

PGC-1 α 형질전환 생쥐에서 마늘 분말의 체지방 감소 효과

이 막 순 · *김 양 하
이화여자대학교 식품영양학과

The Body Fat-lowering Effect of Garlic Powder in Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivator-1 α (PGC-1 α)-luciferase Transgenic Mice

Mak-Soon Lee and *Yangha Kim

Dept. of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, Seoul 03760, Korea

Abstract

This study was performed to investigate the body fat-lowering effect of garlic powder in peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)-luciferase transgenic mice (TG). In this study, we generated transgenic mice with a PGC-1 α promoter (-970/+412 bp) containing luciferase as a reporter gene. 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 (CON), or high-fat diets supplemented with 2% (GP2) or 5% (GP5) garlic powder for an additional 8 weeks. Dietary garlic powder reduced the body weight in the GP2 and GP5 groups, compared to the CON group. Furthermore, garlic supplementation significantly decreased the plasma levels of triglycerides, total cholesterol, and leptin in the GP5 group, compared to the CON group. Specifically, luciferase activity in liver, white adipose tissue (WAT), and brown adipose tissue (BAT) was increased by garlic supplementation in a dose-dependent manner. These results suggest that the body fat-lowering effect of garlic powder might be related to PGC-1 α by the increase in luciferase activity in liver, WAT, and BAT. Furthermore, transgenic mice might be useful for evaluating the body fat-lowering effect of various health functional foods.

Key words: PGC-1 α , transgenic mice, garlic powder, body fat-lowering effect

서 론

비만은 체내에 지방 조직이 과도하게 저장되어 있는 상태를 말하며, 에너지 섭취와 소비간의 불균형으로 인해 발생한다(Haslam & James 2005). 비만은 전세계적으로 유병율이 급증하고 있으며, 심장병, 제2형 당뇨병, 고혈압, 동맥경화 등의 직간접 발생 원인이 되고 있다(Haslam & James 2005). 2014년 국민건강영양조사에 따르면 우리나라 성인 인구 중 비만 유병률은 32.9%로 꾸준히 증가되고 있어 사회적 문제로 대두되고 있다(KNHANES 2014).

마늘(garlic, *Allium sativum* L.)은 오랫동안 많은 국가에서 약용 식물로 사용되어 왔으며, 그 주성분은 물, 탄수화물, 단백질, 지방 및 식이 섬유이며, 필수 아미노산, 비타민 및 미네

랄을 함유하고 있다(Block E 1985). 특히, 마늘의 생리활성 성분은 alliin, allicin, allyl methanethiosulfinate, ajoene, diallyl disulfide, diallyl trisulfide, S-allylcysteine과 같은 화합물을 함유하고 있어 다양한 생리활성 효과를 갖는 것으로 알려져 있다(Agarwal KC 1996). 마늘의 생리활성 효과로는 항균 작용(Kim 등 1996; Lim 등 1997), 항암 작용(Kim 등 1997), 항콜레스테롤 작용(Chi MS 1982; Qureshi 등 1983), 항비만 작용(Kang 등 2006; Lee 등 2011; Lee 등 2016; Pintana 등 2014)에 대한 연구들이 보고되어 있다.

Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) 유전자는 세포 에너지 대사의 중심적인 역할을 하는 유전자 전사 보조인자(transcription coactivator)의 하나로, 열 생산, 미토콘드리아 합성, 포도당 신생 및 지질대사에 관

* Corresponding author: Yangha Kim, Dept. 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

여하는 전사조절인자이다(Knutti & Kralli 2001; Puigserver & Spiegelman 2003). PGC-1 α 는 질병과 건강한 상태 모두에서 에너지 대사에 관여하는 것으로 알려짐으로써 관심으로 모으고 있다. PGC-1 α 는 지방, 간과 근육조직에서 다양한 경로를 통해 세포 내 에너지 대사를 조절한다(Finck & Kelly 2006).

형질전환 생쥐는 특정 DNA를 생쥐에 삽입, 제거, 과발현(over-expression)시켜 생체 내 유전자 기능 연구 및 질환동물 모델 제작에 이용되는 기술이다(Kumar 등 2009). 형질전환 생쥐 생산 기술은 주로 질환 동물 모델을 기반한 형질전환 생쥐 개발에 중점적으로 이루어지고 있으며, 비만, 내분비 교란, 당뇨병, 지질대사, 근육대사 및 성장 연구 등을 위한 다양한 종류의 질환동물 형질전환 동물들이 개발되어 있다. 그러나 건강기능식품의 효능 평가는 약물의 효능 평가와는 달리 질환이 없는 건강한 상태에서 그 효능이 평가되어야 하므로 현재 다양하게 개발된 질환동물 형질전환 생쥐를 일방적으로 사용할 수 없다.

루시페라제(luciferase)는 생물발광에 관여하는 효소이며(Meisenheimer 등 2008), 포유동물은 내재적 루시페라제 활성을 가지고 있지 않으므로 유전자의 조절이나 기능 또는 생리활성물질의 스크리닝을 위해 리포터 유전자로서 널리 사용되고 있다. 그러나, 식이성 마늘이 비만 유도 PGC-1 α -루시페라제 생쥐의 간, 백색지방 및 갈색지방 조직에서 PGC-1 α 유전자 발현 조절에 관여하는지에 대한 연구는 아직 수행된 바가 없다.

본 연구에서는 에너지 대사 조절에 중추적인 역할을 하는 PGC-1 α 유전자와 리포터 유전자 루시페라제가 삽입된 형질전환 생쥐를 제작하여, 마늘 분말의 체지방 감소 효과 및 대사기능의 중심체인 PGC-1 α -루시페라제의 제어 기능의 가능성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. 유전자 재조합

-991/+417 bp 크기(Fig. 1A)의 인간 PGC-1 α 프로모터(promoter)는 인간 유전체 DNA(Clontech, USA)를 주형으로써 이용하였고, 양 끝에 Mlu I과 Xho I의 효소 크기를 인식하는 프라이머를 제작하여 PCR을 실시하였다. 프라이머의 설계는 forward 5'-GCG TCC CTC AGT TCA CAG ACA TTC T3', reverse 5'-CT CGA GAC AGT GCC AAA GTC ACA TGG A-3'로 하였고, PCR 반응의 조건은 denaturation 95°C 1분, annealing 64°C 1분, extension 70°C 2분으로 30 cycles로 하였다. PCR 산물은 전기영동하여 1,382 bp DNA를 gel extraction kit(Qiagen, USA)를 사용하여 회수하였다. PCR을 통해 얻은

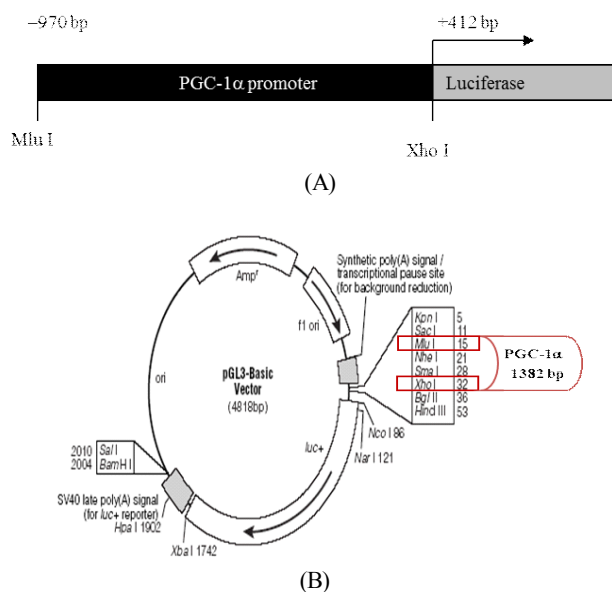


Fig. 1. Construction (A) and vector map (B) of PGC-1 α -luciferase reporter gene. PGC-1 α promoter (-970/+412 bp) was recombined with pGL3 basic vector using restriction enzymes (Mlu I and Xho I).

PGC-1 α 의 프로모터는 pGEM-T easy 벡터(Promega, USA)와 3:1의 비율로 T4 DNA ligase(Promega, USA)를 이용하여 subcloning한 후 (주) 코스모진텍(한국)에 유전자 해석을 의뢰하였다. 유전자 해석을 확인한 후 재조합된 pGEM-T easy 벡터는 제한효소 Xho I(Takara, Japan)과 Mlu I(Takara, Japan)으로 처리 후 전기영동하여 PGC-1 α 의 프로모터 부분인 1.4 kb 만 pGL3-basic 벡터를 T4 DNA ligase(Takara, Japan)를 이용하여 약 16°C에서 14시간 동안 배양시켜 두 유전자를 재조합시켰다(Fig. 1B).

2. 형질전환 생쥐 생산

형질전환 생쥐 제작을 위한 재조합 PGC-1 α -루시페라제 DNA는 Mlu I와 Sal I로 처리하여 자른 다음, 항생제 저항성 염기서열(Amp^r) 부위 제외한 PGC-1 α 프로모터와 루시페라제 부위가 포함된 선형 DNA를 대량생산하여 형질전환 생쥐 제작을 위한 미세주입에 사용하였다. 재조합된 PGC-1 α -루시페라제 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. 외래유전자가 핵 내에 주입되는지의 여부는 응성 전핵의 팽창으로 확인하였다. 순수 분리한 PGC-1 α DNA를 농도는 2~4 ng/ μ L가 되도록 미세주입용 용액(10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4)에 희석하여 준비하였다. PGC-1 α

DNA가 미세 주입된 수정란의 대리모 난관 이식하여 생쥐를 생산하였다.

3. 생쥐 꼬리 게놈 DNA 추출

형질전환 생쥐 꼬리에서 게놈 DNA는 Gentra pure gene kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였다. 게놈 DNA는 형질전환 생쥐 꼬리를 약 0.5 cm 정도 잘라내어 proteinase K가 함유된 용해 완충액을 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다.

4. 형질전환 생쥐 선별

PGC-1 α -루시퍼라제 형질전환 생쥐 선별은 삽입된 외래유전자인 루시퍼라제 특이적 프라이머를 제작한 후 RT-PCR을 이용하여 특정 염기서열만을 증폭하였다. RT-PCR은 10 pmol/ μ L의 루시퍼라제 프라이머 (5'-TGTACACGTTTCGTC-ACATCT-3'과 5'-GCAGACCAGTAGATCCAGAG-3')와 Hot-start taq polymerase(Bioneer, Korea)를 이용하여 증폭시켰다. PCR 반응 조건은 시작은 95°C에서 15분 배양 후 95°C에서 1분, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 25 cycles 진행하고, 마지막 증폭단계는 72°C에서 10분으로 설정하였다. PCR 생성물의 크기는 420 bp이며, PCR 결과 분석은 1.5%의 아가로스 겔에 전기영동한 후 자외선 광원(UV light)에서 관찰하였다.

5. 실험동물 사육 및 식이

생후 약 4-6주령의 PGC-1 α -루시퍼라제 형질전환 수컷 C57BL/6J 생쥐는 동물 사육실(실내온도 23 \pm 1°C, 상대습도 50 \pm 5%, 12시간 주야 사이클)에서 물과 고형배합 사료를 제한 없이 먹이면서 일주일간 환경에 적응시켰다. 적응기간 후 실험동물들에게 열량기준으로 45% 고지방 식이(Dyets, Bethlehem, PA, USA)를 8주간 공급하여 비만 유도한 다음, 체중에 따른 난괴법으로 각 군당 5마리씩 3그룹으로 나누었다. 각 군의 식이조성은 AIN-93G 식이를 기본으로 하여 23% lard, 17% casein, 12% sucrose, 20% starch, 15% dextrose, 6% cellulose, 4.3% minerals, 1.2% vitamins을 포함하는 45% 고지방 식이로 조제하였다. PGC-1 α -루시퍼라제 형질전환 생쥐 대조군(CON)은 고지방 식이를 공급하고 실험군은 2%(GP2) 또는 5%(GP5)의 마늘 분말을 고지방 식이에 첨가하여 8주간 PGC-1 α -루시퍼라제 형질전환 생쥐에 공급하였다(Table 1). 본 실험에 사용된 식이성 마늘 분말은 전라남도 고흥에서 구입한 생마늘을 동결 건조하여 분말화한 시료를 대상(주) (Deasang Corporation, Seoul, South Korea)로부터 제공받아서 사용하였다. 실험 기간에 물과 식이는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였고, 매주 두 번씩 일정한 시간에 체중과 식이섭취량을 측정하였다. 모든 동물실험 과정은 National Institutes of Health (NIH)의 실험동물관리 규정에 준하여 시행하였다.

Table 1. Component of experimental diets¹⁾ (g/kg)

Components ¹⁾	CON ⁴⁾	GP2	GP5
Casein	170.73	170.73	170.73
Sucrose	121.95	121.95	121.95
Cornstarch	201.71	181.71	151.71
Dyetrose	155.00	155.00	155.00
L-Cystine	2.20	2.20	2.20
Cellulose	60.98	60.98	60.98
Lard	229.50	229.50	229.50
Mineral mix ²⁾	42.68	42.68	42.68
Vitamin mix ³⁾	12.20	12.20	12.20
Choline bitartrate	3.05	3.05	3.05
Garlic powder	-	20.00	50.00
Total	1,000	1,000	1,000
Fat, %(calories)	45	45	45

¹⁾ Diets were based on the AIN-93G diet composition.

²⁾ AIN-93G mineral mixture.

³⁾ AIN-93G vitamin mixture.

⁴⁾ CON, transgenic control mice; GP2, transgenic mice supplemented with 2% garlic; GP5, transgenic mice supplemented with 5% garlic.

6. 실험동물의 희생 및 시료 채취

실험 종료 시 실험동물은 12시간 절식시킨 후, 희생 당일 Zoletil/Rompun(Bayer, Laverkusen, Germany) 혼합액을 복강내 투여하여 마취시킨 후 심장 채혈하였다. Ethylene diamine tetracetic acid(EDTA) tube에 채혈한 혈액을 넣은 뒤, 4°C, 2,800 \times g, 20분간 원심분리한 혈장(plasma)은 분석 전까지 -80°C에 보관하여 사용하였다. 간, 백색지방(부고환 지방), 갈색지방은 적출하여 액체질소에서 급속 동결한 후 분석 전까지 -80°C에 보관하였다.

7. 혈액 내 생화학적 분석

혈장의 alanine aminotransferase(AST), aspartate aminotransferase(ALT), 중성지방 및 콜레스테롤 농도는 효소법을 이용한 분석 kit(Asan Pharmaceutical, Korea)를 사용하여 측정하였다. 혈장 렙틴 농도는 렙틴 효소면역정량 kit(R & D Systems, USA)를 이용하여 측정하였다.

8. 루시퍼라제 활성 측정

루시퍼라제 활성은 적출한 조직을 용해한 후, Luciferase reporter assay system(Promega, Germany)을 이용하여 Turner

Designs TD 20/20 luminometer(Turner Designs, USA)에서 측정하였다. 조직량의 표준화를 위한 단백질 함량은 BCA protein assay(Pierce, USA) kit를 사용하여 측정하였다.

9. 통계 분석

모든 실험결과는 SPSS 19.0(IBM Corporation, USA)을 이용하여 통계 분석하였다. 분석수치는 실험군당 평균(mean)과 표준오차(standard error; SE)로 나타내었고, 일원배치 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. 유전자 재조합

-991/+417 bp 크기의 PGC-1 α 프로모터 5' 말단에 Xho I과 Mlu I 제한효소 인식배열을 부가하여 PCR로 증폭시킨 다음, 이것을 pGEM-T easy 벡터에 결찰시킨 것을 제한효소 Xho I와 Mlu I를 처리하여 확인하였다. pGL3-basic 벡터(4,818 bp)는 제한효소 Xho I와 Mlu I로 처리하고 alkaline phosphatase에 의해 탈인산화하여 아가로스 겔 추출한 후 크기를 확인하였다. pGL3-basic 벡터와 PGC-1 α 의 프로모터를 결찰한 재조합 DNA는 제한효소 Sal I와 Xba I로 처리하여 6,200 bp 크기를 확인하였고 Xho I와 Mlu I 처리를 통해서 4,818 bp 벡터와 1,382 bp의 삽입체 크기를 확인하였다(Fig. 2).

2. 형질전환 생쥐 생산

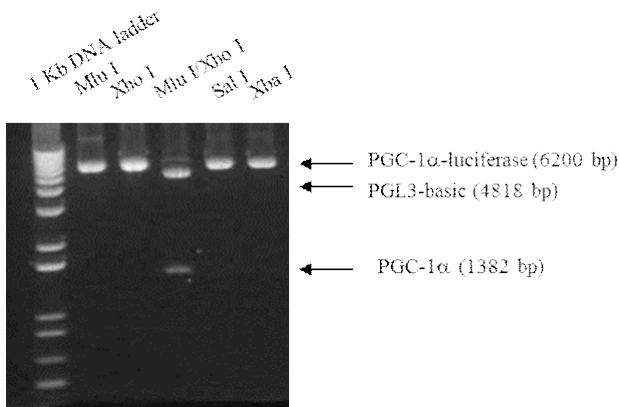


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PGC-1 α promoter (1,382 bp)/pGL3-basic (4,818 bp) plasmid. The PGC-1 α -luciferase reporter gene (-991/+417 bp) was digested with several restriction enzymes. Size of recombinant DNA was 6,200 bp.

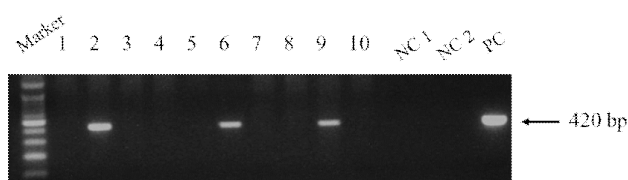


Fig. 3. Mouse genotypes identified by the expression of mouse PGC-1 α -luciferase transgenic mice. Genotypes of the mice are determined by PCR amplification using luciferase-specific primer (420 bp of the amplified fragment). Marker, 100 bp ladder; Founder 0 (F0) mice, 1~10; NC1 (negative control 1), dH₂O; NC2 (negative control 2), C57-BL/6J wild-type genomic DNA; PC (positive control), PGC-1 α -luciferase DNA (1 ng).

PGC-1 α -루시페라제 형질전환 생쥐는 PGC-1 α -루시페라제 DNA가 미세 주입된 수정란의 대리모 난관 이식하여 생산하였다. 외래 유전자의 분석은 대리모(C57BL/6J)로부터 태어난 산자의 꼬리 게놈 DNA를 추출하고, 루시페라제 유전자 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR 방법으로 확인하였다. 도입된 외래 유전자가 생쥐의 염색체 내에 삽입되어 있는지의 여부를 조사하여 외래 유전자 루시페라제가 발현되는 총 3마리의 founder 생쥐를 얻었다(Fig. 3). 형질전환 생쥐를 다량 확보하기 위해 PGC-1 α -C57BL/6J-homozygous mice로부터 wild-type C57BL/6J와 교배하였다. 각각의 태어난 생쥐는 루시페라제 특이적 프라이머를 이용하여 RT-PCR 방법으로 도입유전자 양성 생쥐를 선별하여 PGC-1 α -루시페라제 형질전환 생쥐를 다량 확보하였다.

3. PGC-1 α 형질전환 생쥐에서 마늘 분말의 체지방 감소 효과

마늘은 항균작용(Kim 등 1996; Lim 등 1997), 항암(Kim 등 1997), 항콜레스테롤(Chi MS 1982; Qureshi 등 1983), 항비만(Lee 등 2011) 등의 유익한 효과가 있는 것으로 이미 알려져 있다. 마늘의 유익한 효과는 allicin과 그 유도체를 포함한 다양한 유기황 화합물에 기인할 수 있다(Jisawa 등 2008). Allicin은 휘발성 화합물로 매우 불안정하며, sulfides, ajoene, vinylthiols과 같은 여러 화합물로 분해된다(Jisawa 등 2008). 특히, ajoene은 3T3-L1 지방 세포에서 세포 사멸을 유도하고, 지방 축적을 감소시키는 것으로 나타났다(Yang 등 2006). 또한, Han 등(2011)은 고지방 식이와 ajoene을 섭취한 생쥐에서 체중 증가를 감소와 더불어 AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성화를 통한 간 지방증과 산화 손상을 억제한다고 보고하였다. 더욱이, vinylthiols은 사람의 전 지방세포 분화를 억제한다고 보고하였다(Keophiphath 등 2009). 마늘에서 유래한 유기황 화합물의 이러한 효과는 마늘의 체지방 감소

효과에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 PGC-1 α -루시퍼라제 형질전환 비만 생쥐에 게 마늘 식이를 2%(2 mg/g)와 5%(5 mg/g) 급여하였는데, 이는 건강기능성식품 기능성 평가 가이드(KFDA 2004)에 의한 시험물질의 식이 첨가수준에 따라 농도를 설정하였다. 건강기능성식품 기능성 평가 가이드(KFDA 2004)에 따르면, 단일 물질은 0.02~0.5%, 추출물은 0.5~4%, 그리고 식품 원재료는 2~5% 농도를 설정할 수 있다고 보고하였다(KFDA 2004). 또한, 마늘 분말 시료는 식이 섭취량을 정량하기 위해 식이에 첨가하였다. 마늘 식이를 8주간 섭취한 고지방 식이유도 PGC-1 α -루시퍼라제 형질전환 비만 생쥐의 체중, 식이섭취량 및 에너지섭취량은 Table 2와 같다. 시작체중, 식이섭취량과 에너지섭취량은 모든 군 간에 유의적인 차이가 없었으며, 체중변화는 CON군에 비해 GP2군과 GP5군에서 각각 13%와 19% 유의적으로 감소하였다. 많은 연구들에서는 고지방식으로 비만을 유도한 동물모델에서 마늘이 체중 감소 효과가 있음이 보고되었다(Kang 등 2006; Lee 등 2011; Lee 등 2016; Pintana 등 2014). 부고환 지방 무게는 CON군에 비해 GP2군과 GP5에서 각각 34%와 43% 유의적으로 감소하였으며, 간의 무게는 모든 군간에 차이가 없었다. 혈장 내 간 독성 지표인 AST와 ALT 효소 활성은 실험군간 변화가 없어 마늘 분말 섭취가 간세포의 손상을 일으키지 않음을 보여주었다(Table 2). 비만으로 인한 이상지질혈증은 주로 혈장 유리 지방산과 중성지방의 증가, HDL 콜레스테롤의 감소, LDL 콜레스테롤의 증가와 관련이 있다(Boudewijn 등 2013). 렙틴은 에너지 섭취, 소비 조절에 중요한 역할을 하며, 지방조직에서 분비하여 식욕 억제에 관여하는 호르몬이다(Brennan & Mantzoros

2006). 체지방이 증가하면 혈액 내 렙틴 수준도 증가한다. 본 연구에서 혈장 내 중성지방, 총 콜레스테롤과 렙틴 함량은 CON군에 비해 GP5군에서 유의적인 감소를 보였으며, GP2군에서는 감소하는 경향을 나타내었다(Table 3). 이는 2%, 5%의 마늘 분말을 7주간 섭취한 고지방 식이유도 비만 생쥐의 혈중 중성지방, 콜레스테롤과 렙틴 감소 효과가 본 연구진의 선행연구 결과와 유사하며(Lee 등 2011), Kang 등(2006)은 5% 마늘 분말을 5주간 섭취한 고지방 식이유도 비만 렙틴에서 혈중 중성지방, 콜레스테롤과 렙틴이 감소하고, HDL-콜레스테롤이 증가하는 것으로 보고하였다. 이전의 한 연구에서 마늘 추출물의 콜레스테롤 저하 효과가 ajoene과 S-allylcysteine과 같은 수용성 황 화합물에 의한 간 콜레스테롤 합성의 억제에 부분적으로 기인한다고 보고하였다(Jalal 등 2007).

PGC-1 α 는 포도당 신생, 미토콘드리아 생합성, 지질대사 및 열 생산에 관여하는 전사조절인자로서(Knutti & Kralli 2001; Puigserver & Spiegelman 2003), 간 조직, 백색 지방 조직과 갈색지방 조직에서 다양한 경로를 통해 세포 내 에너지 대사를 조절한다(Finck & Kelly 2006). 간 조직에서는 공복 상태에서 PGC-1 α 발현이 증가되고, 이로 인해 포도당 신생과 배출이 증가되는 생리적인 스위치 역할을 한다(Andersson & Scarpulla 2001). 백색지방조직에서 PGC-1 α 는 uncoupling protein 1(UCP1) 유전자 발현과 미토콘드리아 생합성을 유도하며, 갈색 지방 조직에서는 발열 반응에 필수적인 미토콘드리아 UCP1의 전사를 활성화시킴으로써 PPAR- γ 가 갈색 지방 세포 분화를 유도할 수 있다(Wu 등 1999). 본 연구에서는 마늘 식이를 8주간 섭취한 비만 유도 PGC-1 α -루시퍼라제 형질전환 생쥐의 간, 백색지방 및 갈색지방 조직에서 루시퍼라제

Table 2. Effects of garlic on physiological variables of PGC-1 α -luciferase transgenic mice

	CON ¹⁾	GP2	GP5
Initial body weight (g)	30.4±1.0	31.0±1.2	30.8±1.1
Final body weight (g)	42.3±1.1 ^b	36.8±1.2 ^a	34.3±1.2 ^a
Food intake (g/day)	3.54±0.11	3.53±0.10	3.53±0.23
Energy intake (kcal/day)	16.5±0.53	16.4±0.47	16.4±1.06
Tissue weight (g/100 g body weight)			
Liver	3.61±0.75	3.62±0.29	3.63±0.15
Epididymal white adipose tissue	5.94±0.75 ^b	3.90±0.29 ^a	3.41±0.15 ^a
Brown adipose tissue	1.95±0.07 ^b	1.64±0.02 ^a	1.40±0.16 ^a

¹⁾ CON, transgenic control mice; GP2, transgenic mice supplemented with 2% garlic powder; GP5, transgenic mice supplemented with 5% garlic powder.

²⁾ Values are mean±SEM (n=5).

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

Table 3. Effects of garlic powder on plasma metabolites of PGC-1 α -luciferase transgenic mice

	CON ¹⁾	GP2	GP5
Triglycerides (mmol/L)	0.71±0.07 ^b	0.55±0.03 ^{ab}	0.41±0.04 ^a
Total cholesterol (mmol/L)	4.51±0.32 ^b	3.71±0.32 ^{ab}	3.24±0.25 ^a
Leptin (ng/mL)	13.67±0.37 ^b	9.35±0.32 ^{ab}	7.68±0.25 ^a
AST (IU/L)	66.3±10.1	66.4±3.8	65.8±6.6
ALT (IU/L)	25.2±4.0	24.1±1.8	24.0±1.5

¹⁾ CON, transgenic control mice; GP2, transgenic mice supplemented with 2% garlic powder; GP5, transgenic mice supplemented with 5% garlic powder.

²⁾ Values are mean±SEM (n=5).

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

활성을 분석하였다. 간 조직의 루시퍼라제 활성은 CON군에 비해 GP2군과 GP5군에서 각각 1.7배와 2.7배 증가하였고 (Fig. 4A), 백색지방 조직에서는 각각 1.7배와 2.9배 증가하였으며 (Fig. 4B), 갈색지방에서는 각각 2.5배와 4.8배 증가하였다 (Fig. 4C). 최근, Pagliei 등(2013)은 마늘에서 추출한 diallyl disulfide가 신경 모세포종 세포에서 PGC-1 α 유전자 발현을 증가시켰으며, mitochondrial transcription factor 1(TFAM)과 mitochondrial DNA(mtDNA) 유도와 관련이 있음을 보고하였다. 따라서, 본 연구 결과들은 마늘이 체내에서 에너지 대사에 관여하는 PGC-1 α 유전자를 조절할 수 있음을 의미한다.

요약 및 결론

본 연구는 PGC-1 α -루시퍼라제 유전자가 삽입된 형질전환 생쥐를 이용하여 PGC-1 α -루시퍼라제의 제어 기능과 관련된 마늘의 체지방 감소 효능을 검증하였다. 먼저, -991/+417 bp 크기의 PGC-1 α 프로모터를 루시퍼라제가 발현하는 pGL3-basic 벡터와 재조합하여 PGC-1 α -루시퍼라제 형질전환 생쥐를 생산하였다. 마늘식이를 섭취한 PGC-1 α -루시퍼라제 형질전환 생쥐의 체중은 CON군에 비해 GP2군과 GP5군에서 각각 13%, 19% 감소되어 마늘 섭취 용량 의존적으로 체중감소 효과를 나타내었다. 혈액의 중성지방, 총 콜레스테롤 및 렙틴 농도는 CON군에 비해 GP5군에서 유의적으로 감소되어 마늘에 의한 지질 개선 효과를 보였다. 간 조직, 백색지방 조직과 갈색지방 조직에서 PGC-1 α -루시퍼라제 활성은 CON군에 비해 마늘 식이를 섭취한 GP2군 및 GP5군에서 용량 의존적으로 증가됨이 관찰되었다.

위 결과를 종합해 볼 때, 마늘 분말의 체지방 감소 효과를 PGC-1 α -루시퍼라제 형질전환 생쥐의 간 조직, 백색지방 조직

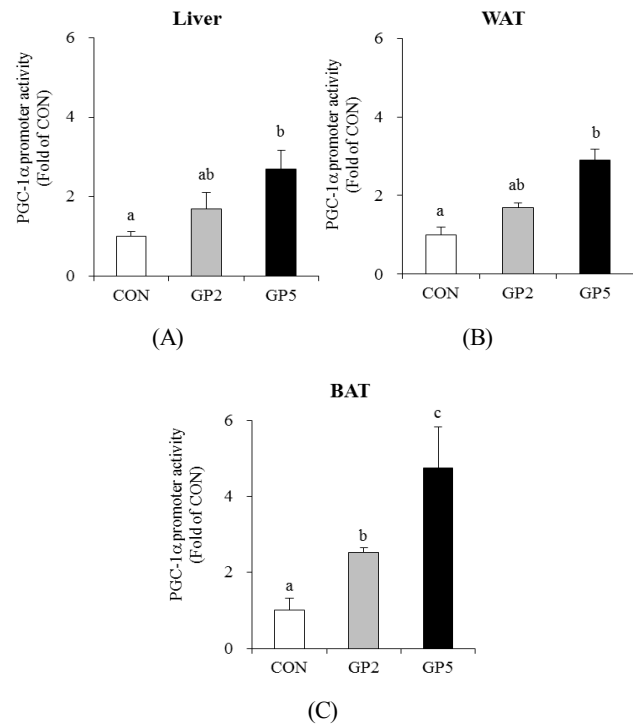


Fig. 4. Effects of garlic powder on PGC-1 α promoter activity in liver (A), WAT (B), and BAT (C). The activity of PGC-1 α promoter was measured by a luciferase activity assay. The luciferase activity was calculated as a relative light unit (RLU) after normalizing to protein concentration. The relative fold-change in luciferase activity as compared with a CON is shown as means±SEM (n=5). Means with different letters (a, b) above bars are significantly different by Tukey's multiple range test ($p < 0.05$). CON, transgenic control mice; GP2, transgenic mice supplemented with 2% garlic powder; GP5, transgenic mice supplemented with 5% garlic powder. WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue.

과 갈색지방 조직에서 PGC-1 α 유전자 발현 증가를 PGC-1 α -루시퍼라제 활성도 측정을 통하여 검증하였다. 즉, 질환상태가 아닌 정상대사 상태의 PGC-1 α -루시퍼라제 형질전환 생쥐는 다양한 건강기능식품 소재의 체지방 감소 및 PGC-1 α 조절 대사와 관련된 유효성 평가에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

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

References

- Agarwal KC. 1996. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev* 16:111-124
- Andersson U, Scarpulla RC. 2001. PGC-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor-1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21:3738-3749
- Block E. 1985. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* 252:114-119
- Boudewijn Klop, Jan Willem F. Elte, Manuel Castro Cabezas. 2013. Dyslipidemia in obesity: Mechanisms and potential targets. *Nutrients* 5:1218-1240
- Brennan AM, Mantzoros CS. 2006. Drug insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2: 318-327
- Chi MS. 1982. Effects of garlic products on lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 171:174-178
- Finck BN, Kelly DP. 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116:615-622
- Han CY, Ki SH, Kim YW, Noh K, Lee da Y, 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
- Yang JY, Della-Fera MA, Nelson-Dooley C, Baile CA. 2006. Molecular mechanisms of apoptosis induced by ajoene in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity* 14:388-397
- Jalal R, Bagheri SM, Moghimi A, Rasuli MB. 2007. Hypoglycemic effect of aqueous shallot and garlic extracts in rats with fructose-induced insulin resistance. *J Clin Biochem Nutr* 41:218-223
- Jisawa H, Suma K, Origuchi K, Kumagai H, Seki T, Ariga T. 2008. Biological and chemical stability of garlic-derived allicin. *J Agric Food Chem* 56:4229-4235
- Kang SA, Shin HJ, Jang KH, Choi SE, Yoon KA, Kim JS. 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 ES, Chun HJ, Kim BK, Rhee KC. 1997. Garlic and cancer prevention. *J Food Sci Nutr* 2:180-190
- Kim YS, Park KS, Kyung KH, Shim ST, Kim HK. 1996. Antibacterial activity of garlic extract against *Escherichia coli*. *Kor J Food Sci Technol* 28:730-735
- Knutti D, Kralli A. 2001. PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol Metab* 12:360-365
- Korea Food and Drug Administration (KFDA). 2004. Guideline for Functionality Evaluation of Health Functional Food 1st ed. pp.401
- Kumar TR, Larson M, Wang H, McDermott J, Bronshteyn I. 2009. Transgenic mouse technology: principles and methods. *Methods Mol Biol* 590:335-362
- 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, Kim TH. 1997. Physiological activity of alliin and ethanol extracts from Korean garlic (*Allium sativum* L.). *Kor J Food Sci Technol* 29:348-354
- Meisenheimer PL, O'Brien MA, Cali JJ. 2008. Luminogenic enzyme substrates: The basis for a new paradigm in assay design. *Promega Notes* 100:22-26
- Pagliei B, Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. 2013. Garlic-derived diallyl disulfide modulates peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 alpha in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 85:335-344
- Pintana H, Sripetchwandee J, Supakul L, Apaijai 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
- Puigserver P, Spiegelman BM. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24: 78-90
- 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

The Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES). 2014. Available from: <http://www.cdc.go.kr/CDC/contents/CdcKrContentLink.jsp?fid=21&cid=65846&ctype=1> [cited 6 Oct 2015]

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Moo-

tha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98:115-124

Received 12 June, 2017
Revised 01 August, 2017
Accepted 07 August, 2017