

산달래 추출물의 3T3-L1 지방전구세포 분화 억제 효능

이주연¹ · 정예주¹ · 김진아¹ · 김춘영^{1,*}
¹영남대학교 식품영양학과

Inhibitory effect of *Allium macrostemon* extracts on adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes

Joo-Yeon Lee¹, Yeju Jeong¹, Jina Kim¹, and Choon Young Kim^{1,*}
¹Department of Food and Nutrition, Yeungnam University

Abstract The aim of this study was to compare the biological activities of whole-plant (WAE), bulb (BAE), and leaf (LAE) extracts of *Allium macrostemon*. The antioxidant activities, total polyphenol contents, and anti-adipogenic activities of WAE and LAE were superior to those of BAE, whereas the biological effects of WAE and LAE were similar. Therefore, the effect of LAE on adipogenesis was further investigated. Treatment of preadipocytes with LAE at 100 g/mL resulted in the inhibition of intracellular lipid accumulation by 49.64%. Consistent with this result, quantitative reverse transcription-PCR showed that LAE treatment decreased the gene expressions of CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), C/EBP α and stearyl-CoA desaturase 1 (SCD1). Thus, LAE attenuates the adipogenesis of preadipocytes by suppressing the expression of adipogenic and lipogenic genes. These results suggest that LAE can be potentially useful as a functional ingredient to prevent obesity in the food industry.

Keywords: anti-obesity, adipocyte differentiation, *Allium macrostemon*, long-stamen chive, antioxidant activity

서 론

전세계적으로 비만은 개인과 사회의 건강을 위협하는 문제이다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 매년 최소 280만명의 사람들이 비만으로 사망한다고 발표하였다(WHO, 2020). 2018년 기준으로 우리나라 성인의 비만 유병률은 35.7%이었으며, 남자 45.4%, 여자 26.5%로 최근 10년간 비만 유병률은 크게 증가하고 있는 추세이다(KSSO, 2019). 또한 비만으로 인한 사망률과 합병증의 상대위험도가 정상체중에 비해 과체중 및 비만한 사람에게서 더 높다. 따라서 비만을 예방하기 위한 다양한 노력으로 지방세포분화(adipogenesis) 억제, 지방 합성(lipogenesis) 억제, 지방분해(lipolysis) 촉진과 같이 지방조직을 타겟으로 하는 항비만 기전이 연구되고 있다(Morrison과 Farmer, 2000).

비만은 지방조직이 비정상적으로 증가된 상태이며, 지방조직의 확장은 지방세포의 비대(hypertrophy)와 과형성(hyperplasia)으로 인하여 일어난다. Hypertrophy는 지방세포의 부피(volume)가 커지는 것을 의미하고, hyperplasia는 지방세포의 수(number)가 증가하는 것으로 지방전구세포(preadipocyte)가 지방세포(adipocyte)로 분화(differentiation)되는 과정을 의미한다. Hypertrophy는 인슐린 감수성(insulin sensitivity) 저하, 염증성 사이토카인 발현 증가, 면역

세포 반응성 증가, 다량의 유리 지방산 방출로 인한 독성 유발 등과 같은 현상을 일으켜 비만으로 인한 질환의 원인이 된다(Choe 등, 2016).

지방전구세포가 지방세포로 분화되는 과정(adipogenesis)에는 여러가지 전사인자, 효소, 단백질 등이 관여한다(Wong 등, 2014). 항비만 연구 중 지방세포분화에 많이 사용되는 3T3-L1 지방전구세포는 100% confluence 상태가 되면 cell to cell contact에 의해 growth arrest 상태가 된다. 분화유도 물질인 dexamethasone과 3-isobutyl-1-methylxanthine은 각각 분화 초기단계 전사인자인 CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBP δ)와 C/EBP β 를 일시적으로 발현시킨다. 또한 insulin은 C/EBP β 에 의해 일어나는 mitotic clonal expansion을 촉진시킨다(Farmer, 2006; Maki 등, 2017). 이 때 발현되는 C/EBP β 는 adipogenesis를 일으키는 핵심 전사인자인 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)와 C/EBP α 의 발현을 증가시켜 lipogenesis를 유도한다(Lowe 등, 2011).

Adipogenesis 중·후기 과정에서 sterol regulatory-element binding protein 1 (SREBP-1) 전사인자와 acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), stearyl-CoA desaturase 1 (SCD1) 효소 등의 활성으로 인해 지방산 생합성(fatty acid biosynthesis)이 일어난다(Chang과 Kim, 2019; Cignarelli 등, 2019; Guo 등, 2014). SREBP-1은 SCD1과 FAS 등 lipogenic enzymes 발현을 증가시켜 세포 내 중성지방 생성 및 축적을 유도한다(Farmer, 2006; Lowe 등, 2011). 따라서 이러한 adipogenic 전사인자 또는 lipogenesis 관련 유전자 발현의 조절을 통해 지방전구세포의 분화를 억제하는 것은 항비만 연구에서 중요한 기전으로 여겨진다(Wang과 Hai, 2015).

산달래(Long-stamen chive)는 수선화(Amaryllidaceae)과 부추

*Corresponding author: Choon Young Kim, Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsbuk, Gyeongsan 38541, Republic of Korea
Tel: +82-53-810-2871
Fax: +82-53-810-4666
E-mail: cykim@yu.ac.kr
Received June 16, 2020; revised July 30, 2020;
accepted July 31, 2020

(*Allium*)속의 여러해살이풀이다. 학명은 *Allium macrostemon*이며 주로 동아시아에 분포되어 있다(Zhang 등, 2015; Zhang 등, 2012). 봄에 채취되어 전체를 식용하거나 약재로도 쓰이며 알려진 주요 효능으로 항고지혈증, 항우울증, 항응고 등이 있다(Zhang 등, 2015). 산달래의 주요 기능성 성분에는 휘발성 오일, 질소 화합물, 스테로이드성 사포닌, 그리고 플라보노이드 화합물이 있다(Zhang 등, 2012). 산달래의 생리활성에 관한 연구는 대부분 비늘줄기의 polysaccharide를 이용하여 생리활성성분 분석, 추출 최적화 조건과 항산화 활성 등에 초점을 두었다. 몇몇 연구에서 산달래의 고혈당, 고지혈증 및 내장비만 예방효과 등의 결과를 보고하였으나 산달래의 항비만에 대한 연구는 미흡한 실정이다(Xie 등, 2008; Zhang 등, 2015; Zhang 등, 2012). 따라서 본 연구는 산달래를 전체, 비늘줄기, 잎 부분으로 분리하여 항산화능을 검증한 후, 각 시료들의 3T3-L1 지방전구세포 분화 억제 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 산달래는 2019년 4월 경상북도 군위군에서 수확한 것을 경산 식자재마트에서 구입하여 사용하였다. Insulin, dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Oil Red O (ORO) 및 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

추출물의 제조

산달래는 깨끗이 수세하여 이물질을 제거한 후 일부는 잎과 비늘줄기를 분리하였다. 산달래 전체, 비늘줄기와 잎 부위를 각각 동결건조 후 마쇄하여 분말형태로 만들었다. 각 시료 무게의 10 배(w/v)의 증류수를 가하여 autoclave (VS-1221, Vision, Seoul, Korea)로 121°C에서 20분간 추출하였다. 추출액은 거즈로 2회 여과 후 여과액을 12,000×g에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 상등액은 rotary vacuum evaporator (N-1300, EYELA-Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 45°C에서 농축 후 동결건조하여 실험에 사용하였다. 산달래 전체 추출물(a whole-plant of *Allium macrostemon* extract, WAE), 비늘줄기 추출물 (a bulb of *Allium macrostemon* extract, BAE), 그리고 잎 추출물(leaves of *Allium macrostemon* extract, LAE)의 수율은 각각 27.52, 66.19, 43.36%로 나타났다.

Radical scavenging activity assay

라디칼 소거능 측정은 Brand-Williams의 방법을 변형하여 실시하였다(Brand-Williams 등, 1995). 시료 50 µL와 0.02% 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 100 µL를 혼합하여 암실에서 30분간 반응시킨 후, 510 nm에서 microplate spectrophotometer (Epoch, BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 기존의 알려진 항산화제인 ascorbic acid를 다양한 농도로 증류수에 녹여 동일한 방식으로 흡광도를 측정 후 검량선을 작성하였다. 이때 시료에 함유된 DPPH radical 소거능은 검량선을 이용하여 계산하였으며, 측정 단위는 DPPH radical scavenging activity (% of control)로 나타내었다.

Total polyphenol contents

총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해서 Folin-Ciocalteu법을 이용하여 실험하였다(Singleton 등, 1999). 시료 10 µL와 20 µL의 10% Folin-Ciocalteu reagent를 혼합하고 여기에 80 µL의 700

mM sodium carbonate를 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid를 95% methanol에 다양한 농도로 녹여 동일한 방법으로 흡광도를 측정 후 검량선을 작성하였고, 이를 이용하여 총 폴리페놀 함량을 시료 1 g당 milligram gallic acid로 계산하였다. 측정 단위는 milligram gallic acid equivalent (mg GAE)/g of sample이다.

Ferric reducing antioxidant power assay

Fe³⁺이온을 Fe²⁺이온으로 환원시키는 환원력을 측정하는 ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay는 Benzie의 방법으로 실시하였다(Benzie과 Strain, 1996). Sodium acetate buffer (300 mM, pH 3.6), 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), 및 20 mM ferric chloride를 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합한 것을 FRAP reagent로 사용하였다. 각 농도별 샘플 10 µL에 10 µL의 증류수와 100 µL의 FRAP reagent를 각각 첨가하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 샘플의 환원력은 여러 농도로 녹인 ferrous sulfate로 작성한 검량식에 대입하여 환산하였다.

3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 분화 유도

실험에 사용된 3T3-L1은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 배양배지로는 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgene, Daegu, Korea)에 10% calf serum (CS, Newborn Calf Serum Heat-inactive, Gibco, Grand Island, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin antibiotics (Penicillin-Streptomycin Solution, Welgene, Daegu, Korea)를 첨가하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다.

세포 분화를 위하여 3T3-L1 세포를 24-well plate에 2.5×10⁴ cells/mL로 분주하여 100% confluence까지 배양하였다(Day -2). 이로부터 2일 후 10% fetal bovine serum (FBS, Fetal bovine serum, certified, US origin, Gibco, Grand Island, NY, USA)-DMEM, 1% penicillin-streptomycin antibiotics에 최종농도가 500 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, 167 nM insulin이 되도록 첨가하여 분화를 시작하였다(Day 0). 분화 시작 후 48시간(Day 2)일 때 insulin을 포함한 10% FBS-DMEM 배지로 교환하여 2일 동안 처리한 후(Day 4), 10% FBS-DMEM 배지로 2일간 더 배양하였다(Day 6). Phosphate buffered saline (PBS)에 녹인 시료들은 분화 유도 기간 동안(Day 0-6) 각 배지에 100 배의 농도로 희석하여 처리하였다.

MTT assay를 이용한 세포 독성 평가

시료가 세포 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다. 세포를 24-well plate에 80% confluence까지 배양한 후, 시료를 농도별로 배양 배지에 희석하여 24시간 동안 처리하였다. 상층액을 제거하고 PBS에 5 mg/mL로 녹인 MTT 용액을 배양 배지에 10% (w/w)가 되도록 희석한 것을 각 well당 0.5 mL씩 넣는다. 이 plate를 CO₂ incubator에 1시간 동안 반응시켰다. MTT 용액을 제거한 다음 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 300 µL씩 넣고 빛을 차단한 상태에서 plate를 충분히 흔들어 주어 보라색 formazan을 완전히 용해시켰다. 이를 96-well plate에 50 µL씩 덜어낸 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도(absorbance, A)는 아래의 식에 대입하여 세포 생존율을 산출하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_{\text{treatment}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

Oil red O 염색

시료의 3T3-L1 분화 억제 효능을 확인하기 위하여 Oil red O 염색을 실시하였다. Oil red O는 중성지방(triglyceride)을 염색하는 방법으로 세포 내 지방을 정량화할 수 있다. 분화 유도가 끝난 Day 6에 3T3-L1의 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척한 다음 3% formaldehyde 용액으로 30분 동안 세포를 고정시켰다. 증류수로 세포를 세척 후 isopropyl alcohol에 0.5%의 농도로 녹인 Oil red O 용액을 증류수와 6:4의 비율로 희석하여 처리하고 30분간 염색을 실시하였다. 증류수로 세척 후 광학현미경을 통해 중성지방 생성 및 염색 정도를 확인하였다. 세포 내 지방 함량을 비교하기 위해 염색된 지방을 isopropyl alcohol로 녹인 후 microplate reader를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Total RNA 추출 및 역전사 반응

분화유도가 끝난 3T3-L1 세포(Day 6)를 4°C에 보관된 PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 넣고 피펫팅하여 1.5 mL tube에 회수하였다. 여기에 chloroform을 넣고 실온에서 3분간 더 반응시킨 후 12,000×g, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 얻은 맑은 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. 분리된 상층액과 isopropyl alcohol를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시키고 12,000×g, 4°C에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액은 모두 버리고 diethyl pyrocarbonate (DEPC)-H₂O에 희석한 75% ethyl alcohol로 잔존한 RNA pellet을 세척하였다. 이후 침전된 RNA pellet을 상온에서 말렸다. 추출된 RNA는 DEPC-H₂O에 녹여 NanoDrop (NanoDrop Lite Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 농도를 측정하였다. 이때, purity optical density인 A260/A280 ratio는 1.8-2.0이 되도록 하였다. 위 모든 과정은 ice 위에서 실시하였다. 분리된 total RNA는 -70°C에 보관하였다.

추출한 total RNA로 reverse transcription을 실시하여 cDNA를 합성하였다. 실험에 사용된 역전사효소는 iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA)이며 제조사의 사용설명서에 따라 5X iScript Reaction Mix 4 µL, iScript Reverse transcriptase 1 µL, total RNA (1,000 ng/µL), RNase-water를 넣어 mixture를 제조하였다. 역전사는 Simpli Amp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 이용하여 25°C에서 5분간 priming, 46°C에서 20분간

reverse transcription, 95°C에서 1분간 reverse transcription inactivation의 조건으로 실시하였다. 합성된 cDNA는 4°C에 보관하였다.

Quantitative RT-PCR법

세포 내 유전자 발현 정도를 알아보기 위해 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 실험을 수행하였다. 관심 유전자에 대한 primer (Bioneer Inc., Daejeon, Korea)의 염기서열은 Table 1에 제시하였다. DNA binding dye로는 SYBR Green (2x SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA)을 사용하였다. 실험에 사용된 총 반응 용액은 20 µL로 SYBR Green 10 µL, primer forward 0.5 µL (50 pM), primer reverse 0.5 µL (50 pM), cDNA, distilled water로 구성되었다. StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystem)을 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 각 샘플의 housekeeping gene은 β-actin을 이용했다. PCR cycling 조건은 95°C에서 10분간 initial denaturation 단계를 거친 후, 95°C에서 15초간의 denaturation과 60°C에서 60초간의 annealing와 extension의 조건으로 40 cycles을 반복하였다. PCR을 수행한 후 유전자 발현은 각 gene들의 Ct값을 이용하여 delta-delta-Ct (ΔΔCt)법으로 계산하여 분석하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고, IBM SPSS (Ver. 23, IBM Corp., Armonk, NY, USA) 통계 프로그램을 이용하였다. 각 실험결과의 평균치들은 일원배치 분산분석 중 Duncan's multiple range test, Dunnett's t-test, Tukey's HSD를 시행하여 비교하였다. 통계적 유의성은 p<0.05 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

산달래 추출물의 항산화능

산달래 전체 추출물(a whole-plant of *Allium macrostemon* extract, WAE), 비늘줄기 추출물(a bulb of *Allium macrostemon* extract, BAE), 그리고 잎 추출물(leaves of *Allium macrostemon* extract, LAE)의 생리활성을 확인하기 위하여 추출물 내 총 폴리페놀 함량, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) 라디칼 소거능과 환원력을 측정하였다.

산달래 추출물 3분류의 총 폴리페놀 함량은 Fig. 1A와 같다. WAE, BAE, 그리고 LAE의 총 폴리페놀 함량은 각각 13.93 mg GAE/g of sample, 1.49 mg GAE/g of sample, 13.73 mg GAE/g

Table 1. The primer sequences used for qRT-PCR

Target gene	Forward sequences (5'→3')	Reverse sequences (5'→3')
C/EBPβ ¹⁾	AGC GGC TGC AGA AGA AGG	GGC AGC TGC TTG AAC AAG TTC
PPARγ ²⁾	CCC AAT GGT TGC TGA TTA CAA AT	TTT CTA CTT TGA TCG CAC TTT GGT ATT CT
C/EBPα ³⁾	GGT TTA GGG ATG TTT GGG TTT TT	AAG CCC ACT TCA TTT CAT TGG T
SREBP-1c ⁴⁾	GGCACTGAAGCAAAGCTGAAT	GCAAGAAGCGGATGTAGTCGAT
SCD1 ⁵⁾	GGTGATGTTCCAGAGGAGGTACTAC	AGCGTGGGCAGGATGAAG
FAS ⁶⁾	GCC ACC CAC CGT CAG AAG	TGT CAC ATC AGC CAC TTG AGT GT
β-actin	AGA TGA CCC AGA TCA TGT TTG AGA	CAC AGC CTG GAT GGC TAC GT

¹⁾C/EBPβ: CCAAT/enhancer binding protein-β
²⁾PPARγ: peroxisome proliferator activated receptor-γ
³⁾C/EBPα: CCAAT/enhancer binding protein-α
⁴⁾SREBP-1c: sterol regulatory element-binding protein-1c
⁵⁾SCD1: stearyl-CoA desaturase1
⁶⁾FAS: fatty acid synthase

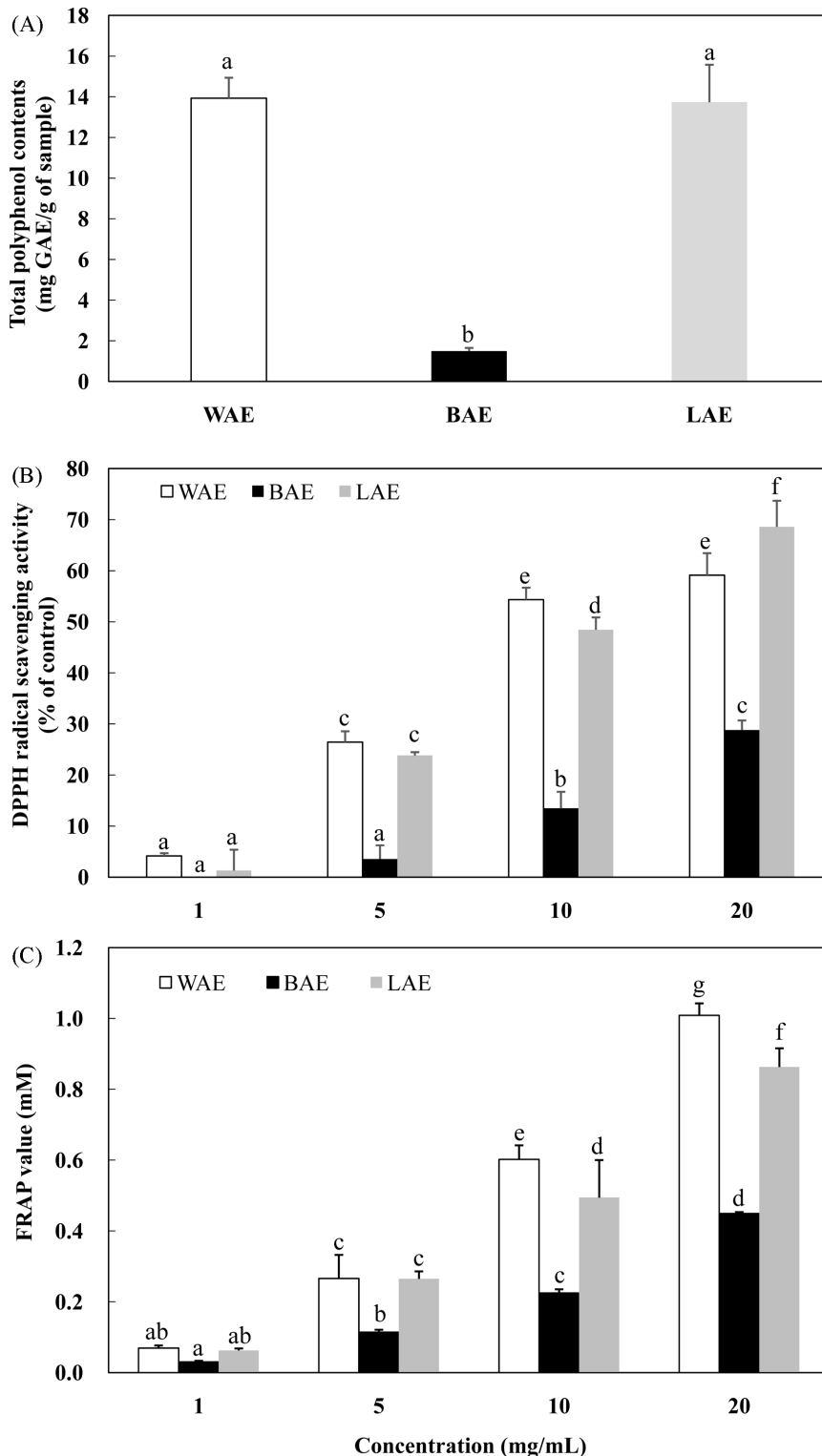


Fig. 1. Antioxidative capacity of whole, bulb, and leaf extracts from *Allium macrostemon* measured by (A) total polyphenol content, (B) DPPH radical scavenging activity, and (C) ferric ion reducing antioxidant power assays. The samples were a whole plant of *Allium macrostemon* extract (WAE), a bulb of *Allium macrostemon* extract (BAE), and leaves of *Allium macrostemon* extract (LAE). Values are mean±standard deviation (SD) (n=3-9). Values with different letters in a column are different at 5% significance level by Duncan's multiple range test.

of sample으로 나타났다. WAE와 LAE의 총 폴리페놀 함량은 유의적 차이가 없었으나 BAE의 경우 현저하게 낮은 것으로 측정되었다. 본 연구에서 총 폴리페놀 함량은 LAE, WAE, BAE 순서

로 높게 나타났는데 국내에서 소비되는 다양한 채소류와 비교하면 Kim (2020)은 품종별 고추들의 총 폴리페놀 함량이 2.517-7.480 mg of GAE/g of residue로 보고하였고(Kim 등, 2020), Im

등(2010)은 재배지 고도에 따른 무 품종별 총 폴리페놀 함량이 485.1-1751 mg ferulic acid/100g dry weight이라 보고한 것과 비교하였을 때(Im 등, 2010), 산달래는 높은 폴리페놀 함량을 가진 것을 알 수 있다. 산달래와 동일한 *Allium* 속 식물들의 항산화 결과를 살펴보면 Kim 등(2012)은 마늘(*Allium scorodorpasum* var. *viviparum* Regel)의 총 폴리페놀 함량이 19.41 mg/g GAE라고 보고하였으며(Kim 등, 2012), Kim 등(2004)은 양파(*Allium cepa* L.)의 총 폴리페놀 함량은 9.3 g caffeic acid/100 g이며(Kim 등, 2004), Han과 Kim (2017)은 대파(*Allium fistulosum* L.) 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량이 301.38 µg QE/g이라 하였다(Han과 Kim, 2017). 이러한 결과는 *Allium* 속 식물 중 산달래가 우수한 항산화 효능과 더불어 다양한 생리활성을 가진 폴리페놀 함량이 높은 식물인 것으로 여겨진다(Manach 등, 2004). 또한 Zhang 등(2012)은 산달래 비늘줄기의 주성분은 다당류이며, Nakane와 Iwashina (2015)는 잎의 주성분이 플라보노이드라고 보고한 것을 토대로, 산달래의 대부분을 차지하는 것은 잎이기 때문에 전체와 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량이 유사하게 나타난 것이라고 사료된다(Nakane와 Iwashina, 2015; Zhang 등, 2012).

추출물의 항산화능을 판단하기 위하여 DPPH radical scavenging activity를 수행하였다(Fig. 1B). 농도 1, 5, 10, 20 mg/mL의 추출물로 DPPH radical 소거능 평가를 실시한 결과, 농도 5 mg/mL의 WAE, BAE, LAE에서 각각 26.44, 3.57, 23.83%의 라디칼 소거능을 보였다. WAE, BAE, LAE 농도 10 mg/mL에서의 라디칼 소거능은 각각 54.34, 13.48, 48.43%로 나타났다. 농도 20 mg/mL의 WAE, BAE, LAE에서 각각 59.14, 28.80, 68.60%의 라디칼 소거능을 보였다. WAE와 LAE 농도 5 mg/mL에서는 DPPH radical 소거능이 유의적인 차이가 없었고 농도 10 mg/mL에서는 WAE가 LAE보다 높은 라디칼 소거능을 보였으나 20 mg/mL에서 LAE가 WAE보다 높은 라디칼 소거능을 나타냈다. Jung 등(2011)은 산달래 메탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 0.05 mg/mL의 농도에서 17.70%의 라디칼 소거능이 나타났다고 보고하여 본 실험의 결과보다 높은 항산화 활성을 보였는데 이러한 차이는 사용된 시료의 품종, 전처리 방법, 추출 방법의 차이 때문이라 판단된다(Jung 등, 2011).

각 산달래 추출물 부위별 환원력은 Fig. 1C와 같다. 각 시료의 환원력은 농도의존적으로 증가했으며 모든 농도에서 환원력은 WAE, LAE, BAE 순으로 나타났다. 농도 20 mg/mL에서 WAE는 1 mM로 유의적으로 높은 값을 보였으며, 이어서 LAE는 0.86 mM, BAE는 0.45 mM로 측정되었다. Kim 등(2012)은 농도 1 mg/mL의 *Allium* 속 식물 중 *Allium scorodorpasum* var. *viviparum* Rege (마늘), *Allium cepa* L. (양파), 및 *Allium fistulosum* L. (대파)의 FRAP value는 각각 0.06, 0.25, 0.30 mM로 나타났다고 보고하였고, 본 실험에서 농도 1 mg/mL WAE, BAE, LAE의 FRAP value는 0.07, 0.03, 0.06 mM로 측정된 결과와 유사하거나 높게 나타났다(Kim 등, 2012).

연구결과에서 산달래 추출물 중 비늘줄기 추출물(BAE)은 DPPH radical 소거능과 총 폴리페놀 함량은 현저하게 낮고, 전체(WAE)와 잎 추출물(LAE)은 유의적으로 차이가 없거나 잎에서 높게 측정되었음을 알 수 있다. 이는 산달래의 대부분을 차지하는 잎 부위가 WAE에서도 높은 비중을 차지하며, autoclave를 이용하여 추출했기 때문이라 판단된다. Autoclave를 이용한 고온고압 추출방법은 식물체의 세포벽을 파괴하면서 용출되는 불용성 성분으로부터 보다 많은 폴리페놀 성분이 용매에 녹아드는 추출방법이다(Hamissa 등, 2012). 고온고압 추출법으로 인해 식물체 잎의 항산

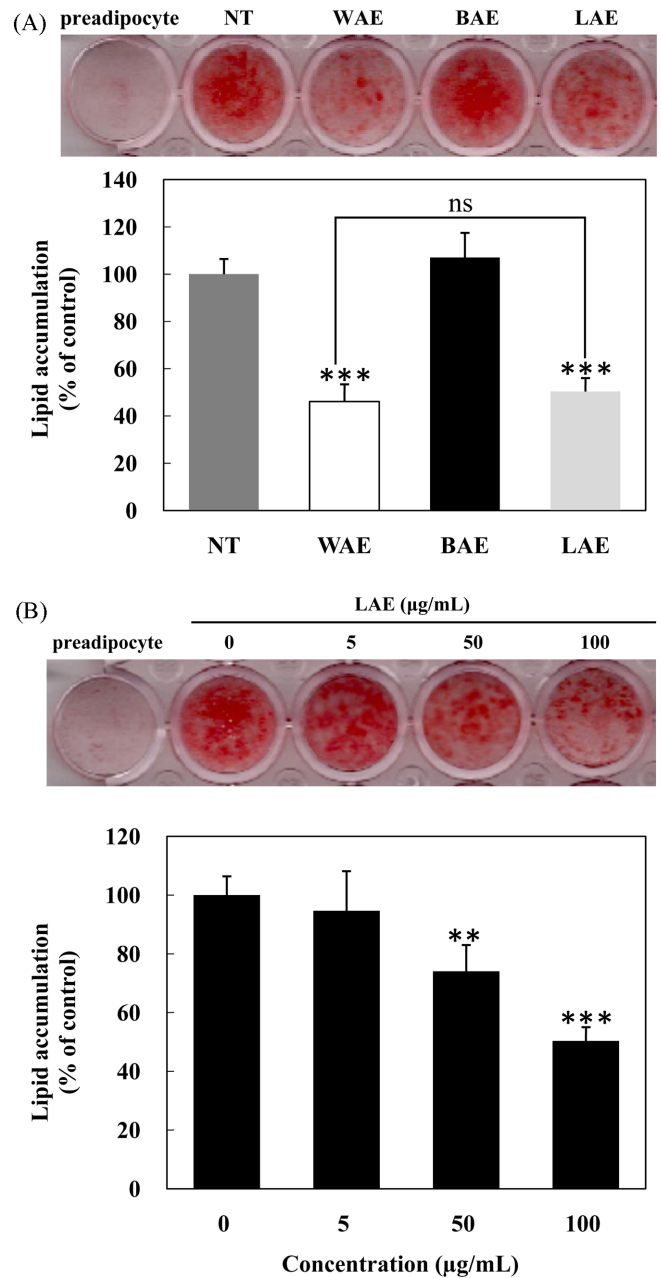


Fig. 2. Lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes treated with *Allium macrostemon* extracts during adipogenesis. (A) 3T3-L1 preadipocytes were differentiated in the absence and presence of 100 µg/mL of a whole-plant of *Allium macrostemon* extract (WAE), a bulb of *Allium macrostemon* extract (BAE), and leaves of *Allium macrostemon* extract (LAE). Intracellular lipid accumulation was estimated by Oil Red O staining on Day 6 of adipogenesis. (B) Leaves of *Allium macrostemon* extract (LAE) at a concentration of 5, 50, and 100 µg/mL were added in 3T3-L1 preadipocytes for 6 days during adipogenesis. Oil Red O staining was conducted to visualize intracellular lipid accumulation. Values are expressed as the mean±SD (n=4). Statistical analysis was performed using Dunnett's t-test and p values were provided (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). Values are compared to differentiated control respectively. NT: non-treatment, ns: not significant.

화능을 포함한 생리활성을 가지는 다양한 페놀성 성분과 비타민류가 효율적으로 추출된 것으로 생각된다(Ksouri 등, 2007).

산달래 추출물의 3T3-L1 지방전구세포 분화 억제능

3T3-L1 지방전구세포는 분화를 유도하면 세포 내 중성지방(triglyceride, lipid droplet)이 축적된다(Moreno-Navarrete와 Fernandez-Real, 2017). 따라서 산달래 추출물이 3T3-L1 지방세포분화(adipogenesis)에서 세포 내 지방구(lipid droplet) 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 농도 100 µg/mL의 WAE, BAE, LAE를 분화유도 기간(Day 0-6)인 총 6일 동안 처리하고 Oil red O 염색을 통하여 중성지방의 축적 정도를 확인하였다(Fig. 2A). 분화가 끝난 Day 6에 지방전구세포 (preadipocyte, pre)와 비교하였을 때 대조군(non-treatment, NT)의 경우 세포 내 중성지방이 현저하게 형성되어 전체적으로 Oil red O 염색이 된 것을 통해 분화 여부를 확인할 수 있었다. 농도 100 µg/mL의 WAE, LAE를 분화유도기간인 6일 동안 처리한 경우에 NT와 비교하여 각각 53.9, 49.69%의 세포 내 중성지방이 감소한 데 반해 BAE는 분화를 억제하지 않았다. 이를 통해 BAE는 지방전구세포 분화에 영향을 미치지 않으며, WAE와 LAE는 NT와 비교하여 유의적으로 지방전구세포 분화를 억제할 것을 알 수 있었다.

본 연구에서 WAE는 53.9%의 세포 내 지질 축적 억제능을 나타내어 지방세포 내 지방구 생성 억제효과가 있는 것을 확인했다. Kim 등(2019)의 연구에서 *Allium* 속 식물들의 세포 내 지방 축적을 Oil red O 염색법을 통해 확인한 결과, 가장 높은 지질 축적 억제 효능을 보인 *Allium tuberosum*, *Allium macrostemon*, *Allium thumbergii*은 각각 45.6%, 57%, 64.9%의 억제능을 나타냈다(Kim 등, 2019). 이는 본 연구의 결과와 유사하여 *Allium* 속 식물들이 지방전구세포 분화 억제능이 있음을 확인할 수 있었다.

산달래 추출물의 지방전구세포 분화 억제 효능은 BAE에서는 관찰되지 않았고 WAE와 LAE는 유의적으로 분화를 억제하였으나 WAE와 LAE의 지방전구세포 분화 억제 효능은 유사하였다. 이는 앞서 수행된 WAE와 LAE의 총 폴리페놀 함량 비교 결과와 유사하다. 따라서 산달래의 잎에 항산화, 항염증, 비만예방 등의 생리활성 성분이 집중되어 있다고 판단하여, 이후 실험에서는 LAE의 3T3-L1 지방전구세포 분화에 대한 영향을 확인했다. 농도 5, 50, 100 µg/mL의 LAE를 분화 유도 기간인 6일 동안 처리하였을 때 세포 내 지방 축적 억제 활성이 각각 5.36, 25.95, 49.64%로 나타나, LAE의 지방전구세포 분화 억제 효과가 농도의존적임을 확인하였다(Fig. 2B). 이와 같은 실험 결과를 통해 산달래의 잎(LAE)이 adipogenesis 억제 효능을 가지고 있다는 사실을 알 수 있었다.

LAE의 생리활성 물질로 kaempferol 3,4-di-*O*-glucoside, quercetin 3-*O*-glucoside, kaempferol 3-*O*-glucoside 등이 있다(Nakane와 Iwashina, 2015). Quercetin의 glycosyl화된 유도체인 quercetin 3-*O*-glucoside는 사과와 채소에 다량 함유된 것으로 알려져 있다(Makino 등, 2013). Lee 등(2017)은 농도 20 µM의 quercetin 3-*O*-glucoside가 34%의 지질 축적 억제능을 보여 항비만 효능을 가진 물질로서의 가치를 밝혔다(Lee 등, 2017). Muni 등(2020)은 농도 20 µg/mL의 kaempferol 3-*O*-glucoside가 56.24%의 지질 축적 억제 효과가 있음을 확인하였으며, 주요 adipogenesis 관련 유전자인 PPAR γ , C/EBP α , FAS, leptin, adiponectin의 발현량을 농도의존적으로 억제한다고 보고하였다(Muni 등, 2020). 따라서 LAE의 지방세포 분화 억제능은 LAE의 생리활성 물질 중 많은 부분을 차지하는 quercetin 3-*O*-glucoside로부터 기인된 것으로 사료된다.

산달래 추출물의 3T3-L1 지방전구세포의 생존율에 대한 영향

산달래 추출물(WAE와 LAE)의 지방전구세포 분화 억제 효능이 3T3-L1 지방전구세포에 대한 추출물의 독성 때문인지 또는

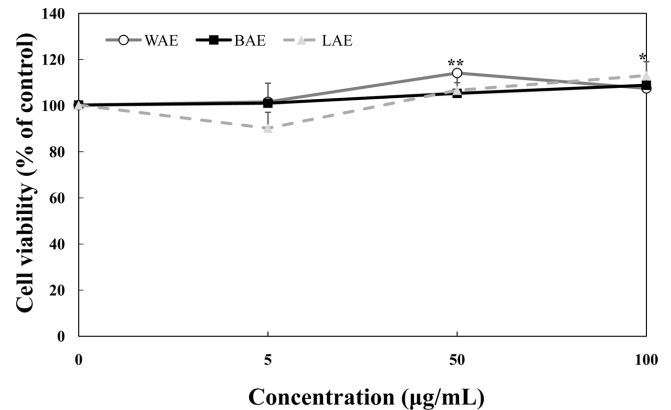


Fig. 3. Cell viability of 3T3-L1 preadipocytes treated with three *Allium macrostemon* extracts. MTT assay was performed to test the effects of a whole-plant of *Allium macrostemon* extract (WAE), a bulb of *Allium macrostemon* extract (BAE), and leaves of *Allium macrostemon* extract (LAE) on cell viability of 3T3-L1 preadipocytes. Increasing concentrations (0, 5, 50, 100 µg/mL) of WAE, BAE, and LAE were added in 3T3-L1 preadipocytes for 24 h. Data represent means±SD (n=9). Statistical analysis was performed using Dunnett's t-test and *p* values were provided (**p*<0.05; ***p*<0.01). Values are compared to 0 µg/mL in same sample respectively.

생리활성 능력 때문인지를 파악하기 위하여 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 3). 다양한 농도(0, 5, 50, 100 µg/mL)의 WAE, BAE와 LAE를 80% confluence까지 배양한 3T3-L1 세포에 24시간 동안 처리하여 MTT assay를 실시한 결과는 Fig. 3과 같다. 가장 높은 농도인 100 µg/mL에서 WAE, BAE, LAE의 생존율은 각각 107.48, 108.86, 113.05%로 확인되었다. 따라서 산달래 추출물은 농도 100 µg/mL까지 3T3-L1 지방전구세포 생존율에 영향을 미치지 않으며, Fig. 2에서 확인한 지방전구세포 분화 억제능은 산달래 추출물의 생리활성 때문인 것으로 판단할 수 있었다.

산달래 잎 추출물이 adipogenesis 관련 유전자 발현에 미치는 영향

LAE가 adipogenesis 과정에 관여하는 전사인자들의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 산달래 잎 추출물을 농도별(0, 5, 50, 100 µg/mL)로 3T3-L1 세포 분화 기간 6일 동안 처리한 후 quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) 실험을 수행한 결과는 Fig. 4와 같다. 분화를 유도하지 않은 지방전구세포인 preadipocyte (pre)와 비교하였을 때, NT에서 adipogenesis를 일으키는 대표적 전사인자인 CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), C/EBP α 유전자 발현이 유의적으로 증가되는 것을 확인하였다. 농도 5, 50, 100 µg/mL의 LAE에서 C/EBP β , PPAR γ 그리고 C/EBP α 의 발현이 각각 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 가장 높은 농도인 100 µg/mL의 경우 대조군과 비교하였을 때 C/EBP β 의 유전자 발현은 약 72%, PPAR γ 의 유전자 발현은 100%, C/EBP α 의 유전자 발현은 약 87% 감소되었다.

본 연구에서는 농도 100 µg/mL의 LAE가 adipogenic genes (C/EBP β , PPAR γ , C/EBP α)의 유전자 발현을 억제하는 것으로 확인하였다. Kim 등(2019)은 *Allium hookeri* root가 C/EBP α 의 유전자 발현을 유의적으로 감소시키는 활성을 가져 항비만 효능이 있다고 보고하였다(Kim 등, 2019). Balogun 등(2020)은 *Allium sativum* L. 추출물이 C/EBP β , PPAR γ , C/EBP α 의 유전자 발현을 감

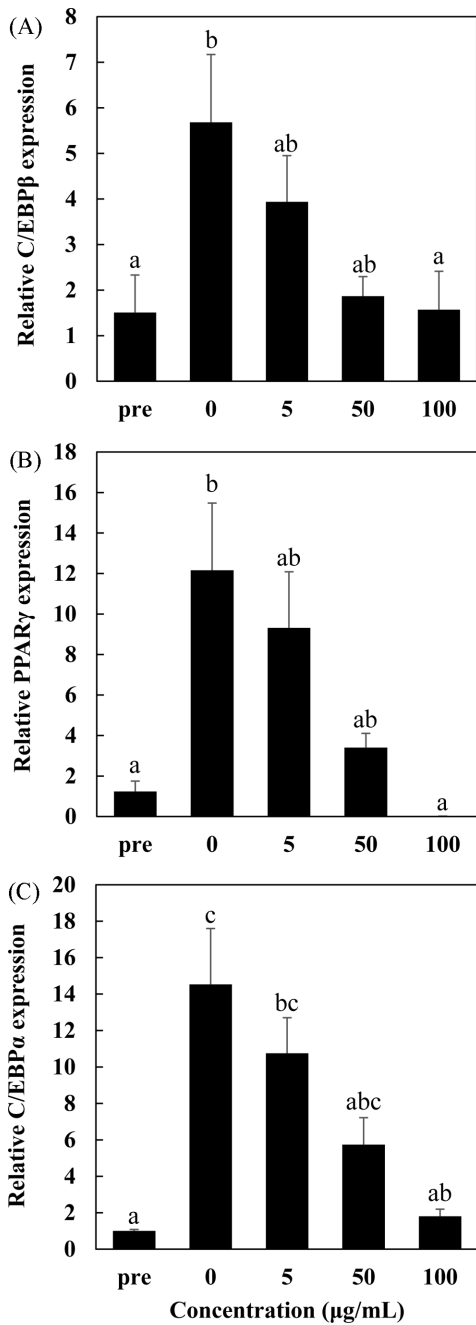


Fig. 4. Adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes treated with leaves of *Allium macrostemon* extract. Leaves of *Allium macrostemon* extract (LAE) at concentrations of 0, 5, 50, 100 μg/mL were added in 3T3-L1 cells during differentiation. On Day 6, total cellular RNA was extracted and reverse transcription was performed. Synthesized cDNAs were subjected to quantitative RT-PCR. The levels of adipogenic genes such as (A) CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPβ), (B) peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) and (C) C/EBPα were normalized to β-actin. Values are expressed as the mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's HSD at $p < 0.05$. pre: preadipocyte.

소시켜 지방세포 내 지질 축적 억제능이 있음을 확인하였다 (Balogun 등, 2020). 이상의 결과에서 나타난 *Allium* 속 식물들은 분화 관련 유전자의 발현을 억제하여 지방세포 분화 억제능을 가진 것으로 여겨지며 본 실험을 통해 전사인자 발현이 감소된 산

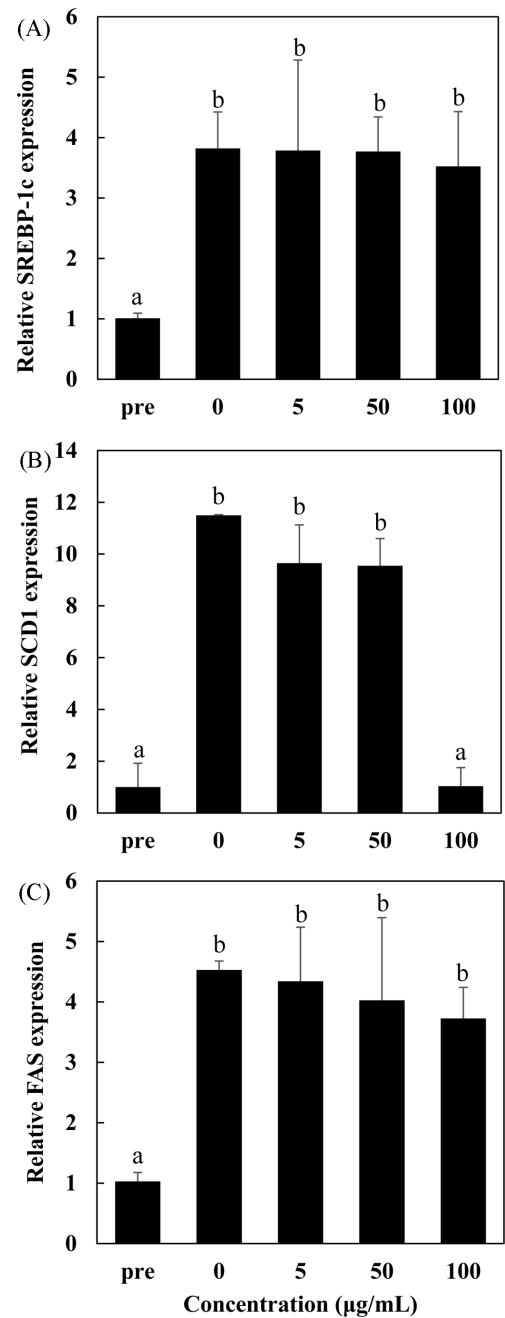


Fig. 5. Lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes treated with leaves of *Allium macrostemon* extract. The 3T3-L1 adipocytes were differentiated for 6 days with leaves of *Allium macrostemon* extract (LAE). On Day 6, quantitative RT-PCR was conducted to estimate the expression of lipogenic genes such as (A) sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), (B) stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1), and (C) fatty acid synthase (FAS). Values are expressed as the mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's HSD at $p < 0.05$. pre: preadipocyte.

달래도 항비만 효능을 가진 식물로서의 가치를 확인할 수 있었다.

산달래 잎 추출물이 lipogenesis 관련 유전자 발현에 미치는 영향

LAE가 lipogenesis 관련 유전자 발현에 영향을 주는지를 확인하기 위해 LAE를 0, 5, 50, 100 μg/mL의 농도로 분화 기간인 6

일 동안 3T3-L1 세포에 처리한 후 qRT-PCR 분석을 하였다. Pre에 비해 Day 6까지 분화를 유도한 대조군(0 µg/mL)에서 sterol regulatory-element binding protein 1 (SREBP-1), stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), fatty acid synthase (FAS)가 각각 3.82, 11.49, 4.53배 증가되어 실험에 사용된 세포에서 lipogenesis가 유도되는 것을 확인하였다(Fig. 5). LAE를 농도별로 처리한 군에서는 SREBP-1 유전자의 발현은 억제되지 않았으며, FAS 유전자의 발현은 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 반면, 농도 100 µg/mL의 LAE 처리군은 SCD1 유전자 발현이 대조군에 비해 약 88% 감소하였다.

본 연구에서는 LAE가 adipogenesis 중·후기에 일어나는 lipogenesis에 필요한 전사인자 SREBP-1과 효소 FAS 유전자 발현을 감소시키지 않지만, SCD1 유전자 발현은 억제시켰다. Yao 등 (2017)은 SCD1의 발현은 PPAR γ 와 SREBP-1에 의해 각각 독립적으로 영향을 받는다고 보고하였다. Fig. 4(B)를 보면 농도 100 µg/mL의 LAE는 PPAR γ 를 현저하게 감소시키므로 SCD1도 농도 100 µg/mL에서만 감소된 것으로 생각된다(Yao 등, 2017). 따라서 SCD1의 감소는 PPAR γ 에 의한 것으로 사료된다.

본 실험을 통해 LAE는 adipogenesis 초기에 발현되는 전사인자들과 adipogenesis 중·후기에 발현되는 lipogenic enzyme인 SCD1을 억제하여 중성지방 생성을 저해하는 항비만 효능이 있는 것으로 판단된다. 특히 adipogenesis 전사인자인 PPAR γ 의 발현을 현저히 억제시키고 지방 생합성과 관련된 효소인 SCD1의 활성을 감소시켜 중성지방 생성이 저해되는 것으로 사료된다. 따라서 향후 LAE가 PPAR γ 의 영향을 받는 adipocyte specific gene인 adiponectin, fatty acid binding protein 4 (FABP4), adipocyte fatty acid-binding protein (aP2) 등의 발현에 미치는 영향을 확인하는 추가 연구가 필요한 것으로 생각된다.

요 약

산달래 열수추출물의 생리활성을 비교하기 위하여 산달래를 전체(WAE), 비늘줄기(BAE), 잎(LAE)으로 분리하여 추출한 후 항산화 활성, 총 폴리페놀 함량, 지방전구세포 분화 억제 효과를 확인하였다. BAE에 비해 WAE와 LAE는 유의적으로 높은 라디칼소거능, 환원력과 총 폴리페놀 함량을 보였다. 지방전구세포 분화 억제능 역시 BAE에 비해 WAE와 LAE가 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 산달래 전체 중 가장 많은 부분을 차지하는 잎에 유효성분이 있을 것으로 판단되어, LAE의 항비만 효능을 알아보았다. LAE는 농도의존적으로 지방전구세포의 분화를 감소시켰으며 이는 독성에 의한 3T3-L1 세포 사멸에 의한 것이 아님을 세포생존을 측정을 통해 확인하였다. LAE의 지방전구세포 분화 억제능은 adipogenesis 관련 전사인자인 CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), C/EBP α 유전자 발현의 억제와 관련이 있는 것으로 확인하였다. 또한 lipogenesis에 필수적인 효소 stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)의 유전자 발현을 저해하였다. 이를 통해 산달래 추출물 중 LAE는 adipogenic 전사인자와 SCD1 유전자 조절을 통해 지방전구세포 분화를 억제함을 밝혔고 항비만 기능성 물질로서의 활용 가능성을 확인하였다. 따라서 산달래가 항비만 효과가 있는 식품임을 입증하고 건강기능성식품 소재로서 상품화될 가능성을 제시하고자 한다.

감사의 글

This research was funded by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, grant number NRF-2018R1D1A1B07043887.

References

- Balogun O, Pei Y, Kang HW. Garlic Scape Extract Decreases Adipogenesis and Lipogenesis by Activating AMK-Activated Protein Kinase in 3T3-L1 Adipocytes. *CDN*. 4: 1608-1608 (2020)
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem*. 239: 70-76 (1996)
- Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset CLWT. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol*. 28: 25-30 (1995)
- Chang E, Kim CY. Natural products and obesity: a focus on the regulation of mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Molecules*. 24: 1157 (2019)
- Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol*. 7: 30 (2016)
- Cignarelli A, Genchi VA, Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, Giordano F. Insulin and insulin receptors in adipose tissue development. *Int. J. Mol. Sci*. 20: 759 (2019)
- Farmer, SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 4: 263-273 (2006)
- Guo D, Bell EH, Mischel P, Chakravarti, A. Targeting SREBP-1-driven lipid metabolism to treat cancer. *Curr. Pharm. Des*. 20: 2619-2626 (2014)
- Hamissa AMB, Seffen M, Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P, Converti A. Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. *Food Bioprod. Process*. 90: 17-21 (2012)
- Han IH, Kim J-H. Antioxidant and Physiological Activities of Water and Ethanol Extracts of Diverse Parts of Welsh Onion. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 46: 426-434 (2017)
- Im JS, Lee EH, Lee JN, Kim KD, Kim HY, Kim MJ. Sulforaphane and Total Phenolics Contents and Antioxidant Activity of Radish according to Genotype and Cultivation Location with Different Altitudes. *HST*. 28: 335-342 (2010)
- Jung JE, Sin SM, Kim HM, Lee S, Choi K, Park KW, Ku JJ, Cho EJ. Screening of radical scavenging activity and gastric cancer prevention activity from Korean folk plants. *J. Cancer Prev*. 16: 65-73 (2011)
- Kim HJ, Lee M-J, Jang J-Y, Lee S-H. *Allium hookeri* Root Extract Inhibits Adipogenesis by Promoting Lipolysis in High Fat Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*. 11: 2262 (2019)
- Kim K-H, Kim H-J, Byun M-W, Yook H-S. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethanol Extract from Six Vegetables Containing Different Sulfur Compounds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 41: 577-583 (2012)
- Kim NE, Seo DY, Cheon WY, Choi YM, Lee JS, Kim YH. Bioactive Nutritional Compounds and Antioxidant Activity of Green Peppers Consumed in Korea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 49: 141-148 (2020)
- Kim Y-H, Shon M-Y, Sung N-J. Antioxidant and Antimutagenic Activities of Hot Water Extract from White and Yellow Onions after Simulated Gastric Digestion. *J. Life Sci*. 14: 925-930 (2004)
- Korean Society for the Study of Obesity (KSSO). 2019 Obesity Fact Sheet. *Obesity Fact Sheet*. 5: in press (2019)
- Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grignon C, Abdelly C. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in

- leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 244-249 (2007)
- Lee CW, Seo JY, Lee J, Choi JW, Cho S, Bae JY, Sohng JK, Kim SO, Kim J, Park YI. 3-*O*-Glucosylation of quercetin enhances inhibitory effects on the adipocyte differentiation and lipogenesis. *Biomed. Pharmacother.* 95: 589-598 (2017)
- Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ. Adipogenesis at a glance. *J. Cell. Sci.* 124: 2681-2686 (2011)
- Makino T, Kanemaru M, Okuyama S, Shimizu R, Tanaka H, Mizukami H. Anti-allergic effects of enzymatically modified isoquercitrin (α -oligoglucosyl quercetin 3-*O*-glucoside), quercetin 3-*O*-glucoside, α -oligoglucosyl rutin, and quercetin, when administered orally to mice. *J. Nat. Med.* 67: 881-886 (2013)
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rmsy C, Jimnez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79: 727-747 (2004)
- Moreno-Navarrete JM, Fernandez-Real JM. Adipocyte Differentiation. *Adipose Tissue Biology.* 69-90 (2017)
- Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Nutr.* 130: 3116S-3121S (2000)
- Muni Swamy G, Ramesh G, Devi Prasad R, Meriga B. Astragaloside, (3-*O*-glucoside of kaempferol), isolated from *Moringa oleifera* leaves modulates leptin, adiponectin secretion and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Arch. Physiol. Biochem.* 1-7 (2020)
- Nakane R, Iwashina T. Flavonol glycosides from the leaves of *Allium macrostemon*. *Nat. Prod. Commun.* 10: 1934578X1501000817 (2015)
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Ravents RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299: 152-178 (1999)
- Wang X, Hai C. Redox modulation of adipocyte differentiation: hypothesis of "Redox Chain" and novel insights into intervention of adipogenesis and obesity. *Free Radic. Biol. Med.* 89: 99-125 (2015)
- World Health Organization (WHO). Obesity. Available from: <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/6-facts-on-obesity>. Accessed Feb. 10, 2020.
- Xie W, Zhang Y, Wang N, Zhou H, Du L, Ma X, Shi X, Cai G. Novel effects of macrostemonoside A, a compound from *Allium macrostemon* Bunge, on hyperglycemia, hyperlipidemia, and visceral obesity in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. *Eur. J. Pharmacol.* 599: 159-165 (2008)
- Yao D, Luo J, He Q, Shi H, Li J, Wang H, Xu H, Chen Z, Yi Y, Loo J J. SCD1 alters longchain fatty acid (LCFA) composition and its expression is directly regulated by SREBP1 and PPAR γ 1 in dairy goat mammary cells. *J. Cell. Physiol.* 232: 635-649 (2017)
- Zhang Z, Wang F, Wang M, Ma L, Ye H, Zeng XJ. A comparative study of the neutral and acidic polysaccharides from *Allium macrostemon* Bunge. *Carbohydr. Polym.* 117: 980-987 (2015)
- Zhang Z, Wang F, Wang M, Ma L, Zeng X. Extraction optimisation and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from *Allium macrostemon* Bunge. *Int. J. Food Sci.* 47: 723-730 (2012)