

## 마늘이 고지방 식이를 섭취한 UCP2 형질전환 마우스의 대사성 조직에서 UCP2 전사 조절에 미치는 영향

이막순 · 이서현 · 신윤진 · 정선윤 · 박선영 · \*김양하  
이화여자대학교 식품영양학과

### Effects of Garlic on Uncoupling Protein 2 (UCP2) Transcriptional Regulation in Metabolic Tissues of UCP2 Transgenic Mice Fed on a High-Fat Diet

Mak-Soon Lee, Seohyun Lee, Yoonjin Shin, Sunyoon Jung, Seonyoung Park and \*Yangha Kim  
Dept. of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, Seoul 03760, Korea

#### Abstract

This study was performed to investigate the effects of garlic on uncoupling protein 2 (UCP2) transcriptional regulation of UCP2-luciferase transgenic mice fed on a high fat diet to induce obesity. To examine the transcriptional regulation of UCP2, we generated transgenic mice with a UCP2 promoter (-1,830/+30 bp) containing luciferase as a reporter gene. UCP2-luciferase transgenic mice were fed a 45% high-fat diet for 8 weeks to induce obesity. Subsequently, mice were maintained on either a high-fat control diet (TG-CON), or high-fat diets supplemented with 2% (TG-GL2) or 5% (TG-GL5) garlic for a further 8 weeks. Dietary garlic reduced body weight and energy efficiency ratio in the TG-GL5 group, compared to the TG-CON group. Furthermore, garlic supplementation significantly decreased white adipose tissue fat mass and plasma levels of triglycerides, total cholesterol, and leptin in the TG-GL2 and TG-GL5 groups, compared to the TG-CON group. Specifically, UCP2 promoter activity in metabolic tissues such as liver, white adipose tissue, brown adipose tissue, and skeletal muscle was increased by garlic supplementation. These results suggest that dietary garlic was partially associated with an increase of UCP2 transcriptional activity in metabolic tissues for decreasing obesity.

Key words: garlic, obesity, UCP2, transcriptional regulation, UCP2 transgenic mouse

#### 서 론

비만은 에너지 섭취가 소비보다 많아지는 불균형으로 인해 발생하며, 여분의 에너지가 지방으로 전환되어 체내에 비정상적으로 많이 축적된 상태를 말한다(Haslam & James 2005). 비만은 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 심혈관계 질환 등의 주요 위험 요인 중 하나이며(Haslam & James 2005), 전 세계적으로 그 유병률이 증가하고 있어, 많은 나라에서 공중보건을 위해 해결해야 하는 주요 과제 중 하나로 다루고 있다. 미국질병통제예방센터(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)가 공개한 ‘전국건강·영양조사(The National Health and Nu-

tritional Examination Survey, NHANES)’에 따르면 2013~2014년 미국 성인 인구의 70.7%가 과체중, 37.9%가 비만이었으며(CDC 2015), 우리나라에서도 소득수준의 향상과 동물성 지방의 함량이 높은 서양식 식습관으로 인해 근래 비만 인구가 계속 증가하고 있는 추세이다. 이에 전 세계적으로 체중감량에 관심이 높아지고 있으며, 비만 치료 및 체중조절을 위한 다양한 약물들이 개발되고 있다(Padwal & Majumdar 2007). 그러나 이들 약물은 복통, 두통 등의 부작용으로 인한 한계성을 나타내면서 장기적인 복용에도 안전한 천연물에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다(Kang & Park 2012).

마늘(garlic, *Allium sativum* L.)은 백합과에 속하는 다년생

\* Corresponding author: Yangha Kim, Dept. of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, Seoul 03760, Korea. Tel: +82-2-3277-3101, Fax: +82-2-3277-4425, E-mail: yhmoon@ewha.ac.kr

채소로서 예로부터 식용 및 약용식물로 널리 이용되어 왔으며, 생리활성 물질로 알리신(allicin), 알린(alliin), 아조엔(ajoenes)의 다양한 유기 황 화합물들을 함유하고 있다(Lanzotti V 2006). 많은 선행 연구에서 마늘의 향균(Kim 등 1996; Lim & Kim 1997), 항암(Fleischauer 등 2000), 항콜레스테롤(Chi MS 1982; Qureshi 등 1983), 항염증(Zalejska-Fiolka 등 2015), 항비만 효과(Kang 등 2006; Lee 등 2011; Joo 등 2013) 등을 보고하였다. 특히, 고지방 식이유도 비만 마우스에 8주간 마늘 식이를 섭취시킨 결과, 체중, 지방 조직 무게 및 혈중 지질농도가 감소되었으며, 이는 지방 조직에서 지방생성(adipogenesis)과 관련된 유전자 발현 억제와 다양한 대사 조직에서 UCP(uncoupling protein)의 유전자 발현 증가와 관련되어 있음이 보고되었다(Lee 등 2011). 이와 비슷하게, 고지방 식이에 마늘 추출물을 11주간 공급한 랫트에서 체중 및 체지방이 감소하고 혈중 지질농도가 개선되었으며 지방 조직에서 지방생성관련 유전자 발현 감소와 UCP2 유전자의 발현이 증가함을 보고하였다(Joo 등 2013).

UCP는 미토콘드리아의 내막에 존재하는 단백질로, 전자 전달계에서 산화적 인산화에 의한 ATP 합성을 감소시키고, 열 발생을 증가시켜 체온 조절, 에너지 소비에 관여하는 것으로 알려져 있다(Rousset 등 2004). UCP의 상동유전자(homologue)는 UCP1, UCP2, UCP3, UCP4와 UCP5가 있으며, UCP1은 갈색지방 조직에서, UCP3는 골격근에서, UCP4와 UCP5가 뇌에서 주로 발현되는 것에 비해 UCP2는 대부분의 모든 조직에 폭넓게 분포하고 있다(Boss 등 1997; Vidal-Puig 등 1997; Diano 등 2000). 따라서 UCP2의 활성화를 통한 열 발생 증가는 체내 전반의 에너지 소비를 증가시킴으로써 항비만 효과를 나타낼 것이라 추측할 수 있으며, 이에 최근의 많은 대사 관련 연구들은 UCP2 발현과 비만과의 관련성을 보고하고 있다(Langin 등 1999). 한편, 경구로 섭취시킨 향나무(*Juniperus chinensis* X.) 추출물, 해국(*Aster spathulifolius* M.) 추출물 및 공액리놀레산(conjugated linoleic acid) 등은 고지방 식이를 섭취한 비만 동물의 체지방 감소와 동시에 UCP2 발현을 향상시키는 것으로 보고되었는데(Kim 등 2008; Kim 등 2016; Choi 등 2004), 이는 UCP2가 천연소재의 항비만 효능 평가를 위한 주요 지표 중 하나로 이용될 수 있음을 나타낸다. 본 연구진은 선행연구에서 마늘 섭취가 고지방 식이유도 비만 마우스의 체중을 감소시키고, 간과 지방 및 근육조직에서 UCP2 mRNA의 발현을 증가시킴을 보고한 바 있다(Lee 등 2011; Joo 등 2013). 그러나, 식이성 마늘이 UCP2-luciferase 형질전환 마우스에서 UCP2 전사 활성 조절에 관여하는지에 대한 연구는 아직 수행된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 UCP2 프로모터(promoter)와 luciferase 리포터 유전자가 도입된 형질전환 마우스를 제작하고, 마늘의 항비만 효과가 고지방 식이

비만 유도 UCP2-luciferase 형질전환 마우스의 간, 지방 및 근육조직에서 UCP2 유전자 전사 활성 조절에 관여하는지 확인해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 유전자 재조합

-1,830/+30 bp 크기의 마우스 UCP2 유전자 프로모터는 3T3-L1 지방세포의 genomic DNA(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 분리하여 template로써 이용하고, 양 끝에 Kpn I 과 Nhe I 의 효소 염기서열 부위를 부가한 primer를 제작하여 PCR을 실시하였다. Primer는 forward 5'-GCG CGA GCT CAC TGT GGG TGT ATG TGT GTG-3', reverse 5'-GCG CCT CGA GTG CCA ATA CTA AAA AGG GAA-3'로 하였고, PCR 반응의 조건은 denaturation 95°C 1분, annealing 62°C 2분, extension 70°C 2분으로 30 cycle로 하였다. PCR 산물은 전기영동하여 1.8 kb DNA를 gel extraction kit를 사용하여 회수하였다. PCR을 통해 얻은 UCP2의 프로모터는 pGEM-T easy vector(Promega, Madison, WI, USA)와 3:1의 비율로 T4 DNA ligase(Takara Bio, Otsu, Japan)를 이용하여 subcloning한 후 takara 유전자 해석 센터에 sequencing을 의뢰하였다. Sequencing을 확인한 후 재조합된 pGEM-T easy vector는 제한효소 Kpn I (Takara Bio)과 Nhe I (Takara Bio)으로 처리 후 전기영동하여 UCP2의 프로모터 부분인 1.8 kb만 pGL3-basic vector(Promega)를 T4 DNA ligase를 이용하여 약 16°C에서 14시간 동안 배양시켜 두 유전자를 재조합하였다(Fig. 1).

### 2. 형질전환 마우스 생산

재조합된 UCP2 DNA의 미세주입은 미세조작기(Leitz, Germany)를 이용하여 수정란의 응성 전핵에 주입하였으며, 이때 핵막의 용이한 관찰과 실험의 편리함을 도모하기 위하여 DIC system(Leitz, Germany)을 갖춘 도립현미경 하에서 실험을 수행하였다. UCP2 DNA가 미세 주입된 수정란은 대리모의 난관에 이식하여 약 3주간 발달시키고, 정상 분만하도록 하여 마우스를 생산하였다. 대리모에서 태어난 산자의 외래유전자 발현 여부는 삽입된 luciferase 외래유전자 특이적인 PCR primer를 이용하여 실시하였다. Chimera의 꼬리를 약 0.5 cm 정도 잘



**Fig. 1. Construction of UCP2-luciferase reporter gene.** UCP2 promoter (-1,830/+30 bp) was recombined with pGL3 basic vector using restriction enzymes (KpnI and NheI).

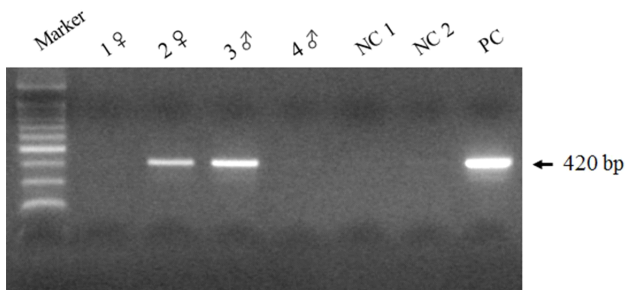
라내어 proteinase K가 함유된 lysis buffer를 이용하여 genomic DNA를 추출하여 PCR을 실시하여 외래 유전자의 germline transmission 여부를 판별하였다. RT-PCR은 luciferase primer (5'-TGTACACGTTTCGTCACATCT-3'과 5'-GCAGACCAGTAG ATCCAGAG-3')를 사용하여 Hotstart taq polymerase(Bioneer, Daejeon, Korea)로 증폭시켰다. PCR 반응 cycling 조건은 시작은 95°C에서 15분 배양 후 95°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 25 cycles를 진행하고, 마지막 증폭단계는 72°C에서 10분으로 설정하였다. PCR 생성물의 크기는 420 bp이며, PCR 결과 분석은 1.5%의 아가로스 gel을 통하여 전기영동 한 후, ethidiumbromide로 염색하여 ultraviolet(UV) light를 이용하여 확인하였다(Fig. 2).

### 3. 시료 준비

본 실험에 사용된 식이성 마늘 분말은 전라남도 고흥에서 구입한 생마늘을 동결 건조하여 분말화한 시료를 대상(주) (Deasang Corporation, Seoul, South Korea)로부터 제공받아 사용하였다. 동결 건조한 마늘 분말은 -20°C에서 보관하였다.

### 4. 실험동물 사육 및 식이

생후 약 5주령의 UCP2-luciferase 형질전환 수컷 C57BL/6J 마우스와 정상 C57BL/6J 마우스(wild-type, WT)를 동물 사육실(실내온도 23±1°C, 상대습도 50±5%, 12 hour light-dark cycle)에서 물과 고형배합 사료를 제한 없이 먹이면서 일주일간 환경에 적응시켰다. 적응기간 후 실험동물들에게 45% 고지방 식이(Dyets, Bethlehem, PA, USA)를 8주간 공급하여 비만 유도한 다음, 체중에 따른 난괴법으로 각 군당 5마리씩 4 그룹으로 나누었다. 각 군의 식이조성은 Table 1과 같으며, AIN-93G 식이를 기본으로 하여 45% 고지방 식이로 조제하였다.



**Fig. 2.** Mouse genotypes identified by the expression of mouse UCP2-luciferase transgenic mice. Genotypes of the mice are determined by PCR amplification using luciferase-specific primer (420 bp of the amplified fragment). Marker, 100 bp ladder; Founder 0 (F0) mice, 1♀~4♂; NC1 (negative control 1), dH<sub>2</sub>O; NC2 (negative control 2), C57BL/6J wild-type genomic DNA; PC (positive control), pUCP2 DNA (1 ng).

**Table 1.** Component of experimental diets (g/kg)

Components <sup>1)</sup>	WT <sup>4)</sup>	TG-CON	TG-GL2	TG-GL5
Casein	170.73	170.73	170.73	170.73
Sucrose	121.95	121.95	121.95	121.95
Cornstarch	201.71	201.71	181.71	151.71
Dyetrose	155.00	155.00	155.00	155.00
L-Cystine	2.20	2.20	2.20	2.20
Cellulose	60.98	60.98	60.98	60.98
Lard	229.50	229.50	229.50	229.50
Mineral mix <sup>2)</sup>	42.68	42.68	42.68	42.68
Vitamin mix <sup>3)</sup>	12.20	12.20	12.20	12.20
Choline bitartrate	3.05	3.05	3.05	3.05
Garlic powder	—	—	20.00	50.00
Total	1,000	1,000	1,000	1,000
Fat, % (calories)	45	45	45	45

<sup>1)</sup> Diets were based on the AIN-93G diet composition.

<sup>2)</sup> AIN-93G mineral mixture.

<sup>3)</sup> AIN-93G vitamin mixture.

<sup>4)</sup> WT, wild-type mice; TG-CON, transgenic control mice; TG-GL2, transgenic mice supplemented with 2% garlic; TG-GL5, transgenic mice supplemented with 5% garlic.

UCP2-luciferase 형질전환 마우스 대조군(TG-CON)은 고지방 식이를 공급하고, 실험군은 2%(TG-GL2) 또는 5%(TG-GL5)의 마늘을 고지방 식이에 첨가하여 8주간 UCP2-luciferase 형질전환 마우스에 공급하였다. 정상 마우스 대조군(WT)도 UCP2-luciferase 형질전환 마우스 대조군과 같이 비만 유도 후 추가로 고지방 식이를 8주간 공급하였다. 실험 기간에 물과 식이는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였고, 매주 두 번씩 일정한 시간에 체중과 식이섭취량을 측정하였다. 모든 동물실험 과정은 NIH(National Institutes of Health)의 실험동물관리 규정에 준하여 시행하였다.

### 5. 실험동물의 희생 및 시료 채취

실험 종료 시 실험동물은 12시간 절식시킨 후, 희생 당일 Zoletil/Rompun(Bayer, Laverkusen, Germany) 혼합액을 복강 내 투여하여 마취시킨 후 심장 채혈하였다. Ethylene diamine tetracetic acid(EDTA) tube에 채혈한 혈액을 넣은 뒤, 4°C, 2,800 ×g, 20분간 원심분리하여 혈장(plasma)을 얻고, 이를 분석 전까지 -80°C에 보관하여 분석시료로 사용하였다. 간, 백색지방(부고환 지방), 갈색지방 및 근육조직은 적출하여 액체질소에서 급속 동결한 후 이를 분석 전까지 -80°C에 보관하였다.

## 6. 혈장 중성지방, 콜레스테롤, 렙틴 농도 측정

혈장의 중성지방 및 콜레스테롤 농도는 효소법을 이용한 분석 kit(Asan Pharmaceutical, Seoul, South Korea)를 사용하여 측정하였다. 혈장 렙틴 농도는 렙틴 효소면역정량(enzyme-linked immunosorbent assay) kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

## 7. Luciferase 활성 측정

Luciferase 활성은 적절한 조직을 lysis한 후, Luciferase Reporter Assay System(Promega, Mannheim, Germany)을 이용하여 Turner Designs TD 20/20 luminometer(Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA)에서 측정하였다. 조직량의 표준화를 위한 단백질 함량은 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다.

## 8. 통계 분석

모든 실험결과는 SPSS 19.0(IBM Corporation, Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계 분석하였다. 분석수치는 실험군당 평균(mean)과 표준오차(standard error, SE)로 나타내었고, 일원 배치 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 한 후 Tukey's multiple range test에 의하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 체중, 식이섭취량 및 에너지효율

마늘 식이를 8주간 섭취한 고지방 식이유도 비만 마우스

의 체중, 식이섭취량 및 에너지효율은 Table 2와 같다. 체중, 식이섭취량 및 에너지효율은 WT군과 TG-CON군 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 시작체중과 식이섭취량은 모든 군 간에 유의적인 차이가 없었으며, 에너지효율은 TG-GL5군이 TG-CON군에 비해 유의적으로 감소하였으며( $p < 0.05$ ), TG-GL2군은 낮아지는 경향을 보였으나, 유의적인 변화는 없었다. 체중 변화는 TG-GL5군이 TG-CON군에 비해 18.6% 유의적으로 감소하였으며( $p < 0.05$ ), TG-GL2군은 낮아지는 경향은 있으나, 유의적인 변화는 나타내지 않았다. 이는 2%, 5%의 마늘을 섭취한 고지방 식이유도 비만 마우스의 체중 감소 효과가 본 연구진의 선행연구 결과와 유사하며(Lee 등 2011), 250 또는 500 mg/kg의 마늘추출물의 섭취가 고지방 식이를 섭취한 랫트와 마우스의 체중을 감소시킨 동물실험 결과(Pintana 등 2014; Lee 등 2016) 및 매일 800 mg의 마늘 분말을 섭취한 비알콜성 지방간 환자들의 체중이 감소한 인체적용 실험의 결과와 일치한다(Soleimani 등 2016).

### 2. 간 조직 및 백색지방 조직 무게

마늘 식이를 8주간 섭취한 고지방 식이유도 비만 마우스의 간 조직 및 백색지방 조직 무게는 Table 2와 같다. 간 무게는 각 군 간에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나 마늘 섭취가 간 기능에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다(Table 2). Aspartate aminotransferase(AST)와 Alanine transaminase(ALT)는 간의 위해가 발생했을 때 혈중으로 다량 방출되는데, 본 연구진은 선행 연구를 통해 2%와 5%의 마늘 식이를 8주간 섭취한 고지방 식이유도 비만 마우스의 혈중 AST 및 ALT 수치에 유의적인 변화가 없음을 보여주었다(Lee 등 2011). 이를

**Table 2. Effects of garlic on physiological variables of UCP2-luciferase transgenic mice**

	WT <sup>1)</sup>	TG-CON	TG-GL2	TG-GL5
Initial body weight (g)	36.0±1.0 <sup>2)</sup>	35.7±0.7	35.8±1.3	35.6±0.5
Final body weight (g)	45.3±0.8 <sup>b3)</sup>	45.7±1.6 <sup>b</sup>	40.8±2.3 <sup>ab</sup>	37.2±1.4 <sup>a</sup>
Food intake (g/day)	2.97±0.16	2.95±0.04	2.94±0.04	2.96±0.03
Energy intake (kcal/day)	13.8±0.75	13.7±0.17	13.7±0.20	13.7±0.17
Energy efficiency ratio <sup>4)</sup>	14.50±1.29 <sup>b</sup>	14.10±3.27 <sup>b</sup>	7.03±2.42 <sup>ab</sup>	2.30±0.96 <sup>a</sup>
Tissue weight (g/100 g body weight)				
Liver	3.24±0.12	3.39±0.40	3.44±0.42	3.33±0.08
White adipose tissue	4.37±0.11 <sup>b</sup>	4.64±0.15 <sup>b</sup>	1.97±0.19 <sup>a</sup>	1.54±0.12 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> WT, wild-type mice; TG-CON, transgenic control mice; TG-GL2, transgenic mice supplemented with 2% garlic; TG-GL5, transgenic mice supplemented with 5% garlic.

<sup>2)</sup> Values are mean±SEM(n=5).

<sup>3)</sup> Means with different superscript letters (<sup>a,b</sup>) in the same row are significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey's multiple range test.

<sup>4)</sup> Energy efficiency ratio=Body weight gained (mg)/calories consumed (kcal).

통해 마늘 식이 섭취가 실험동물에게 유해하지 않음을 확인할 수 있다.

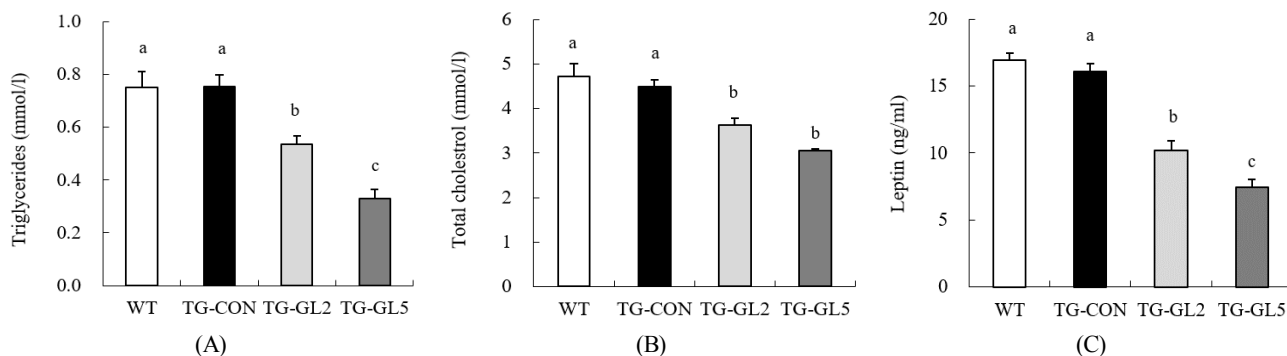
백색지방조직 무게는 TG-CON군에 비해 TG-GL2군과 TG-GL5군에서 각각 57.5%, 66.8% 유의적으로 감소하였으며( $p < 0.05$ ), WT군과 TG-CON군에서는 유의적인 차이가 없었다(Table 2). 이는 마늘의 체중 감소 효과가 체지방 감소와 관련되어 있음을 시사한다. 마늘의 섭취로 인한 백색지방 조직 무게 감소는 여러 연구들에서도 보고되었다. 특히, 고지방 식이에 5%의 마늘 분말을 첨가하여 8주간 섭취시킨 마우스의 부고환지방, 피하지방, 장간막지방 및 후복막지방이 고지방 식이만 섭취한 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며(Lee 등 2011), 고지방 식이에 고압마늘추출물을 첨가하여 11주간 섭취시킨 랫트의 부고환지방 무게 및 총 지방량이 대조군에 비하여 감소하였다(Joo 등 2013). 또한, Kim 등(2013)은 100, 250 및 500 mg/kg의 마늘 추출물을 고지방 식이유도 비만 마우스에 4주간 섭취시켰을 때, 부고환지방과 신장주변지방 무게가 농도 의존적으로 감소함을 보고하였으며, 마늘로부터 유래한 아조엔과 유기황화합물인 1,2-vinyldithiin이 지방합성관련 유전자 발현을 억제하여 마늘의 체지방 감소에 관여함이 보고되었다(Han 등 2011; Keophiphath 등 2009). 이러한 연구는 마늘이 체지방 감소를 통해 체중 감소 및 비만 예방에 효과를 나타내며, 다양한 생리활성성분이 마늘의 항비만 효능에 관여할 수 있음을 시사하고 있다.

### 3. 혈중 중성지방, 콜레스테롤 및 렙틴 함량

마늘 섭취가 혈청 지질 농도에 미치는 영향을 확인하기 위해 혈청 중성지방 및 총 콜레스테롤 농도를 측정하였다. 혈중 중성지방 농도는 TG-CON군에 비해 TG-GL2, TG-GL5군에서 각각 29%, 56.4% 감소하였으며( $p < 0.05$ )(Fig. 3A), 혈중 총 콜레스테롤 농도는 각각 19.1%, 32.2% 감소하였다( $p < 0.05$ )(Fig.

3B). 한편, WT와 TG-CON군은 혈장 중성지방 및 총 콜레스테롤 농도에서 유의적인 차이가 없었으며, 이는 형질전환으로 인한 개체 간에 영향을 주지 않았음을 의미한다. 많은 연구들에서 고지방 식이유도 비만 랫트에게 5% 한지형 마늘 분말 식이를 5주간 섭취시킨 경우, 랫트의 혈중 HDL-콜레스테롤이 증가하고, 혈중 중성지방과 총 콜레스테롤이 감소하는 것으로 나타났으며(Kang 등 2006), 4% 마늘 분말을 45일간 섭취시킨 고지혈증 유도 랫트의 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 VLDL-콜레스테롤이 감소하는 것으로 나타났다(Heidarian 등 2011). 사람을 대상으로 한 연구에서 혈중 콜레스테롤이 245 mg/dL 이상인 사람에게 42일간 마늘을 섭취시킨 후 혈중 HDL-콜레스테롤은 실험 전에 비하여 증가하였으며, 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방은 감소하였다(Mahmoodi 등 2011). 특히 마늘의 황 화합물이 간세포에서 콜레스테롤 생합성을 억제하고(Gebhardt & Beck 1996), 알리신이 고지혈증 토끼모델에서 혈청 지질 수준을 개선하며(Eilat 등 1995), 마늘의 혈중 지질 개선 효과는 malic enzyme, fatty acid synthase, glucose-6 phosphate dehydrogenase와 같은 지방 및 콜레스테롤 합성 효소들의 활성 억제와 관련이 있음이 보고되었다(Chi MS 1982; Qureshi 등 1983).

렙틴(leptin)은 지방세포에서 분비되는 단백질로, 식욕을 억제하고, 체내 에너지 소비를 증가시킴으로써 에너지대사 조절에 관여하는 주요 물질이다(Frederich 등 1995). 렙틴의 분비는 체지방이 늘어남에 따라 증가하며, 비만한 경우 렙틴 저항성으로 인해 그 분비량이 더욱 증가하므로 혈중 렙틴 농도는 비만의 지표 중 하나로 사용되고 있다(Mercer 등 2000). 본 실험에서 혈중 렙틴의 농도는 TG-CON군에 비해 TG-GL2군과 TG-GL5군에서 각각 36.5%, 53.5% 유의적으로 감소하였으며( $p < 0.05$ ), WT와 TG-CON군은 서로 유의적인 변화를 나타내지 않았다(Fig. 3C). 유사한 연구결과로 마늘 섭취로 인한

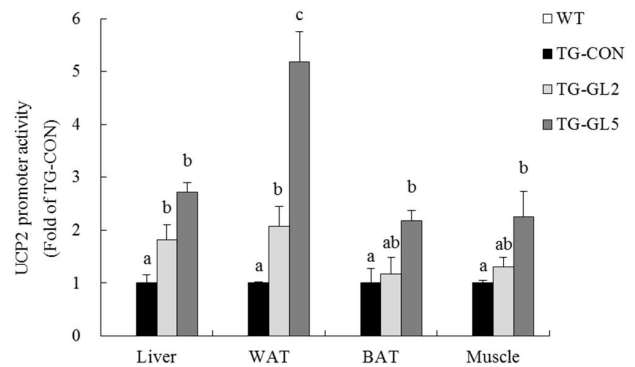


**Fig. 3.** Effects of garlic on plasma levels of triglycerides (A), total cholesterol (B), and leptin (C). Values are expressed as mean±SEM (n=5). Means with different letters (<sup>a-c</sup>) above bars are significantly different by Tukey's multiple range test ( $p < 0.05$ ). WT, wild-type mice; TG-CON, transgenic control mice; TG-GL2, transgenic mice supplemented with 2% garlic; TG-GL5, transgenic mice supplemented with 5% garlic.

실험동물의 혈중 중성지방과 총 콜레스테롤 및 렙틴 농도의 감소 효과는 본 연구진의 선행 연구에서 이미 보고한 바 있다 (Lee 등 2011). 또한, Kang 등(2006)은 5% 마늘 분말 식이가 고지방 식이 비만유도 랫트의 체지방 감소 및 혈중 렙틴 수준을 감소시킨다고 보고하였다. 따라서 본 연구결과들은 마늘이 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤과 렙틴 농도 감소에 효과가 있으며, 이는 마늘의 항비만 효과가 체중 및 백색지방 조직 무게 감소와 더불어 혈중 지질 농도 감소에서 기인하는 것으로 사료된다.

#### 4. 대사 조직 내 UCP2 프로모터 활성

본 연구에서는 마늘이 대사성 조직에서 UCP2 유전자의 전사 조절에 관여하는지 확인해 보고자 UCP2-luciferase 형질전환 마우스를 이용하여 수행되었다. Luciferase는 생물발광에 관여하는 효소이며, 포유동물은 내재적 luciferase 활성을 가지고 있지 않으므로 유전자의 조절이나 기능 또는 생리활성물질의 스크리닝(screening)을 위해 리포터 유전자로서 널리 사용되고 있다. 본 연구는 UCP2 유전자의 전사 조절 기능 연구를 위해 UCP2 프로모터 (-1,830/+30 bp)와 리포터 유전자인 luciferase를 포함하는 pGL3 basic vector를 재조합한(Fig. 1) 후 UCP2-luciferase 외래유전자가 삽입된 형질전환 마우스를 제작하였다(Fig. 2). 마늘 식이를 8주간 섭취한 고지방 식이 비만유도 UCP2-luciferase 형질전환 마우스의 간, 백색지방, 갈색지방 및 근육 조직에서 luciferase 활성도를 측정하였다. 간 조직의 luciferase 활성은 TG-CON군에 비해 TG-GL2군과 TG-GL5군에서 각각 1.8배와 2.7배 유의적으로 증가하였고( $p < 0.05$ ), 백색지방 조직에서는 각각 2.0배와 5.2배 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 4). 이에 반해, 갈색지방 및 근육 조직의 luciferase 활성도는 TG-CON군에 비해 TG-GL5군에서 각각 2.2배와 2.3배 유의적으로 증가하였으나( $p < 0.05$ ), TG-GL2군에서는 증가하는 경향을 보일 뿐 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 4). WT군의 간, 백색지방, 갈색지방 및 근육 조직에서는 luciferase 활성이 나타나지 않았다. UCP2는 미토콘드리아 내벽에 존재하는 운반체(transporter) 중 하나로 신체 조직에 폭넓게 존재하며, 발열반응을 통한 에너지소비를 촉진하여 비만의 조절에 관여한다. 본 연구진은 선행 연구를 통해 2%와 5%의 마늘 섭취가 고지방 식이 비만유도 마우스의 항비만 효과가 체중 증가와 더불어 간, 백색지방, 갈색지방 및 근육 조직 특이적인 UCP들(UCP1, UCP2, UCP3)의 mRNA 수준을 증가시키는 것을 확인하였다(Lee 등 2011). 또한, 알리신의 함량이 높은 마늘추출물은 고지방 식이를 섭취시킨 랫트의 체중 증가를 억제하고, UCP2 mRNA 발현을 증가시켰으며(Joo 등 2013), 마늘의 allyl-함유 황화물들은 갈색지방 조직에서 UCP2 단백질을 증가시키고, 혈중 noradrenalin과 adrenalin 분비를 증



**Fig. 4. Effects of garlic on UCP2 promoter activity in liver, white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT), and muscle.** The activity of UCP2 promoter was measured by a luciferase activity assay. The luciferase activity was calculated as a relative light unit (RLU) after normalizing to protein concentration. The relative fold-change in luciferase activity as compared with a TG-CON is shown as means $\pm$ SEM (n=5). Means with different letters (<sup>a,b</sup>) above bars are significantly different by Tukey's multiple range test ( $p < 0.05$ ). WT, wild-type mice; TG-CON, transgenic control mice; TG-GL2, transgenic mice supplemented with 2% garlic; TG-GL5, transgenic mice supplemented with 5% garlic.

가시킨다는 연구결과들이 보고되었다(Oi 등 1999). 이러한 연구결과들은 마늘이 체내에서 적응성 열 발생을 통한 에너지소모를 촉진하는 과정에 UCP2 유전자가 관여할 수 있음을 의미한다. 따라서 본 연구결과들은 마늘이 에너지대사에 관여하는 간, 백색지방, 갈색지방 및 근육 조직 등의 대사성 조직에서 UCP2 유전자의 발현을 증가시키에 있어서 UCP2 유전자 전사 활성 증가와 관련이 있음을 시사한다.

#### 요약 및 결론

본 연구는 마늘의 항비만 효과가 대사성 조직에서 UCP2 유전자의 전사 활성을 조절하는지 조사하기 위해 고지방 식이 비만유도 UCP2-luciferase 형질전환 C57BL/6J 마우스 모델을 이용하여 수행되었다. 6주령의 UCP2-luciferase 형질전환 수컷 C57BL/6J 마우스와 정상 C57BL/6J 마우스(WT)에게 45% 고지방 식이를 8주간 공급하여 비만을 유도한 후, 4 그룹으로 나누어 실험 식이를 공급하였다. 정상 마우스(WT)와 UCP2-luciferase 형질전환 마우스 대조군(TG-CON)에게 고지방 식이를 공급하였고, 실험군은 2%(TG-GL2) 또는 5%(TG-GL5)의 마늘을 고지방 식이에 첨가하여 8주간 UCP2-luciferase 형질전환 마우스에 공급하였다. 마늘식이를 섭취한 실험동물의 체중은 TG-CON군에 비해 TG-GL2군과 TG-GL5군에서 각각 10.8%, 18.6% 감소되어 마늘 섭취 용량 의존적으로 체중 감

소 효과를 나타내었다. 혈액의 중성지방과 총 콜레스테롤의 농도는 TG-CON군에 비해 TG-GL2군 및 TG-GL5군에서 유의적으로 감소되어, 마늘에 의한 지질 개선 효과를 보여주었다. 또한, 혈장 렙틴 농도도 TG-CON군에 비해 TG-GL2군과 TG-GL5군에서 유의적으로 감소되었다. 간, 백색지방, 갈색지방 및 근육 조직에서 UCP2 프로모터 활성은 TG-CON군에 비해 마늘 식이를 섭취한 TG-GL2군 및 TG-GL5군에서 용량 의존적으로 증가됨이 관찰되었다. 이 결과들은 마늘의 항비만 효과가 UCP2-luciferase 형질전환 마우스의 대사성 조직에서 UCP2 유전자 전사 조절에 관련되어 있음을 시사하고 있다. 아울러 본 연구에서 개발된 UCP2-luciferase 형질전환 마우스는 UCP2 유전자 전사 단계에 중점을 둔 분자 기전 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국연구재단이 주관하는 사업(No. 2005-2000418 및 2016R1A2B4011021)과 BK21 플러스사업(22A20130012143)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### References

- Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. 1997. Uncoupling protein-3: A new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408:39-42
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2015. Obesity and Overweight. Available from <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/obesity-overweight.htm> [cited 23 Dec 2016]
- Chi MS. 1982. Effects of garlic products on lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 171:174-178
- Choi JS, Jung MH, Park HS, Song J. 2004. Effect of conjugated linoleic acid isomers on insulin resistance and mRNA levels of genes regulating energy metabolism in high-fat-fed rats. *Nutrition* 20:1008-1017
- Diano S, Urbanski HF, Horvath B, Bechimann I, Kagiya A, Nemeth G, Naftolin F, Warden CH, Horvath TL. 2000. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in the nonhuman primate brain and pituitary. *Endocrinology* 141:4226-4238
- Eilat S, Oestraicher Y, Rabinkov A, Ohad D, Mirelman D, Battler A, Eldar M, Vered Z. 1995. Alteration of lipid profile in hyperlipidemic rabbits by allicin, an active constituent of garlic. *Coron Artery Dis* 6:985-990
- Fleischauer AT, Poole C, Arab L. 2000. Garlic consumption and cancer prevention: Meta-analyses of colorectal and stomach cancers. *Am J Clin Nutr* 72:1047-1052
- Frederich RC, Hamann A, Anderson A, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. 1995. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1:1311-1314
- Gebhardt R, Beck H. 1996. Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte culture. *Lipids* 31:1269-1276
- Han CY, Ki SH, Kim YW, Noh K, Lee DY, Kang B, Ryu JH, Jeon R, Kim EH, Hwang SJ, Kim SG. 2011. Ajoene, a stable garlic by-product, inhibits high fat diet-induced hepatic steatosis and oxidative injury through LKB1-dependent AMPK activation. *Antioxid Redox Signal* 14:187-202
- Haslam DW, James WP. 2005. Obesity. *Lancet* 366:1197-1209
- Heidarian E, Jafari-Dehkordi E, Seidkhani-Nahal A. 2011. Effect of garlic on liver phosphatidate phosphohydrolase and plasma lipid levels in hyperlipidemic rats. *Food Chem Toxicol* 49:1110-1114
- Joo H, Kim CT, Kim IH, Kim Y. 2013. Anti-obesity effects of hot water extract and high hydrostatic pressure extract of garlic in rats fed a high-fat diet. *Food Chem Toxicol* 55:100-105
- Kang JK, Park CY. 2012. Anti-obesity drugs: A Review about their effects and safety. *Diabetes Metab J* 36:13-25
- Kang SA, Shin HJ, Jang KH, Choi SE, Yoon KA, Kim JS, Chun HK, Lim Y. 2006. Effect of garlic on serum lipids profiles and leptin in rats fed high fat diet. *J Food Sci Nutr* 11:48-53
- Keophiphath M, Priem F, Jacquemond-Collet I, Clément K, Lacasa D. 2009. 1,2-vinyldithiin from garlic inhibits differentiation and inflammation of human preadipocytes. *J Nutr* 139:2055-2060
- Kim IH, Kim HR, Kim JH, Om AS. 2013. Beneficial effects of *Allium sativum* L. stem extract on lipid metabolism and antioxidant status in obese mice fed a high-fat diet. *J Sci Food Agric* 93:2749-2757
- Kim SJ, Bang CY, Guo YR, Choung SY. 2016. Anti-obesity effects of aster spathulifolius extract in high-fat diet-induced obese rats. *J Med Food* 19:353-364
- Kim SJ, Jung JY, Kim HW, Park T. 2008. Anti-obesity effects of *Juniperus chinensis* extract are associated with increased AMP-activated protein kinase expression and phosphorylation in the visceral adipose tissue of rats. *Biol Pharm Bull*

- 31:1415-1421
- Kim YS, Park KS, Kyung KH, Shim ST and Kim HK. 1996. Antibacterial activity of garlic extract against *Escherichia coli*. *Kor J Food Sci Technol* 28:730-735
- Langin D, Larrouy D, Barbe P, Millet L, Viguerie-Bascands N, Andreelli F, Laville M, Vidal H. 1999. Uncoupling protein-2 (UCP2) and uncoupling protein-3 (UCP3) expression in adipose tissue and skeletal muscle in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:S64-S67
- Lanzotti V. 2006. The analysis of onion and garlic. *J Chromatogr A* 1112:3-22
- Lee HS, Lim WC, Lee SJ, Lee SH, Lee JH, Cho HY. 2016. Antiobesity effect of garlic extract fermented by *Lactobacillus plantarum* BL2 in diet-induced obese mice. *J Med Food* 19:823-829
- Lee MS, Kim IH, Kim CT, Kim Y. 2011. Reduction of body weight by dietary garlic is associated with an increase in uncoupling protein mRNA expression and activation of AMP-activated protein kinase in diet-induced obese mice. *J Nutr* 141:1947-1953
- Lim SW and Kim TH. 1997. Physiological activity of alliin and ethanol extracts from korean garlic (*Allium sativum* L.). *Kor J Food Sci Technol* 29:348-354
- Mahmoodi M, Hosseini Zijoud SM, Hassanshahi GH, Toghrol MA, Khaksari M, Hajizadeh MR, Mirzajani E. 2011. The effects of consumption of raw garlic on serum lipid level, blood sugar and a number of effective hormones on lipid and sugar metabolism in hyperglycemic and/or hyperlipidemic individuals-Benefit of raw garlic consumption. *Adv Biol Chem* 1:29-33
- Mercer JG, Hoggard N, Morgan PJ. 2000. Leptin and Obesity. *CNS Drugs* 14:413-424
- Oi Y, Kawada T, Shishido C, Wada K, Kominato Y, Nishimura S, Ariga T, Iwai K. 1999. Allyl-containing sulfides in garlic increase uncoupling protein content in brown adipose tissue, and noradrenaline and adrenaline secretion in rats. *J Nutr* 129:336-342
- Padwal RS, Majumdar SR. 2007. Drug treatments for obesity: Orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet* 369:71-77
- Pintana H, Sripetchwandee J, Supakul L, Apajjai N, Chattipakorn N, Chattipakorn S. 2014. Garlic extract attenuates brain mitochondrial dysfunction and cognitive deficit in obese-insulin resistant rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 39:1373-1379
- Qureshi AA, Abuirmeileh N, Din ZZ, Elson CE, Burger WC. 1983. Inhibition of cholesterol and fatty acid biosynthesis in liver enzymes and chicken hepatocytes by polar fractions of garlic. *Lipids* 18:343-348
- Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D. 2004. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53:S130-S135
- Soleimani D, Paknahad Z, Askari G, Iraj B, Feizi A. 2016. Effect of garlic powder consumption on body composition in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Adv Biomed Res* 5:2
- Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB. 1997. UCP3: An uncoupling protein in homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 235:79-82
- Zalejska-Fiolka J, Wielkoszyński T, Rokicki W Jr, Dąbrowska N, Strzelczyk JK, Kasperczyk A, Owczarek A, Błaszczuk U, Kasperczyk S, Stawiarska-Pięta B, Birkner E, Gamian A. 2015. The influence of  $\alpha$ -lipoic acid and garlic administration on biomarkers of oxidative stress and inflammation in rabbits exposed to oxidized nutrition oils. *Biomed Res Int* 2015:827-879

---

Received 20 April, 2017

Revised 23 May, 2017

Accepted 26 May, 2017