건기구(WHO)가 비만을 '21세기 신종 전염병'으로 지목할 정도로 비만은 위협적인 질병으로 대두되고 있으며, 2015년 전 세계 인구의 약 23.4%가 비만이 되고 10년 후에는 비만인구가 현재보다 50% 증가할 것으로 전망하고 있다[36].

비만의 발생은 지방 전구세포의 분화 및 adipogenesis 과정에 의해 지방세포 내 중성지방(Triglyceride, TG)의 축적으로

발생되며, 지방세포 형성과정에 관여하는 기작을 조절하는 것이 비만 억제의 효과적인 치료 방법으로 알려져 있다[1]. 지방세포는 중성지방 저장과 유리지방산의 방출에 의해 지질대사의 항상성과 에너지 균형을 조절하는 중요한 역할을 하며, 지방세포 분화와 지방축적의 양은 비만의 발생과 발전에 연관되어 있다[2, 16]. Adipogenesis, 즉 지방세포형성은 지방세포가 만들어지는 분화과정으로서 세포의 형태, 유전자 및 단백질의 발현, 호르몬 민감성의 변화 등을 동반하는데[23, 31], 이러한 adipogenesis 연구를 위한 *in vitro* cell model system으로는 일반적으로 mouse embryo로부터 유래된 지방전구세포인 3T3-L1을 주로 사용하며 insulin, dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 등의 분화유도인자를 필요로 한다[10, 17]. 지방세포의 형성과정에 관여하는 주요 전사인자로는 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 및 cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine (CCAAT)/enhancer binding proteins (C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ) 등과 같은 adipogenic transcription factor 등이 중요한 조절자로서 관여하는 것으로 알려져 있다[6, 12, 28]. 이 중 C/EBP β 와 C/EBP δ 는 분화초기에 insulin, DEX, IBMX 등과 같은 hormonal cocktail에 의해 일시적이고 빠르게 발현되는 반면 C/EBP α 와 PPAR γ 는 분화 후기에 발현되어 지방세포에 특이적인 유전자의 발현을 활성화 시킴으로써 분화를 더욱 촉진시켜 분화과정을 완성시킨다[28]. 또한 C/EBP α 는 PPAR γ 의 활성화 및

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2900, Fax : +82-51-890-2914

E-mail : bwkim@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

지속적인 유지뿐만 아니라 성숙한 지방세포 생성을 위한 insulin 감수성에 중요한 역할을 담당한다[38]. 분화된 세포는 백색지방세포에서 나타나는 TG의 축적과 같은 형태적 특징과 함께 지방세포 특이적 유전자의 발현을 유발한다. 지방세포를 가지는 동물모델에서 C/EBP α 를 제거하였을 때 지방축적이 나타나지 않는 것이 관찰되어 효과적인 비만억제를 위해서는 지방세포 분화과정에 관여하는 전사인자들의 활성을 억제하는 것이 매우 중요한 것으로 밝혀졌다[8, 33, 35].

이러한 지방전구세포의 분화 및 adipogenesis를 저해하기 위하여 운동이나 식이요법을 이용한 방법들이 사용되고 있으며 바쁜 현대인들의 경우 약물 치료 방법이 활성화 되고 있다[26]. 그러나, 비만 치료를 위하여 개발된 sibutramine, orlistat와 같은 합성의약품들은 두통, 변비, 현기증, 불면증, 간손상과 같은 부작용 사례가 보고되었으며, sibutramine의 경우 심혈관계 이상으로 인해 사망한 사례가 있어 판매가 금지되었다[20, 29]. 따라서, 합성의약품들의 부작용을 최소화 하고 안전성이 확보되면서 치료 효과가 뛰어난 소재의 개발이 필요함에 따라 최근 천연 소재로부터 부작용이 없는 항비만 효능 보유 소재를 발굴하기 위한 많은 노력이 집중되고 있다[18, 21, 30, 34].

구절초(*Chrysanthemum zawadskii*)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 전초의 생약명은 선모초, 구절초라 하며, 개화기는 8~10월이며 결실기는 10~11월이다[22]. 구절초는 전국 각처의 산지와 고원에서 자생하고 중국, 러시아, 몽골, 일본 등지에서 자라며 민간에서 줄기와 잎을 가을에 채취하여 환의 형태, 혹은 달여서 부인 대부증 또는 건위제로 사용하여 왔다[19]. 또한 구절초 전초와 꽃 이삭은 폐렴, 기관지염, 기침, 감기, 인두염, 방광질환, 부인병, 냉증, 위장병 및 고혈압 등에 사용되어 왔다[19, 22]. 꽃이 달린 구절초 전체를 캐서 그늘에서 말린 것을 한방과 민간에서는 여자들의 손발이 차거나 산 후 냉기가 있을 때 달여 마시는 상비약으로 이용해 왔다. 성질은 따뜻하고 진통 소염작용이 강하며 고혈압 및 위장병을 치료하는데 효과가 있다고 알려져 있다[39]. 구절초의 생리활성 물질로는 메탄올 추출물에서 linarin이 분리되었으며, linarin의 생리활성 작용으로 항염증 작용, 해열작용 및 간 보호 작용이 보고되었다[22]. 그 외에도 구절초의 항균[13, 14, 24], 항암[12], 항산화[3], 항염증[37] 활성이 보고된 바 있으나 항비만 활성에 대해서는 보고된 바 없다.

이에 본 연구에서는 한방에서 약재로 사용되고 있는 구절초 추출물의 항비만 효과를 알아보고 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

구절초 추출물 제조

실험에 사용한 구절초는 부산광역시 소재 ㈜대한생약제품

에서 구입하여 사용하였다. 건조한 10 g의 구절초를 칭량하여 분말로 파쇄한 후 시료 부피의 5배의 메탄올을 첨가하여 환류 냉각장치를 이용하여 65°C에서 3회 반복 추출하였다. 추출한 시료는 감압농축(N-1000S-W, EYELA, Japan) 및 동결 건조(FDU2100, EYELA, Japan)한 후 증량법으로 수율을 계산하고 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

구절초 추출물의 pancreatic lipase 효소 활성 저해능 분석

Lipase는 주로 췌장에서 분비되어 TG를 glycerol과 fatty acid로 가수분해하는 효소로서 지방소화효소인 pancreatic lipase의 활성 저해능은 시료가 보유한 항비만 활성을 예측하기에 매우 유용한 시험법이다[7]. 본 연구에서는 구절초의 항비만 활성을 세포 실험계에서 분석하기에 앞서 시료가 보유한 lipase 효소 활성 저해능을 다음과 같이 측정하였다. 먼저 1.5 ml tube에 0.25 M Tris (pH 7.7), 250 mM CaCl₂, 5 mM 4-nitrophenyl dodecanoate (PNPD)로 구성된 효소액과 기질을 넣고 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 예열하고, 0.25 M Tris (pH 7.7)에 녹인 lipase와 시료를 넣어 37°C에서 10분간 반응시킨 후 20% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 첨가하여 반응을 종료하였다. 반응액을 4°C, 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여, 분리한 상층액을 96-well tissue culture plate에 분주하고 multi-plate reader (Paradigm, Beckman, CA, USA)를 이용하여 412 nm에서 흡광도를 측정한 후, 10분간 반응시킨 시료의 흡광도로부터 0분 반응 시료의 흡광도를 뺀 값을 control 대비 백분율로 나타내었다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

세포 배양 및 시료 처리

항비만 활성 분석에 사용되는 대표적인 cell model system인 3T3-L1 preadipocyte를 American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA)로부터 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. 0.5 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 μ M dexamethasone (DEX), 10 μ g/ml의 insulin (이하 MDI)을 처리하여 adipogenesis를 유도하고 구절초 추출물에 의한 항비만 활성을 분석하였다[30].

세포 독성 유무 분석

항비만 활성 분석 수행 전 시료가 세포생존율에 미치는 영향을 확인함과 동시에 세포 독성을 유발하지 않는 시료의 처리 농도를 결정하기 위해 water soluble tetrazolium (WST) assay를 수행하였다. 1×10^5 cell을 24-well tissue culture plate에 분주하여 24시간 동안 부착시킨 후 시료를 농도 별로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 시료 처리 후 WST 시약이 든 배지로 교체하여 한 시간 동안 반응시킨 후 multi-plate reader (Paradigm, Beckman, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡

광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었으며 독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 이후 실험을 수행하였다.

Oil Red O staining을 통한 지방세포 분화 및 TG 생성 저해능 분석

3T3-L1 preadipocyte의 adipocyte로의 분화는 상기의 MDI를 처리하여 유도하였다. 12-well tissue culture plate에 well 당 2×10^5 개의 세포를 분주하고 2일 후 10% FBS가 든 배지로 교체하였다. 2일 경과 후 MDI가 든 배지로 교체하면서 시료를 농도 별로 처리하고 2일 간격으로 총 4회 insulin과 시료를 처리하였다. 마지막 시료를 처리하고 2일 경과 후 위상차 현미경을 이용하여 지방세포 분화 정도 및 시료에 의한 분화 억제 정도를 200배 배율로 관찰하여 촬영한 후, 지방세포 분화 억제능 및 TG 생성 저해능을 Oil Red O staining을 통해 분석하였다. 지방세포 분화 및 시료 처리가 완료된 세포를 $1 \times$ phosphate buffered saline (PBS)으로 씻어준 다음 10% formalin으로 고정하고 Oil Red O staining solution을 처리한 후 30분간 염색하였다. 염색 완료 후 100% isopropanol을 사용하여 염색된 지방을 추출하고 multi-plate reader를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통한 지방세포 분화 관련 유전자 발현 조절능 분석

6-Well tissue culture plate에 3×10^5 개의 세포를 분주하고 지방 생성 억제능 분석과 동일한 방법으로 시료를 처리한 후 유전자 발현 분석을 위한 RNA를 분리하여 RT-PCR로 분석하였다. 먼저 시료 처리가 완료된 배양 세포의 total RNA를 TRIzol (Invitrogen, CA, USA)을 사용하여 추출한 후 NanoVue plus spectrophotometer (GE healthcare, WI, USA)를 이용하여 정량하고 SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen)을 이용하여 cDNA를 합성한 후 PCR을 수행하였다. 유전자 발현 분석의 internal control로는 housekeeping gene인 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였으며 실험에 사용한 대상 유전자의 primer se-

quence는 Table 1에 제시한 바와 같다.

Western blot hybridization을 통한 지방세포 분화 관련 단백질 발현 조절능 분석

상기의 RT-PCR 분석에서와 같은 방법으로 실험을 수행한 후 시료 처리가 끝난 세포에서 단백질을 분리하여 지방 생성 관련 단백질의 발현 변화를 Western blot hybridization으로 분석하였다. 먼저 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 cell lysate를 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정한 후 50 µg의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 대상 단백질의 일차 항체와 hybridization하였다. 실험에 사용한 C/EBPα와 C/EBPβ의 일차 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였고, PPARγ 및 actin의 일차 항체와 horse radish peroxidase가 부착된 anti-goat, anti-rabbit, anti-mouse 등의 일차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Membrane 수세 후 이차 항체로 한 시간 동안 반응시키고 chemiluminescence detection system (FluoChem® FC2, AlphaInnotech, USA)을 이용하여 각 단백질의 발현을 분석하였다.

지방세포 내 중성지방 제거량 측정(lipolysis assay)

구절초가 보유한 지방세포 내 중성지방 제거능(lipolysis activity)을 알아보기 위해 다음과 같이 수행하였다. Confluent 상태의 3T3-L1 지방전구세포를 2일간 배양한 다음 MDI를 첨가한 DMEM 배지로 2일간 배양하고 10 µg/ml이 든 DMEM 배지에 4일간 추가 배양하였다. 지방세포 분화가 완료된 3T3-L1 cell에 구절초 추출물을 농도별로 48시간 처리 후 중성지방 분해에 의해 배지에 방출된 glycerol 양을 glycerol-3-phosphate oxidase (GPO)-TRINDER kit (SIGMA, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

Gene name		Sequence
C/EBPα	Sense	5'-GTG TGC ACG TCT ATG CTA AAC CA-3'
	Antisense	5'-GCC GTT AGT GAA GAG TCT CAG TTT G-3'
C/EBPβ	Sense	5'-GTT TCG GGA GTT GAT GCA ATC-3'
	Antisense	5'-AAC AAC CCC GCA GGA ACA T-3'
PPARγ	Sense	5'-CGC TGA TGC ACT GCC TAT GA-3'
	Antisense	5'-TGC GAG TGG TCT TCC ATC AC-3'
GAPDH	Sense	5'-GGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'

통계 분석

실험의 결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, 각 데이터의 통계 분석은 unpaired Student's *t*-test를 통해 *p* 값이 0.05 미만(*p*<0.05)인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

구절초 추출물의 제조 및 pancreatic lipase 활성 억제능 분석

구절초 10 g으로부터 MeOH 추출을 통해 1.12 g의 추출물을 얻어 그 수율은 11.2%로 나타났다. 또한 구절초의 lipase 활성 억제능 보유 유무를 알아보기 위해 각 추출물의 농도별 처리에 따른 lipase의 활성 변화를 분석하였다. 그 결과 1.5 mg/ml 이상의 농도에서 유의적인 활성저해를 나타내어 구절초 추출물이 lipase 활성을 농도의존적으로 억제시키는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 구절초가 lipase inhibitor로 작용하여 항비만 활성을 보유할 가능성을 시사하였다.

구절초 추출물이 3T3-L1 preadipocyte의 세포 생존율에 미치는 영향

구절초 추출물의 지방 생성 억제능의 평가를 위해 먼저 3T3-L1 preadipocyte의 세포 생존율에 미치는 영향을 WST assay를 이용하여 분석하였다. 그 결과 Fig. 2A에 제시한 바와 같이 0에서 500 µg/ml의 처리 농도 범위에서 세포독성을 유발하지 않아 구절초 추출물이 세포독성을 유발하지 않는 안전성이 높은 소재임을 확인하였다.

구절초 추출물이 MDI로 유도한 3T3-L1 preadipocyte의 지방세포형성(adipogenesis)에 미치는 영향

구절초 추출물의 항비만 활성 보유 유무를 알아보기 위해

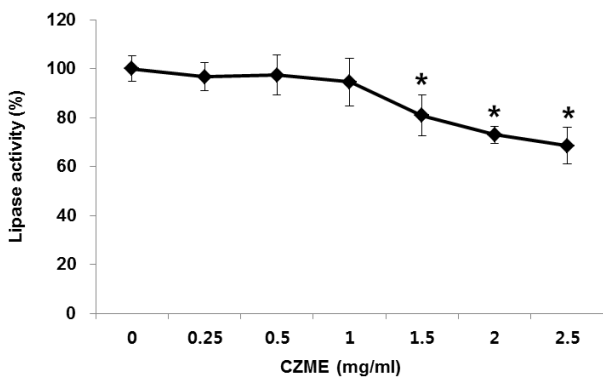


Fig. 1. Lipase enzyme inhibition activity of *Chrysanthemum zawadskii* methanol extract (CZME). The effects of CZME on pancreatic lipase activity. Values are represented as the mean ± SD (*n*=3) **p*<0.01 vs vehicle control (0).

MDI로 분화를 유도한 3T3-L1 preadipocyte의 지방세포형성(adipogenesis)에 구절초가 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 Fig. 2B에 제시된 바와 같이 지방 세포 분화가 농도 의존적으로 억제되었고 Oil Red O staining 결과 염색된 지방의 수가 감소됨을 확인할 수 있었다. 지방 생성의 억제 정도를 정량적으로 평가하기 위해 염색된 지방을 추출하여 TG 생성량의 정도를 측정한 결과 50에서 500 µg/ml의 시료 처리 범위에서 농도의존적으로 감소를 나타내었으며 억제능의 정도는 300, 400, 500 µg/ml의 처리에 의해 각각 35, 61, 68%로 나타났다(Fig. 2C). 이러한 결과를 통해 구절초가 지방 생성 억제능을 보유함을 확인하였다.

구절초 추출물이 adipogenesis 관련 유전자 및 단백질 발현에 미치는 영향

지방세포는 에너지 항상성 유지 및 지질대사에 중요한 역할을 하고, 지방전구세포인 3T3-L1은 여러 호르몬과 다양한 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되면서 세포내 지방을 축적한다. 이러한 지방세포형성(adipogenesis) 과정에 관여하는 중요한 인자로는 PPAR γ 와 C/EBP α 가 있다[15, 31]. 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 adipogenesis의 과정에는 초기, 중기, 후기의 각 단계별로 중요한 분화 조절자들이 관여한다. 이 중 C/EBP β 와 δ 는 preadipocyte가 MDI 등의 분화 인자에 노출되었을 때 분화 초기에 가장 먼저 작용하는 전사 인자로 MDI의 경우 C/EBP β 는 DEX에, C/EBP δ 는 IBMX에 의해 활성이 유도되는 것으로 알려져 있다[18]. 따라서 이와 같은 지방세포 분화에 관여하는 주요 인자들의 발현 조절 유무는 소재가 보유한 지방 생성 억제능 및 그 작용 기전을 판단하는 주요 지표 중 하나이다.

본 연구에서는 구절초가 보유한 지방 생성 억제능의 작용 기전을 알아보기 위하여 구절초 추출물이 adipogenesis에 관여하는 주요 핵심 조절자인 C/EBP α , C/EBP β , 그리고 PPAR γ 의 유전자 및 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 MDI 처리에 의해 지방세포 분화가 일어난 대조군에서는 세 인자의 유전자 및 단백질 발현이 유의적으로 증가되었으며 C/EBP α 의 경우 최소 농도인 50 µg/ml부터 유전자 및 단백질 발현이 감소되었으며, C/EBP β 의 경우 저농도에서는 농도에 따른 발현의 변화가 큰 차이를 보이지 않다가 고농도로 갈수록 유전자 및 단백질 발현이 크게 저해되었다. PPAR γ 의 경우에는 100 µg/ml 이상에서 유전자와 단백질 발현이 감소되었다(Fig. 3). 이러한 결과를 바탕으로 구절초 추출물이 보유한 지방세포분화 억제능이 adipogenesis에 관여하는 핵심 인자의 유전자 및 단백질 발현 저해를 통해 나타나며 특히 C/EBP α , β 의 발현 조절을 통해 나타날 가능성을 확인하였다.

구절초 추출물의 중성지방 제거능

구절초가 지방세포분화를 억제할 뿐만 아니라 생성된 지방

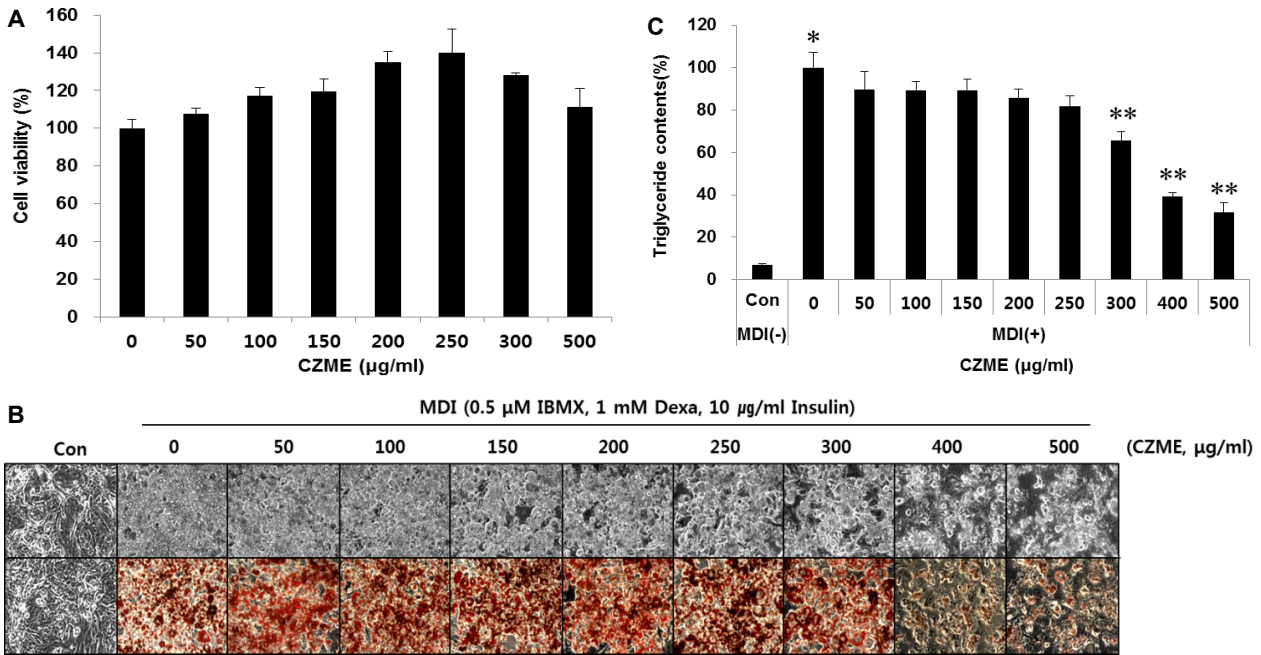


Fig. 2. Effect of *Chrysanthemum zawadskii* methanol extract (CZME) on 3T3-L1 cell proliferation (A), morphological change and lipid accumulation (B), and TG contents (C). (A) Cells were treated with the indicated concentrations of CZME for 72 hr and viability was determined by WST assay. Data are expressed as the mean \pm SD of triplicate experiments. (B) Differentiation of confluent 3T3-L1 preadipocytes was initiated with MDI treatment and maintained in DMEM containing 5% FBS in presence and absence of CZME. After day 8, cells were fixed and stained with Oil red O. The morphological change and lipid droplet accumulation were visualized using by inverted microscopy (x200). (C) TG contents were determined by Oil red O staining after treatment of CZME. TG contents were measured at 500 nm by multi-plate reader. Data are expressed as the mean \pm SD of triplicate experiments. *Significantly different from the undifferentiated cell control (Con) and untreated cell control (0), respectively ($p < 0.05$).

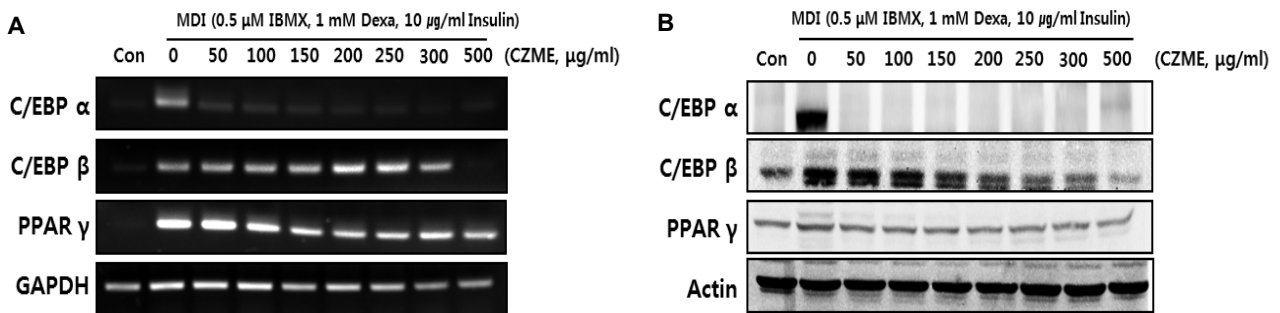


Fig. 3. Effect of *Chrysanthemum zawadskii* methanol extract (CZME) on adipogenesis related gene and protein expressions. (A) Modulation of adipogenic transcription factors by CZME was evaluated by RT-PCR. GAPDH was used as an internal control. (B) Modulation of adipogenesis related protein expressions by CZME was evaluated by Western blot analysis. Actin was used as an internal control. The data are representative of three independent experiments.

의 제거에도 효과적인지를 판단하기 위해 지방세포 내 중성지방 제거능을 lipolysis activity를 통해 분석하였다. 그 결과 Fig. 4에 제시한 바와 같이 MDI로 분화시킨 지방세포에 구절초 추출물을 처리한 결과 세포 내 축적되어 있던 중성지방의 분해를 통해 배지로 방출된 glycerol의 양이 증가되는 것으로 나타났다. 배지를 제거하고 Oil Red O staining을 수행한 후 현미경 관찰 및 남아있는 TG 양을 측정된 결과 방출된 glycer-

ol의 양과 비례적으로 세포 내에 남아있는 TG의 양이 감소되는 것으로 나타나 구절초 추출물이 지방세포 내에 축적되어 있는 중성지방을 제거하는 것을 확인하였다.

이러한 결과를 통해 구절초 추출물이 lipase 효소활성 억제능, 지방세포 분화 억제능, 지방세포 내 중성지방 제거능을 통한 항비만 활성을 보유함을 확인하였다. 이러한 결과는 구절초 추출물의 항비만 활성을 처음으로 밝혀낸 것이며 추후

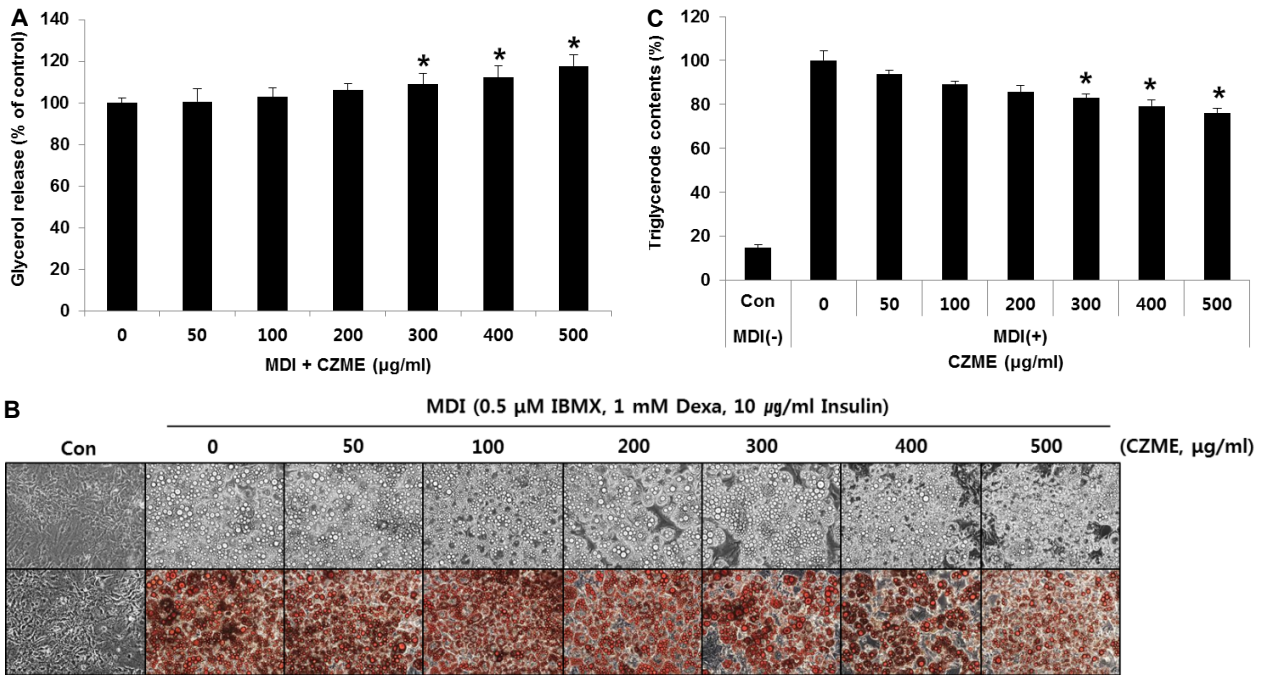


Fig. 4. Stimulatory effect of *Chrysanthemum zawadskii* methanol extract (CZME) on glycerol release in MDI-induced 3T3-L1 adipocytes (A), morphological change and lipid accumulation (B), and TG contents (C). (A) Amount of released glycerol in culture media was measured after CZME treatment. Glycerol contents were measured 540 nm by multi-plate reader. (B) Differentiation of confluent 3T3-L1 preadipocytes was initiated with MDI treatment and maintained in DMEM containing 5% FBS. After day 8, MDI-induced adipocytes were treated with CZME for 48 hr. Cells were fixed and stained with Oil red O. The morphological change and lipid droplet accumulation was visualized using by inverted microscopy (x200). (C) TG contents were determined by Oil red O staining after treatment of CZME. TG contents were measured at 500 nm by multi-plate reader. Data are expressed as the mean ± SD of triplicate experiments. *Significantly different from the undifferentiated cell control (Con) and untreated cell control (0), respectively ($p < 0.05$).

계속적인 연구를 통해 활성 물질의 규명이 필요할 것으로 판단된다. 현재까지 알려진 구절초의 주요 성분으로는 sesquiterpene lactones, polyacetylenic compounds, flavonoids 등이 있다[25]. 이 중 sesquiterpene lactone에 속하는 수종의 화합물들이 구절초의 주요 활성 성분으로서 항산화[40], 항암[32], 항염증[6] 등의 생리활성을 나타내는 것으로 보고 되고 있다. 한편 sesquiterpene lactone의 하나인 dehydroleucodine의 항비만 활성에 대한 보고[9]가 있으나 구절초에서는 아직 알려지지 않아 구절초의 항비만 활성 보유 물질 규명에 대한 지속적인 연구가 필요한 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구는 산업통상자원부·부산광역시 지원 지역혁신센터사업(RIC08-06-07) 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화지원센터의 지원으로 이루어 졌습니다.

References

- Chen, H. C. and Farese, R. V. 2005. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity: lessons from DGAT1-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 482-486.
- Chon, J. W., Sung, J. H., Hwang, E. J. and Park, Y. K. 2009. Chlorella methanol extract reduces lipid accumulation in and increases the number of apoptotic 3T3-L1 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1171**, 183-189.
- Chung, H. J. and Jeon, I. S. 2011. Antioxidative activities of methanol extracts from different parts of *Chrysanthemum zawadskii*. *Kor. J. Food Preserv.* **18**, 739-745.
- Eckel, R. 1997. Obesity and heart disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* **96**, 3248-3250.
- Farmer, S. R. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* **4**, 263-273.
- Felix, S., Sandjo, L. P., Opatz, T. and Erkel, G. 2014. Anti-inflammatory drimane sesquiterpene lactones from an *Aspergillus* species. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 2912-2918.
- Flier, J. S. and Maratos, F. E. 1998. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* **92**, 437-440.
- Fox, K. E., Fankell, D. M., Erickson, P. F., Majka, S. M., Crossno, J. T. and Klemm, D. J. 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.
9. Galvis, A., Marcano, A., Stefancin, C., Villaverde, N., Priestap, H. A., Tonn, C. E., Lopez, L. A. and Barbieri, M. A. 2011. The effect of dehydroleucodine in adipocyte differentiation. *Eur. J. Pharmacol.* **671**, 18-25.
 10. Green, H. and Meuth, M. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-133.
 11. Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. 1988. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783-809.
 12. An, I. J., Kwon, J. K., Lee, J. S., Park, H. S., Kim, D. C., Chio, B. J., Lee, K. M., Park, Y. J. and Jung, J. Y. 2012. Induction of apoptosis in human cancer cells with *Compositae* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 584-590.
 13. Jang, D. S., Park, K. H., Lee, J. R., Ha, T. J., Park, Y. B., Nam, S. H. and Yang, M. S. 1999. Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii* and *Chrysanthemum boreale*. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 176-179.
 14. Jang, D. S., Park, K. H., Choi, S. U., Nam, S. H. and Yang, M. S. 1997. Antibacterial substances of the flower of *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* kitajura. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**, 85-88.
 15. Jang, M. H., Piao, W. L., Kim, J. M., Kwon, S. W. and Park, J. H. 2008. Inhibition of cholinesterase and amyloid-beta aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. *Phytother. Res.* **22**, 544-549.
 16. Jeon, T., Hwang, S. G., Hirai, S., Matsui, T., Yano, H., Kawada, T., Lim, B. O. and Park, D. K. 2004. Red yeast rice extracts suppress adipogenesis by downregulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 cells. *Life Sci.* **75**, 3195-3203.
 17. Jessen, B. A. and Stevens, G. J. 2002. Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene* **299**, 95-100.
 18. Kim, H. J., Kang, C. H. and Kim, S. K. 2012. Anti-adipogenic effect of *Undaria pinnatifida* extracts by ethanol in 3T3-L1 adipocytes. *J. Life Sci.* **22**, 1052-1056.
 19. Kim, J. H. and Ahn, D. K. 1989. A study on the effect of *Chrysanthemum sibiricum* Fischer. *Kor. J. Herbology* **4**, 15-21.
 20. Kim, M. K. 2013. Behavioral intervention and anti-obesity drug therapy. *Kor. J. Intern. Med.* **84**, 624-628.
 21. Kim, S. G., Ramakanta, L., Dipak, K. S., Lee, K. H., Choi, J. W. and Jung, H. J. 2014. Anti-obesity and Anti-hyperlipidemic effects of butanol soluble fraction from methanol extract of *Geranium thunbergii* in Sprague-Dawley rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **45**, 69-76.
 22. Kim, Y. Y., Lee, S. Y. and Yim, D. S. 2001. Biological activities of linarin *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*. *Yakhak Hoeji* **45**, 604-610.
 23. Koutnikova, H. and Auwerx, J. 2001. Regulation of adipocyte differentiation. *Ann. Med.* **33**, 556-561.
 24. Lee, S. H. and Lee, J. S. 2007. Production and characteristics of antidandruff compound from *Chrysanthemum zawadskii*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 220-225.
 25. Lee, Y. C. 1967. Studies on the constituents of *Chrysanthemum sibiricum* FISCHER. *Yakhak Hoeji* **11**, 7-16.
 26. Lim, Y. R., Shin, J. Y., Kim, H., Baek, G. H., Yu, K. W., Jeong, H. S. and Lee, J. S. 2014. Anti-adipogenic effect of fermented coffee with *Monascus ruber* mycelium by solid-state culture of green coffee beans. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 624-629.
 27. Morrison, R. F. and Farmer, S. R. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Nutr.* **130**, 3116S-3121S.
 28. Ntambi, J. M. and Kim, Y. C. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* **130**, 3122S-3126S.
 29. Park, C. Y., Kim, Y. S., Ryu, M. S., Nam, S. Y., Park, H. S. and Kim, S. M. 2001. A phase 3 double-blind, parallelgroup, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of sibutramine (reductil) in the treatment of obese patients. *Kor. J. Obes.* **10**, 336-347.
 30. Park, J. A., Park, C., Han, M. H., Kim, B. W., Chung, Y. H. and Choi, Y. H. 2011. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by aged black garlic extracts in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Life Sci.* **21**, 720-728.
 31. Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 145-171.
 32. Salla, M., Fakhoury, I., Saliba, N., Darwiche, N. and Gali-Muhtasib, H. 2013. Synergistic anticancer activities of the plant-derived sesquiterpene lactones salograviolide A and iso-seco-tanaparholide. *J. Nat. Med.* **67**, 468-479.
 33. Schroeder-Gloeckler, J. M., Rahman, S. M., Janssen, R. C., Qiao, L., Shao, J., Roper, M., Fischer, S. J., Lowe, E., Orlicky, D. J., McManaman, J. L., Palmer, C., Gitomer, W. L., Huang, W., O'Doherty, R. M., Becker, T. C., Klemm, D. J., Jensen, D. R., Pulawa, L. K., Eckel, R. H. and Friedman, J. E. 2007. CCAAT/enhancer-binding protein beta deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in *Lepr* (db/db) mice. *J. Biol. Chem.* **282**, 15717-15729.
 34. Suzuki, R., Tanaka, M., Takanashi, M., Hussain, A., Yuan, B., Toyoda, H. and Kuroda, M. 2011. Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway. *Nutr. Metab.* **8**, 14.
 35. Wang, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., Taylor, L. R., Wilson, D. R. and Darlington, G. J. 1995. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* **269**, 1108-1112.
 36. WHO. 10 facts on obesity. <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/index.html>.
 37. Wu, T. Y., Khor, T. O., Saw, C. L., Loh, S. C., Chen, A. I., Lim, S. S., Park, J. H., Cai, L. and Kong, A. N. 2011. Anti-inflammatory/Anti-oxidative stress activities and differential regulation of Nrf2-mediated genes by non-polar fractions of tea *Chrysanthemum zawadskii* and licorice *Glycyrrhiza uralensis*. *AAPS J.* **13**, 1-13.
 38. Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., McKeon, C., Darlington, G. J. and Spiegelman, B. M. 1999. Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* **3**, 151-158.
 39. Yook, C. S. 1997. Colored medicinal plants of Korea Academybook, Korea, P 588-589.

40. Zhang, Y. C., Gan, F. F., Shelar, S. B., Ng, K. Y. and Chew, E. H. 2013. Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance,

provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury. *Food Chem. Toxicol.* **59**, 272-280.

초록 : 구절초 추출물의 항비만 활성

박정애¹ · 진경숙¹ · 권현주^{1,2} · 김병우^{1,2*}

(¹동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화 지원센터, ²동의대학교 생명응용학과)

구절초(*Chrysanthemum zawadskii*)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 일본, 중국 등에 분포하고 있으며 향산화, 항염증, 항균 등의 생리활성이 알려져 있으나 항비만 활성에 대해서는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 구절초 메탄올 추출물(CZME)의 항비만 활성을 췌장 lipase 효소 활성 억제능과 지방세포분화 및 지방 생성에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 CZME는 농도 의존적으로 lipase 효소 활성을 억제시켰으며, insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (MDI)로 분화를 유도한 3T3-L1 preadipocyte를 이용하여 지방세포 분화 및 지방생성에 미치는 영향을 분석한 결과 지방세포 분화, 세포 내 지방 축적, TG 함량 등을 독성 없이 농도 의존적으로 억제하였다. 이러한 구절초의 지방세포 분화 억제능은 핵심 작용 인자인 C/EBP α , C/EBP β , 그리고 PPAR γ 의 유전자 및 단백질 발현조절에서 기인함을 확인하였다. 뿐만 아니라 MDI로 분화를 유도한 3T3-L1 preadipocyte에서 생성된 지방의 분해능을 분석한 결과 지방세포 분화 억제뿐만 아니라 지방세포 내 중성지방 또한 유의적으로 분해시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 구절초가 보유한 췌장 lipase 활성 저해능, 지방세포 분화 억제능, 지방세포 내 지방 분해능을 통한 항비만 활성을 처음으로 밝혀낸 것이며 추후 지속적인 연구를 통해 활성 물질의 규명이 필요할 것으로 판단된다.