

적양파 추출물의 항비만 활성

송환^{1*}, 서지훈²

¹초당대학교 뷰티디자인학과 부교수, ²지성식품 주식회사 대표

Anti-Obesity Effects of Red Onions Extract

Hwan Song^{1*}, Ji-Hun Seo²

¹Associate Professor, Division of Beauty Design, Chodang University

²CEO, Jisung Food Company Limited

요약 비만은 에너지의 섭취와 소비의 불균형으로 지방조직이 비정상적으로 분화하면서 생기는 대사질환으로 알려져있다. 본 연구에서는 본 연구는 적양파 추출물 처리에 따른 Pancreatic lipase 억제, 지방세포분화 억제 활성을 확인하고자 하였다. 적양파추출물 처리에 따른 활성은 지방세포 분화 및 관련 유전자에 대한 평가는 3T3-L1 지방전구세포를 이용하고 Real-Time PCR을 통하여 확인하였다. 실험 결과, Pancreatic lipase 활성 억제 실험에서 적양파 추출물은 농도 의존적으로 lipase 활성을 억제하였다. 지방세포분화 실험을 수행한 결과, insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine(MDI)등으로 분화 유도된 3T3-L1 세포에서 적양파 추출물은 지방전구세포의 분화를 억제하였으며 동시에 지방구 형성을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 지방전구 세포의 분화 과정과 관련된 C/EBP- α , C/EBP- β , PPAR- γ 의 발현을 억제하였다. 본 실험에서 적양파 추출물은 지방분해효소를 억제하며, 지방전구세포 분화와 관련된 유전자 발현을 억제함으로써 지방세포 분화 및 지방구형성을 억제할 수 있는 항비만 소재로의 개발 가능성이 높다고 판단된다.

주제어 : 적양파, 항비만, 지방전구세포, 지방분해효소, 지방세포분화

Abstract Obesity is known as a metabolic disease caused by abnormal differentiation of fat tissue due to an imbalance between energy intake and consumption.. The purpose of this study was to confirm the changes in the genes associated with pancreatic lipase activity and pre-adipocyte cell differentiation by treatment of red onion extract treatment. The effect of red onion extract treatment on pre-adipocyte differentiation was evaluated using 3T3-L1 adipocytes, and the activity of related genes was confirmed through Real-Time PCR. As a result of the experiment, the red onion extract inhibit pancreatic lipidase activity by concentration dependent manner. In addition, it was found to inhibit adipocyte differentiation and inhibit the activity of genes(C/EBP- α , C/EBP- β , PPAR- γ) associated with adipocyte differentiation. Through the results of this experiment, it is suggested that the red onion extract can be developed as a high potential material with anti-obesity efficacy by suppressing adipocytic differentiation by controlling genes related to adipocyte differentiation.

Key Words : Red onion extract, Anti-obesity, Pre-adipocyte, Lipase inhibition, Adipocytic differentiation

*This paper was supported by jisung food's research fund in 2021.

*Corresponding Author : Hwan Song(songhwan@cdu.ac.kr)

Received November 29, 2021

Accepted March 20, 2022

Revised March 6, 2022

Published March 28, 2022

1. 서론

현대사회에 들어 서구화된 식생활과 생활수준의 향상으로 인한 과도한 영양섭취는 과체중이나 비만환자를 점점 증가시키고 있다. 비만은 에너지 섭취와 대사의 불균형으로 지방조직이 비정상적으로 성장하면서 생기는 대사질환이다. 현재의 비만 발생은 생활방식, 환경, 유전적 요인과 관련이 있으며 제2형 당뇨병, 심혈관 질환, 그리고 비알코올성 지방간 질환과 같은 다양한 다른 대사 질환을 유발하여 심각한 사회 문제로 대두되었다[1-4]. 비만의 예방 및 치료의 근본적인 방법은 운동과 식이요법 등이 있지만, 생활습관 개선은 어려움이 있으며, 약물치료방법이 대안으로 제시되었으나 효과가 없거나 부작용이 발생하는 것으로 보고되었다[5,6].

비만은 지방전구세포의 분화와 지질합성과정에 의하여 지방세포내 증성지방이 축적되고, 분화된 세포 내에서 활성화된 Adipogenesis과정에 의해 지방구가 과도하게 축적되어 발생한다. 따라서, 지방전구 세포의 분화를 억제하거나 지방생성 과정을 조절하는 것이 비만의 효과적인 치료방법으로 알려져있다[7].

적양파는 백합과의 다년생 식물로 무기질, 비타민 C를 비롯하여 다양한 Flavonoid를 함유하고 있다.

특히, 적양파는 일반 양파, 황색양파보다 Quercitrin, Quercetin, Rutin 등 페놀성분 등이 많이 함유되어 있어 항산화 뿐만 아니라 항균, 심혈관계 질환 예방, 중금속 해독, 항암 등의 효능이 있는 것으로 보고되었다[8-10].

또한, 적양파는 콜라스테롤 감소를 통한 고혈압 예방 및 혈당 조절 효과도 보고되었다[11].

하지만, 적양파 추출물의 항비만 효능에 대한 분자생물학적 기전에 관련된 보고는 확인할 수 없었다.

이에 본 연구는 부작용이 적은 천연물인 적양파를 이용한 *in vitro* 실험을 통해 항비만 효능에 관련된 기능성 소재로서의 개발·사용 가능성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 적양파 추출물의 제조

적양파 열수추출물(Red Onion Extract)은 20배 부피의 증류수를 첨가한 후 95℃, 2시간 추출한 다음, 여과하여 Rotatory vacuum evaporator(EYELA, Japan)를 이용하여 농축한 다음, 농축액을 Freeze Dryer(EYELA, Japan)를 이용하여 동결건조 후 사용하였다.

2.2 세포주 및 세포배양

3T3-L1 pre-adipocyte cell (지방전구세포)은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였으며, 10% fetal bovine serum 과 1% antibiotics-antimycotic을 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)(Gibco Inc., USA) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건의 CO₂ 세포배양기(Panasonic, Japan)에서 계대배양하여 실험에 사용하였다.

2.3 세포독성확인 실험

항비만 활성 시험 전 시료가 세포 생존에 미치는 영향을 확인하고, 시료 처리농도를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다[12]. 1×10^5 cell을 48-well tissue culture plate 에 분주, 이후 24시간 동안 부착시킨 후 시료를 농도별 처리 하고 다시 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT(Sigma, USA) 5 mg/mL 용액을 PBS로 희석하여 각 Well에 120 μ L 처리한 다음, 4시간 동안 CO₂ Incubator에서 배양하고, 상등액을 제거한 다음, Dimethyl sulfoxide(Sigma, USA)를 각 well에 100 μ L씩 첨가하여 Formazan 결정을 용해하였다. 이후, Microplate reader(Molecular Devices, Canada)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 아무것도 처리하지 않은 무처리군(Blank)를 100%로 설정하여 흡광도값을 비교하여 분석하였다.

2.4 Pancreatic lipase 활성 저해능 측정

1.5 ml EP-tube에 0.25 M Tris (pH 7.7), 250 mM CaCl₂, 5 mM 4-nitrophenyl dodecanoate (PNPD)를 넣어준 다음 37℃에서 5분간 반응시킨 다음, 각 농도별 적양파 추출물과 0.25 M Tris-buffer에 용해한 Lipase를 혼합하여 37℃에서 10분간 반응 후 20% Sodium dodecyl sulfate (SDS)를 첨가하여 반응을 종료하였다. 반응액은 15,000 rpm, 4℃, 20분간 원심분리한 다음, 상층액을 취하여 96-well plate에 분주하고 Microplate reader를 이용하여 412nm에서 10분간 반응시킨 시료의 흡광도에서 초기 반응 시료의 흡광도 값을 뺀 값을 control을 100%로 설정한 다음 시료의 결과값과 비교하여 백분율로 나타내었다.

2.5 Adipogenesis 유도

세포분화유도에 사용되는 MDI solution (0.5 mM IBMX, 1 μ M dexamethasone, 1 μ g/ml insulin)은 Sigma (USA) 에서 구입하여 사용하였다. 지방세포분화 유도는 3T3-L1 지방전구세포 2×10^5 cells/ml을 6 well-plate에 분주하여 약 95%의 Cell density가 될 때까지 배양한 다음 배지를 교환하고 48시간 추가로 배양하였다. 이후, MDI가 포함된 분화유도배지로 교체하고 적양파 추출물을 농도별로 처리한 다음 2일 간격으로 총 8일간 Insulin과 시료를 처리하여 실험하였다. 시료를 처리하지 않고 분화 유도한 것을 음성대조군으로 하였다.

2.6 Oil Red O Assay

세포배양배지를 제거한 다음 PBS (WelGENE Inc., Korea)를 이용하여 각 2회 세척을 거친 후 4% Formaldehyde (Sigma, USA) 를 처리하여 20분 간 상온에서 반응하였다. 이 후 ddH₂O와 60% isopropanol로 1분씩 각각 2회 세척하고 Oil Red O solution (Sigma, USA)을 10분간 처리하여 염색한 다음 현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 지방세포 분화를 확인하였다. 지방구 형성의 정량분석을 위하여 Isopropanol을 처리하여 Oil Red O 시약을 회수한 다음 96well-plate에 분주하고 Microplate reader를 사용, 520nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. MDI 처리군의 흡광도를 100으로 설정하고 시료 처리군의 흡광도값을 환산하여 백분율로 나타내었다.

2.7 Real-time PCR

3T3-L1 세포주를 6-well plate에 5×10^5 cells/well 세포 수로 분주, 24시간 부착시킨 후 Adipogenesis 유도와 동일한 방법으로 시료를 처리하였다. 처리 후, 세포를 수득한 다음, NucleoSpin RNA(MN, Germany) Kit의 Protocol에 따라 RNA를 분리한 다음, ReverTra Ace RT-Kit(Toyobo, Japan)을 이용하여 cDNA 합성하여 Real-time PCR의 template로 사용하였다. 유전자 발현량은 Housekeeping gene인 GAPDH를 이용하여 표준화한 다음 MDI 처리군의 유전자 발현량을 1로 설정하고 비교하여 분석하였다.

실험에 사용한 Primer는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. C/EBP- α , C/EBP- β , PPAR- γ , GAPDH primer

Primer	Sequence
C/EBP α	Forward 5'-TGTGCACGTCTATGCTAAACC-3'
	Reverse 5'-CCGTTAGTGAAGAGTCTCAGT-3'
C/EBP β	Forward 5'-GTTTCGGGAGTGTGCAAT-3'
	Reverse 5'-AACAAACCCCGCAGGAACAT-3'
PPAR γ	Forward 5'-CGCTGATGCACTGCCTATGA-3'
	Reverse 5'-TGCGAGTGGTCTCCATCAC-3'
GAPDH	Forward 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'
	Reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

2.8 통계적 분석

본 연구에 표기된 모든 실험과정은 3회 반복으로 수행하였다. 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 실험 결과 사이의 유의성은 일원배치 분산분석 (One-way ANOVA)으로 분석하였으며 *p*-value 값을 계산하여 통계적 유의성을 검증하였다. *p*<0.01인 경우 **로 유의성을 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 세포독성 확인 실험

MTT 방법을 이용하여 적양파추출물의 세포독성을 측정하였다. 그 결과, Fig. 1에서 나타낸바와 같이 최고 농도인 500ug/ml 농도에서 약 98.12%의 세포생존율을 나타내었으며, 62.5ug/ml에서는 약 99.32%의 세포 생존율을 나타내었다. 적양파 추출물은 500ug/ml까지 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인하여 62.5ug/ml ~ 500ug/ml의 농도로 실험을 진행하였다.

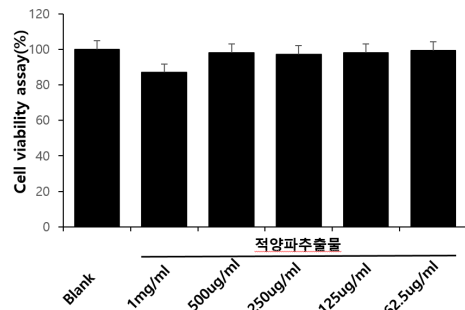


Fig. 1. Cell viability assay in 3T3-L1

3.2 Pancreatic lipase 활성 억제

췌장에서 분비되는 Pancreatic lipase는 중성지방

(Triglyceride, TG)를 글리세롤과 지방산으로 가수분해하여 분해된 지방산을 세포 내로 쉽게 유입시키는 역할을 수행한다. 유입된 지방산은 에너지 대사를 통해 소비되지 못하면 중성지방으로 전환되어 축적된다. 지방산화효소인 Pancreatic lipase의 활성을 저해하는 것은 지방산 유입을 차단하여 중성지방 축적을 저해함으로써 비만예방효과를 기대할 수 있음을 나타낸다[13].

Fig 2에서와 같이 적양파 추출물은 100ug/ml 농도에서 약 25%, 500ug/ml 농도에서는 약 55% Lipase 활성을 억제하였으며, 농도 의존적으로 Lipase 활성을 억제하는 것이 확인되었다.

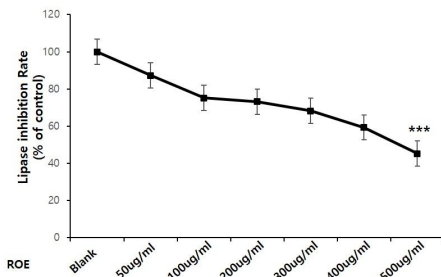


Fig. 2. Pancreatic lipase inhibition Rate by (ROE)Red Onion Extract

3.3 지방세포형성(Oil Red O Assay)

적양파 추출물의 지방전구세포 3T3-L1세포의 분화 억제 및 지방구형성 억제에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Oil Red O staining 실험을 실시하였다.

실험결과, 적양파추출물은 3T3-L1 세포의 분화를 억제하였으며, Oil Red O에 염색된 지방구의 숫자가 현저하게 감소되는 것을 확인하였다.

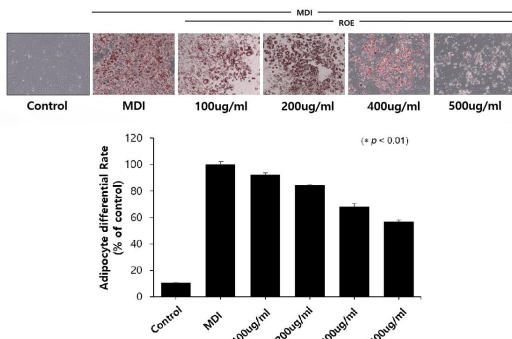


Fig. 3. Inhibition of adipocyte differentiation in MDI-stimulated 3T3-L1 cells.

Fig. 3에서 보는바와 같이 적양파 추출물 200ug/ml 처리에서 지질 축적량이 MDI 처리군 대비 약 16% 감소하였으며, 500ug/ml 처리에서는 약 43% 감소하는 것이 확인되었다.

3.4 Adipogenesis 관련 Real-Time PCR 유전자 발현 확인

3T3-L1 지방전구세포는 C/EBP- β 와 C/EBP- δ 가 Insulin, Dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)등에 의해 자극을 받으면, 지방전구세포에서 지방세포로 초기 분화가 시작되며[14], 이때 C/EBP- β 와 C/EBP- δ 는 단독 혹은 동시 작용으로 Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)와 C/EBP- α 의 발현을 유도한다[15]. C/EBP- α 와 PPAR γ 는 분화 초기에 발현이 시작되며 분화 후기가 되면 다양한 지방세포 특이 유전자들의 발현을 유도하여, 지방세포 분화 후기에 발현 양이 증가한다고 알려져 있다[16]. C/EBP- α , PPAR- γ 유전자의 발현량 변화는 지방세포 분화 과정 전체의 직접적인 요인이므로 지방세포분화 조절을 확인하기 위한 중요한 지표로 활용되고 있다[17,18].

실험결과, Fig. 4에서 확인할 수 적양파 추출물은 500ug/ml 처리에서 C/EBP- α , β 및 PPAR- γ 의 발현을 억제하는 것으로 확인되었다.(Fig. 4-6)

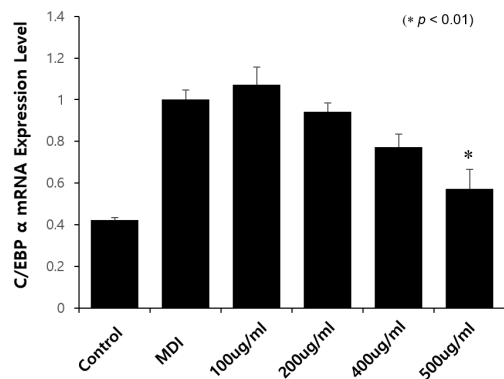


Fig. 4. Adipogenesis related C/EBP- α expression level in 3T3-L1 cells.

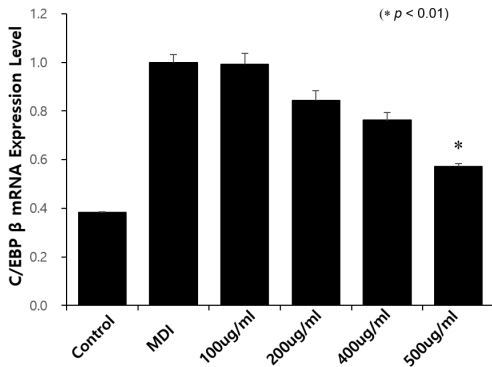


Fig. 5. Adipogenesis related C/EBP- β expression level in 3T3-L1 cells.

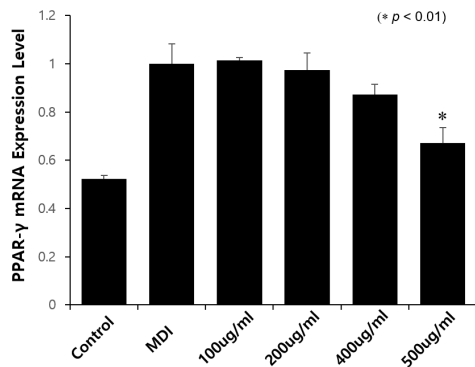


Fig. 6. Adipogenesis related PPAR- γ expression level in 3T3-L1 cells.

4. 결론

본 연구는 천연추출물인 적양파 추출물을 이용하여 천연 항비만 소재를 개발하고자 진행하였다.

Pancreatic lipase 활성 억제실험에서 적양파 추출물은 100ug/ml 농도에서 Lipase 활성을 약 25% 감소시켰으며 최대 500ug/ml 농도에서는 약 55% 활성을 억제하는 것으로 나타났다.

또한 지방전구세포인 3T3-L1 세포의 분화 및 지방구형성 억제실험에서도 500ug/ml 처리에서 약 43% 지방구형성을 억제하였으며 100~500ug/ml 범위에서 농도의존적으로 지방구형성을 억제하는 것을 확인하였다.

뿐만 아니라, 적양파 추출물이 지방세포분화의 초기, 중기, 후기의 각 단계별 주요 인자인 C/EBP- α , β , PPAR- γ 의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 3가지 주요인자 모두 적양파 추출물의 처리에 의하여 농도의

존적으로 발현량이 감소하는 것을 확인하였다.

모든 실험결과를 종합하였을 때, 적양파 추출물은 Pancreatic Lipase 활성을 억제함으로써 지방산의 유입을 차단하고 중성지방의 과도한 축적을 막아줄 수 있으며, C/EBP- α , β , PPAR- γ 의 발현을 억제하는 방법으로 지방전구세포의 분화 및 지방구의 형성을 억제하여 결과적으로 비만예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 적양파 추출물은 복합적으로 항비만 효능이 있는 신규 기능성 식품 소재와 새로운 화장품 소재 등으로의 활용 전망 가능성이 있다고 판단된다. 또한, 적양파 추출물의 항비만 활성을 나타내는 단일 활성 물질에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

REFERENCES

- [1] Y. Song, M. B. Kim, C. Kim, J. Kim & J. K. Hwang. (2016) 5,7-Dimethoxyflavone Attenuates Obesity by Inhibiting Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and High-Fat Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice. *Journal of Medicinal Food*, 19(12), 1111-1119. DOI : 10.1089/jmf.2016.3800
- [2] K. S. Park. (2015). Raspberry ketone, a naturally occurring phenolic compound, inhibits adipogenic and lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes, *Pharmaceutical Biology*, 53(6), 870-875, DOI : 10.3109/13880209.2014.946059
- [3] G. H. Nam et al. (2019), Study of Anti-Obesity Effect of Rumex Japonicus Houttuyn Ethanol Extracts in 3T3-L1 Preadipocytes cells, *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 34(3), 154-158. DOI : 10.7841/ksbbj.2019.34.3.154
- [4] M. Park, C. Lee & H. J. Lee. (2019) Effects of Lonicera caerulea extract on adipocyte differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 cells and mouse adipose-derived stem cells (MADSCs), *Journal of Nutrition and Health*, 52(1), 17-25. DOI : 10.4163/jnh.2019.52.1.17
- [5] J. G. Kang & C. Y. Park. (2012). Anti-obesity drugs: A review about their effects and safety. *Diabetes Metab J*, 36, 13-25. DOI : 10.4093/dmj.2012.36.1.13
- [6] K. S. Kim & S. W Park. (2012). Drug Therapy for obesity. *Korean J Obes*, 21, 197-202. DOI : 10.7570/kjo.2012.21.4.197

- [7] M. S. Kim, D. C. Kweon, & Y. J. Bae. (2014). Evaluation of nutrient and food intake status, and dietary quality according to abdominal obesity based on waist circumference in Korean adults: Based on 2010-2012 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Nutr Health*, 47(6), 403-415.
DOI : 10.4163/jnh.2014.47.6.403
- [8] J. A. Kang & J. S. Kang. (1997). Effect of Garlic and Onion on Plasma and Liver Cholesterol and Triacylglycerol and Platelet Aggregation in Rats fed Basal or Cholesterol Supplemented Diets. *The Korean Nutrition Society*, 30(2), 132-138.
- [9] S. Gorinstein et al. (2009). A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables. *Eur Food Res Technol* 228, 903-911.
DOI : 10.1007/s00217-008-1003-y
- [10] C. Yang, L. Li, L. Yang, H. Lü, S. Wang & G. Sun. (2018). Anti-obesity and Hypolipidemic effects of garlic oil and onion oil in rats fed a high-fat diet. *Nutr Metab (Lond)*, 15(1), 43.
DOI : 10.1186/s12986-018-0275-x
- [11] P. S. Babu & K. Srinivasan. (1997). Influence of dietary capsaicin and onion on the metabolic abnormalities associated with streptozotocin induced diabetes mellitus. *Mol Cell Biochem*, 175(1), 49-57.
DOI : 110.1023/a:1006881027166
- [12] S. J. Steer, R. H. Clothier & M. Balls. (1992). An improved MIT assay. *J Immunol Methods*, 157(1-2), 203-207.
DOI : 10.1016/0022-1759(93)90088-O
- [13] J. S. Flier & F. E. Maratos. (1998). Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell*, 92(4), 437-440.
DOI : 10.1016/s0092-8674(00)80937-x
- [14] E. D. Rosen, P. Sarraf, A. E. Troy, G. Bradwin K. Moore, D. S. Milstone, B. M. Spiegelman & R. M. Mortensen. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*, 4(4), 611-617.
DOI : 10.1016/s1097-2765(00)80211-7
- [15] M. H. Jang, W. L. Piao, J. M. Kim, S. W. Kwon & J. H. Park. (2008). Inhibition of cholinesterase and amyloid-beta aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. *Phytotherapy Research*, 22(4), 544-549.
DOI : 10.1002/ptr.2406
- [16] L. Fajas et al. (1999). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: Implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol*, 19(8), 5495-5503.
DOI : 10.1128/MCB.19.8.5495
- [17] H. J. Kim, C. H. Kang & S. K. Kim. (2012). Anti-adipogenic effect of *Undaria pinnatifida* extracts by ethanol in 3T3-L1 adipocytes. *J. Life Sci*, 22, 1052-1056.
DOI : 10.5352/JLS.2012.22.8.1052
- [18] J. A. Park, C. Park, M. H. Han, B. W. Kim, Y. H. Chung & Y. H. Choi. (2011). Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by aged black garlic extracts in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Life Sci.*, 21(5), 720-728.
DOI : 10.5352/JLS.2011.21.5.720

송 환(Hwan Song)

[정회원]



- 2000년 8월 : 송실대학교 환경·화학공학과(공학사)
- 2002년 8월 : 송실대학교 환경·화학공학과(공학석사)
- 2004년 3월 : 송실대학교 화학공학과(공학박사)

- 2005년 3월 ~ 현재 : 초당대학교 뷰티디자인학과 교수
- 관심분야 : 초임계추출, 나노에멀전
- E-Mail : songhwan@cdu.ac.kr

서 지 훈(ji-hun seo)

[정회원]



- 2007년 9월 : 지성농원개원
- 2015년 1월 : 농업회사법인 (주) 지성식품 설립
- 2020년 12월 : 여성가족재단 실무 협의위원 위촉
- 2021년 11월 : 워라벨 문화데이,마 일리지프로금 우수기업대상

- 관심분야 : 식품
- E-Mail : jisungfood@naver.com