

## Anti-obesity effect of *Polygala tenuifolia*

Ju-Young Hwang, Yong-Xiang Wu, Dae-Il Hwang, Suk-Jae Bae, Taewan Kim\*  
Department of Food Science and Biotechnology, Andong National University, Andong 760-749, Korea

### 원지(*Polygala tenuifolia*)의 항비만 효과

황주영 · 우용시앙 · 황대일 · 배석재 · 김태완\*  
안동대학교 식품생명공학과

#### Abstract

This study was performed in order to investigate the anti-obesity effect of *Polygala tenuifolia* on lipid mechanism in 3T3-L1 adipocytes. The chemical composition of the *P. tenuifolia* was analyzed in order to assess its nutritional value. Total dietary fiber was the highest among the proximate component of the *P. tenuifolia*. These results showed that the *P. tenuifolia* may be used as a potential functional ingredient for anti-obesity effect. Intracellular lipid droplets in the adipocyte were stained with oil-red O dye and quantified. In comparison to the control, lipid accumulation was significantly decreased by 40.1% and 22.4% when treated with the water extract and 70% EtOH extract of the *P. tenuifolia* at the concentration of 10 µg/mL, respectively. The anti-adipogenic effect of the water extract was stronger than that of the 70% EtOH extract. The gene expression levels were measured via Western blot and real-time PCR. As a result, the water extract was found to have decrease the gene expression of SREBP-1c, PPAR, C/EBP α, FAS, ACC in a dose-dependent manner. These indicate that the water extract inhibits pre-adipocyte differentiation and adipogenesis by blocking the SREBP-1c gene expression in 3T3-L1 cells. Therefore, *P. tenuifolia* can be used as an effective anti-obesity agent.

Key words : *Polygala tenuifolia*, 3T3-L1 adipocyte, oil red-O staining, SREBP-1c, PPAR γ, C/EBP α

#### 서 론

비만(obesity)은 섭취되는 열량이 소모되는 열량보다 많아 체내에 지방이 과도하게 축적되어 있는 상태를 말하며 그 원인으로 식생활환경 변화, 신체 활동량 감소, 유전적 요인으로 발생하는 대사성 질환이다. 비만은 단순한 외형상의 문제만으로 야기되는 것이 아니라 제 2형 당뇨병, 고혈압, 동맥경화, 관절염, 고지혈증 등 각종 성인병의 발병 원인으로 알려지면서 심각한 질환으로 대두되고 있다(1-4). 비만은 지방전구세포의 분화 및 지질합성(adipogenesis) 과정에서 과잉의 에너지 공급으로 인한 지방세포 내 중성지방(triglyceride)의 과도한 축적으로 발생되며, 이러한 비만 관련 작용기전을 규명하기 위한 연구에는 일반적으로 생쥐의 배아에서 유래된 지방 전구세포(3T3-L1)를 주로 사용하고 있다. 지방전구세포의 분화는 insulin, dexamethasone,

3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx) 등의 유도인자를 필요로 하며(5-6), 이때 발현되는 peroxisome proliferator activated receptor γ(PPAR-γ)와 CCAAT-enhancer-binding protein α(CEBP/α)는 지방전구세포에서 지방세포로 분화하는데 가장 핵심적인 기능을 담당한다고 알려져 있다(7). PPAR-γ와 CEBP/α는 지방조직에서 발현하는 sterol regulatory element-binding proteins-1c(SREBP-1c) 전사 인자에 의해 조절되며, 섭취된 잉여 에너지원으로부터 중성지방의 합성을 촉진하여 지방과 간 조직에 저장된다(8-10). 뿐만 아니라 SREBP-1c는 fatty acid synthase(FAS), acetyl-CoA carboxylase(ACC) 등의 발현을 조절하여 지방산과 중성지방의 합성을 담당한다(11). 지방생성 및 비만과 관련된 대사성 질환의 효과적인 예방을 위해서는 지방세포에서 분비되는 아디포카인(adipokine)의 조절과 지방세포내의 신호전달경로를 억제시킴으로써 중성지방의 합성을 저해시켜 항비만 효과를 나타낼 수 있다.

최근에는 비만 및 비만 관련 질병들의 예방 및 치료를 위하여 비만 관련 전사인자들의 발현을 억제시키는 다양한

\*Corresponding author. E-mail : tk37@andong.ac.kr  
Phone : 82-54-820-6157, Fax : 82-54-820-6264

비만 치료제가 개발되어 시판되고 있지만, 이들 제품들은 지방변과 같은 소화기계 증상을 나타내는 부작용들이 보고되면서 심각한 문제로 대두되고 있다(12). 이러한 문제로 인하여 우수한 효과와 안전성이 확보된 천연물 소재 개발에 대한 관심이 높아지고 있으며, 천연물 소재를 활용한 기능성 소재 및 제품 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(13-15).

원지(*Polygala tenuifolia* Willd.)는 원지과의 다년생 초본 식물로써 뿌리를 채취하여 목심 부위를 제거하고 건조한 것으로 중국의 동북, 화북, 산서, 협서, 내몽고 등의 지역과 우리나라 북부 및 중부지방에 많이 자생하고 있다(16). 원지의 주요 성분으로는 saponin류와 xanthone-O-glycosides, xanthenes 등이 보고되었으며(17-21), 주요 효능으로는 항염증 효과(22)와 콜레스테롤 저감 효과(23), 인지 기능 개선(24), 퇴행성 뇌질환 예방 효과(25), 신경세포 손상 억제 효과(26) 등이 보고되어 있다. 하지만, 원지의 항비만 효능과 작용기전, 효능 관련 지표물질에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 원지 추출물을 이용하여 전지방세포의 분화 억제능과 세포 내 중성지방의 생성 및 축적, 이와 관련된 유전자 및 단백질의 발현 양상을 분석하여 원지의 항비만 효능 및 작용기전을 규명하기 위한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

본 실험에 시료로 사용된 원지(*Polygala tenuifolia* Willd.)는 (주)옴니허브(Yeongcheon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였고, 세포 배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal calf serum(FCS), fetal bovine serum(FBS) penicillin/streptomycin, trypsin-EDTA는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. DPPH(1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), DMSO(dimethyl sulfoxide), Folin-ciocalteau reagent, bovine serum albumin(BSA), tannic acid, insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-methyl xanthine(IBMx), oil red-O reagent, MTT(3-[4,5-methylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), potassium persulfate, trizol reagent는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, ABTS{2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)} 시약은 Wako Chemical(Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였으며, western blot에 이용한 1차, 2차 항체는 Santa Cruz biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 원지 추출물의 제조 및 추출수율

원지의 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물은 원지 100

g씩을 파쇄하여 준비하고, 열수 추출물의 경우 1 L의 증류수를 넣어 100°C에서 4시간 동안 환류 냉각법으로 추출하였고, 70% 에탄올 추출물의 경우 1 L의 70% 에탄올을 넣어 실온에서 12시간 동안 3회 반복하여 추출하였다. 각각의 추출물은 원심분리 및 여과한 후 감압 농축하여 동결 건조한 후 실험에 사용하였다.

### 일반성분 분석

원지의 일반성분분석은 AOAC법(27)에 준하여 분석하였다. 수분은 105°C 상압건조법, 회분은 회화법, 지질은 Soxhlet 추출법, 단백질은 Kjeldahl 법, 식이섬유는 total dietary fiber kit(Megazyme, Co., Wicklow, Ireland)를 이용하여 측정하였으며, 탄수화물 함량은 100 g 중에서 조수분, 조단백질, 조지방, 조회분, 식이섬유 함량을 감한 값으로 하였다.

### 원지 추출물의 단백질 및 아미노산 함량

단백질 함량을 구하기 위하여 Lowry 등의 방법(28)에 따라 원지 추출물 100 µL에 Lowry 시약을 이용하여 발색시킨 후, 분광광도계를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 BSA를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 시료 중의 단백질 함량을 추정하였다. 유리 아미노산 함량은 원지 추출물 100 µL와 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액을 1 mL을 시험관에 넣고, Folin-Ciocalteau reagent를 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후 흡광도 750 nm에서 측정하였다.

### 원지 추출물의 총당 및 환원당 함량

총당 함량은 페놀 황산법(29)을 이용하여 측정하였다. 시약은 5%(v/v) phenol(Shinyo pure chemicals Co., Ltd.)을 사용하였다. 실험 방법은 시험관에 원지 추출물 500 µL, 5% phenol 500 µL, sulfuric acid 2.5 mL를 넣고 끓는 물에 10분간 반응 후 냉각 처리하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총당 함량의 검량곡선은 sucrose를 이용하여 작성하였다. 환원당 함량은 DNS법(30)을 응용하여 측정하였다. 시약은 dinitrosalicylic acid(DNS) 시약과 40% potassium sodium tartrate solution을 사용하였으며 DNS 시약은 증류수 1 L에 dinitrosalicylic acid 10 g과 phenol 2 g, sodium sulfite 0.5 g을 넣어 제조하였다. 환원당 함량은 추출물 1 mL에 DNS 시약 3 mL를 넣은 후 끓는 물에 5분간 반응을 시키고 바로 꺼내서 냉각시킨 후 흡광도 575 nm에서 측정하였다.

### 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(31)에 준하여 정량하였다. 시료 100 µL에 Folin-Ciocalteau phenol reagent 100 µL를 가하고, 0.75 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 µL를 가하여 혼합한 후 1시간 실온에서 방치하고 750 nm에서 흡광도를 측정한다.

후 표준물질인 tannic acid로 미리 작성한 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

#### DPPH 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성은 Blois의 방법(32)을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액 2 mL에 0.2 mM의 DPPH 시약 1 mL을 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도 값(RC<sub>50</sub>)으로 나타내었다.

#### ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거활성을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation decolorization assay 방법(33)에 의하여 시행하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS를 형성시킨 후 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 100 µL에 시료 50 µL를 가하여 5분 동안 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도 값(RC<sub>50</sub>)으로 나타내었다.

#### 3T3-L1 세포 배양 및 지방분화 유도

3T3-L1 세포배양은 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM 배지에 2×10<sup>5</sup> cells/mL 농도로 부유시켜 48시간 동안 배양하여 confluent 상태가 되도록 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 지방세포분화는 분화유도배지(10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 5 µg/mL insulin, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine)를 2일간 교체하여 배양하였다. 2일간 분화 유도 후 1 µg/mL의 insulin이 함유된 10% FBS-DMEM으로 2일간 배양하였다. 그 후 2일마다 4회 10% FBS-DMEM으로 교체하였다. 시료의 처리는 분화유도 배지 첨가 시점부터 같이 처리하였다.

#### 세포독성 측정

지방세포에 대한 원지 추출물의 세포독성은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 3T3-L1 세포를 96 well culture plate에 100 µL의 배지와 함께 24시간 배양한 다음, 원지 열수와 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양하였다. 각 well에 10 µL의 MTT 용액(5 mg/mL)를 첨가한 후 3시간 동안 배양하면서 환원 반응을 유도하였으며, 100 µL의 DMSO를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해하였다. 발색 정도는 분광광도계를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Oil red-O 염색

지방전구세포 분화 시에 형성된 지방의 함량은 oil red-O 염색법에 의해 측정하였다. 8일 동안 분화 후에 배지를 제거한 뒤 분화된 세포표면을 PBS로 2회 세척한 다음 10% formalin/PBS로 30분간 고정하고 PBS로 세척하였다. 각 well에 oil red-O 용액 1 mL을 첨가하고 실온에서 1시간 염색한 다음, 염색된 세포는 100% isopropyl alcohol에 용해한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Real-time PCR을 통한 유전자 발현양상분석

원지 열수 추출물을 첨가하여 분화시킨 세포에서 배지를 제거하고 PBS로 두번 세척한 후 trizol reagent를 처리하여 Total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA에 각각의 primer (Genotech, Daejeon, Korea)와 One step SYBR PrimeScript™ RT-PCR kit(Takara, Ohtsu, Japan)를 넣고 Real-time PCR Detection System(ECO™, Illumina, CA, USA)을 이용하여 증폭하였다. 유전자 발현 분석에 사용된 primer의 서열은 Table 1과 같이 나타내었으며, PCR 조건은 초기변성 95°C 30초, 변성은 95°C 5초, annealing은 57°C 15초, 신장반응은 72°C 10초로 하여 40 cycle을 진행했다. 용해 곡선은 55°C에서 시작하여 95°C를 종말점으로 0.5°C씩 상승시키며 80번을 반응하여 원하는 형광 값을 검출하였다. mRNA의 상대적 발현량은 control에 대한 sample의 상대적 유전자 발현 값으로 나타내었다.

#### Western blot을 통한 단백질 발현량 측정

3T3-L1 cell에서 발현되는 SREBP-1c, PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$ , FAS, ACC의 단백질 발현에 대한 원지 열수 추출물의 효과를 조사하기 위해 western blot을 수행하였다. 지방분화가 끝난 세포는 PBS로 세척한 후 RIPA buffer를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 10% SDS-polyacrylamide

Table 1. The primer sequence used for real-time PCR

Target		Primer sequences
PPAR $\gamma$	Forward	5'-TCGCTGATGCACTGCCTATG-3'
	Reverse	5'-GAGAGGTCCACAGAGCTGATT-3'
C/EBP $\alpha$	Forward	5'-CCTTCAACGACGAGTTCCTG-3'
	Reverse	5'-TGGCCITCTCTGCTGTC-3'
SREBP-1c	Forward	5'-GGA GAC ATC GCA AAC AAG CTG A-3'
	Reverse	5'-CAG ACT GCA GGC CAG ATC CA-3'
ACC	Forward	5'-GAG TGA CTG CCG AAA CAT CTC TG-3'
	Reverse	5'-GCC TCT TCC TGA CAA ACG AGT-3'
FAS	Forward	5'-ATCCTGGAACGAGAACACGATCT-3'
	Reverse	5'-AGAGACGTGTCACTCCTGGACCT-3'
$\beta$ -actin	Forward	5'-GTG AAA ACT TCG ATG ATT ACA TGA A-3'
	Reverse	5'-GCC TGC CAC TTT CCT TGT G-3'

gel에 전기영동 시킨 후 polyvinylidene fluoride(PVDF) transfer membrane으로 400 mA로 1시간 40분 동안 transfer 시켰다. Transfer가 끝난 membrane은 5% skim milk로 1시간 동안 blocking한 후 1:200의 비율로 1차 항체인 SREBP-1c, PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$ , FAS, ACC를 첨가하여 저온에서 overnight 동안 반응시키고, TBST로 5분 간격으로 3회 세척하였다. 1:1000의 비율로 희석한 2차 항체를 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후, TBST로 10분 간격으로 3회 세척한 다음 ECL 용액을 이용하여 X-ray film에 감광시켰다. Film 상의 밴드는 Quantity One® 1-D Analysis Software(Biorad, CA, USA)를 이용하여 정량화 하였다.

**통계처리**

데이터의 통계분석은 SPSS version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 이용하여 평균±표준편차로 나타내었고, 실험군 간의 평균값의 통계적 유의성은 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정을 실시 하였다.

**결과 및 고찰**

**일반성분 분석**

원지의 일반성분 함량을 분석한 결과 탄수화물 21.72%, 조단백질 18.5%, 조지방 14.48%, 조회분 2.42%, 식이섬유 42.87%가 함유되어 있었다(Table 2). 원지의 성분 중에서는 식이 섬유 함유량이 가장 높았으며, 원지에 포함된 식이 섬유 39.45%(습부량 기준)중 불용성 식이섬유 38.18%, 가용성 식이섬유 1.77%로 불용성 식이섬유를 많이 함유하고 있었는데, 불용성 식이섬유의 경우 심혈관 질환, 위장질환, 대장암, 혈당반응의 위험을 낮추는 효과와 콜레스테롤 저감 효과가 보고 되어있다(35-37). 이러한 결과를 통해 원지는 식이섬유 공급원으로서 충분한 기능적 가치를 가지고

**Table 2. Proximate compositions of *P. tenuifolia***

Components	Contents (%)	
	Wet basis	Dry basis
Moisture	7.98±0.05	-
Crude protein	17.02±0.36	18.50±0.39
Crude lipid	13.32±0.08	14.48±0.08
Total fiber	39.45±0.27	42.87±0.21
Dietary fiber		
Soluble fiber	1.77±0.09	-
Insoluble fiber	38.18±0.28	-
Carbohydrate <sup>1)</sup>	19.99±0.40	21.72±0.43
Crude ash	2.23±0.03	2.42±0.03

Values are means±SD (n=3)

<sup>1)</sup>Carbohydrate=100-moisture-crude protein-crude ash-crude fat-dietary fiber

있음을 확인할 수 있었다.

**원지의 추출수율 및 가용성 영양성분의 분석**

산업적 측면을 볼 때 천연물의 추출 수율은 부가 가치적 측면에서 매우 중요한 요소로 작용한다(38). 원지 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 추출 수율은 각각 26.2%, 32.0%로 열수 추출물 보다 에탄올 추출물에서 추출 수율이 더 높은 것으로 나타났다(Table 3). 식품 중에 존재하는 당류는 화학적으로 환원성을 갖는 환원당과 환원성을 갖지 않는 비환원당으로 나눌 수 있으며 이를 합쳐서 총당이라고 한다. 원지의 총당의 함량은 열수 추출물에서 353.0 mg/g, 에탄올 추출물은 281.9 mg/g, 환원당은 열수 추출물, 에탄올 추출물이 각각 114.2 mg/g, 46.7 mg/g으로 나타났다. 단백질 함량은 열수 추출물이 275.0 mg/g, 에탄올 추출물이 220.0 mg/g, 유리 아미노산은 열수 추출물이 29.8 mg/g, 에탄올 추출물이 28.9 mg/g으로 측정되었다. 이와 같이 원지에 포함된 가용성 단백질과 유리아미노산은 아미노산 급원으로서 영양학적으로 충분한 가치가 있을 것으로 추정된다.

**Table 3. Contents of protein, free amino acid, total sugar and reducing sugar in water extract and 70% EtOH extract from *P. tenuifolia***

	Water extract	70% EtOH extract
Extract yield (%)	26.2	32.0
Protein content (mg/g)	275.17±3.06	220.12±5.65
Free amino acid (mg/g)	29.77±1.57	28.88±1.61
Total sugar contents (mg/g)	353.00±5.14	281.89±1.79
Reducing sugar content (mg/g)	114.18±0.17	46.69±0.14

Values are means±SD (n=3)

**총 폴리페놀 함량 및 항산화능 측정**

식물체에 함유되어 있는 페놀성 화합물들은 항산화, 항암, 고혈압 억제 등의 다양한 생리활성을 가진다(39). 원지 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 총 폴리페놀, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다(Table 4). 원지의 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 기준물질로 하여 측정하였으며 그 결과 원지 열수 추출물 26.6 mg/g, 70% 에탄올 추출물 17.8 mg/g으로, 열수 추출물이 70% 에탄올 추출물보다 총 폴리페놀의 함량이 높은 것으로 확인하였다. 원지의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물에서 각각 3.29 mg/mL, 4.43 mg/mL의 농도에서 RC<sub>50</sub>값이 관찰되었고, ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과 열수 추출물 0.95 mg/mL와 70% 에탄올 추출물 2.47 mg/mL의 농도에서 RC<sub>50</sub>값이 관찰되어 열수 추출물이 70% 에탄올 추출물보다 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능이 우수한 것으로 확인되었다. 식물 기원의 시료에서 페놀 화합물은 그 함량이 많을수

록 항산화 활성이 높으며(40), 식물시료의 변색에 주된 영향을 미치는 인자로 알려져 있다(41). 따라서 원지 물 추출물이 70% 에탄올 추출물보다 높은 총 폴리페놀 함량을 나타내어 원지 물 추출물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거능이 높은 것으로 사료된다.

**Table 4. Total polyphenol contents, ABTS, DPPH radical scavenging activity in water extract and 70% EtOH extract from *P. tenuifolia***

	Water extract	70% EtOH extract
Total polyphenol contents (mg/g)	26.50±0.52	17.84±2.32
ABTS RC <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>1)</sup>	0.95	2.47
DPPH RC <sub>50</sub> (mg/mL)	3.29	4.43

Values are means±SD (n=3).

<sup>1)</sup>RC<sub>50</sub>: Concentration required for 50% reduction

### 세포독성측정

원지 추출물의 3T3-L1 세포에 대한 세포독성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같이 나타내었다. 추출물을 처리하지 않은 대조군의 세포 증식율을 100%로 하였을 때, 원지 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 경우 100 µg/mL의 농도에서 90% 이상의 세포증식이 유지되었고, 그 이상의 농도에서는 세포독성이 유발되었다. 그 결과 세포 증식에 크게 영향을 미치지 않는 100 µg/mL 이하의 농도로 10, 50, 100 µg/mL로 3T3-L1세포에 처리하여 지방세포 분화 억제능을 측정하였다.

### 지방세포 분화억제능 측정

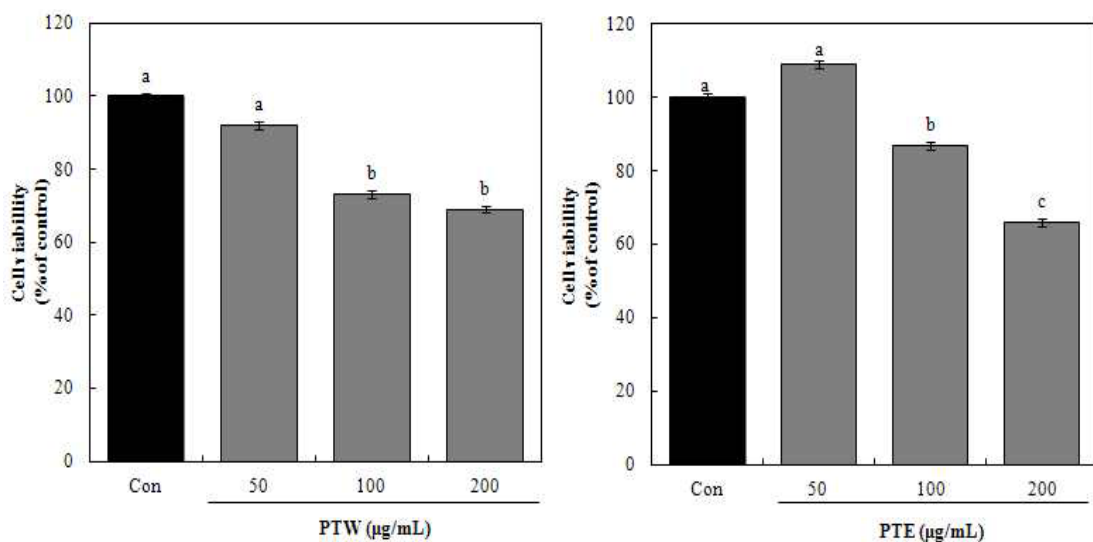
지방세포(adipocyte)는 지방선구세포(pre-adipocyte)상태로 존재하다가 적절한 환경하에서 분화되어 지방세포가

되어 세포 내 지방을 축적하는데 지방세포의 크기 또는 수적 증가가 비만의 정도를 결정짓는 하나의 요인으로 간주되고 있다(42-43). 원지 추출물의 지방 분화능을 측정한 결과, 열수 추출물은 10 µg/mL의 농도에서 대조군 대비 40.1%의 억제율을 나타내었고, 에탄올 추출물의 경우 10 µg/mL의 농도에서 대조군 대비 22.4%의 억제율을 나타내어 에탄올 추출물 보다 열수 추출물의 지방분화 억제 효과가 우수하였다(Fig. 2). Lee 등(44)이 보고한 마치현 추출물의 경우 10 µg/mL의 농도에서 15.5%의 지방분화 감소를 나타낸 연구결과와 비교하였을 때 원지 물 추출물의 우수한 지방분화능 억제 효과를 관찰할 수 있었다.

### Real time PCR을 이용한 mRNA 발현량 측정

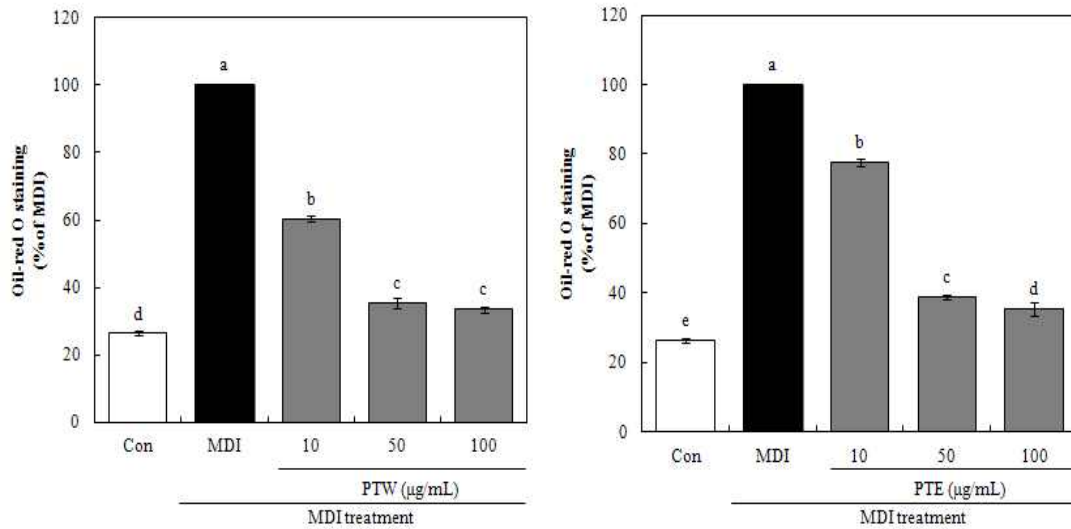
SREBP-1c는 지방과 간조직의 지방산과 콜레스테롤대사에 매우 중요한 역할을 가지는 전사인자이며(45), 지방세포에서 PPAR $\gamma$ 와 CEBP $\alpha$ 의 발현을 유도하여 지방조직 생성을 촉진 시킨다. 또한 지방산 생성에 관여하는 효소인 FAS, ACC 등의 발현을 조절하고 중성지방 생성과 관련된 단백질 발현에도 영향을 끼침으로써 인슐린 의존적인 지방 합성을 유도한다(46). 원지 물 추출물에 의한 지방축적의 감소가 지방 생성의 억제로부터 유도되는지를 조사하기 위하여 시료를 지방세포에 농도별로 처리한 후 지방생성과 관련된 유전자들의 mRNA 발현을 확인하였다(Fig. 3).

시료를 처리하지 않은 대조군에서는 분화유도에 따라 각 유전자들의 발현량이 증가하였지만, 원지 열수 추출물을 농도 별로 처리하였을 경우 농도 의존적으로 발현이 감소됨을 확인하였다. 원지 열수 추출물은 50 µg/mL의 농도에서 SREBP-1c의 발현량을 53.9%로 감소하였으며, 같은 농도에서 PPAR $\gamma$ 와 CEBP $\alpha$ 의 발현을 각각 98.2%, 94.4%로



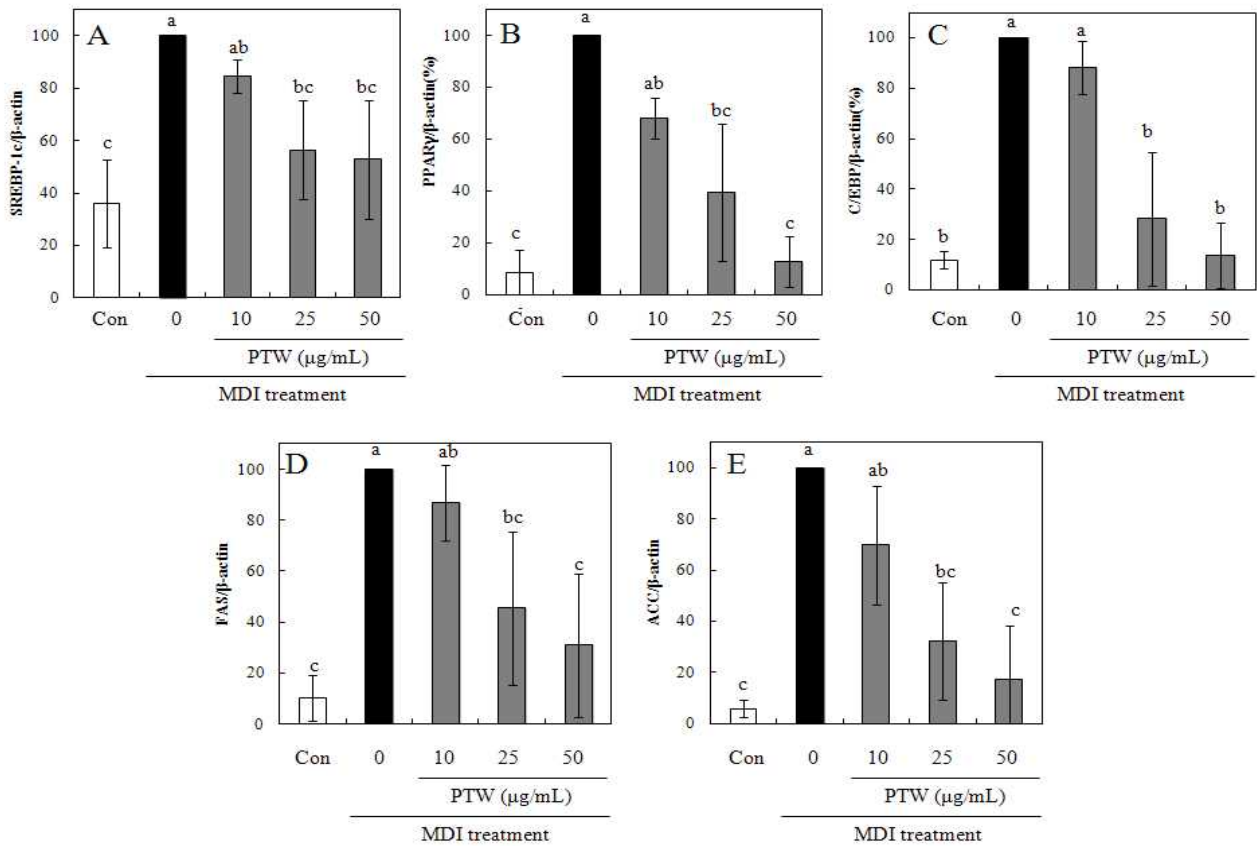
**Fig. 1. Cell viability of water extract (PTW) and 70% EtOH extract (PTE) from *P. tenuifolia* in 3T3-L1 preadipocytes cell.**

3T3-L1 cells were treated with PTW at various concentrations for 48hr. Cell viability was measured by the MTT assay. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. Values with the same superscript letters are not significantly different from each other at p<0.05



**Fig. 2. Inhibitory effect of water extract (PTW) and 70% EtOH extract (PTE) from *P. tenuifolia* on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte.**

Differentiation of confluent 3T3-L1 cells was initiated in DMEM containing differentiating culture mixture[MDI treatment : 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1µM dexamethasone and 1 µg/mL insulin]. Following 8-d differentiation, differentiated adipocytes were fixed and stained with oil-red O in order to visualize lipid droplets. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. Values with the same superscript letters are not significantly different from each other at p<0.05.



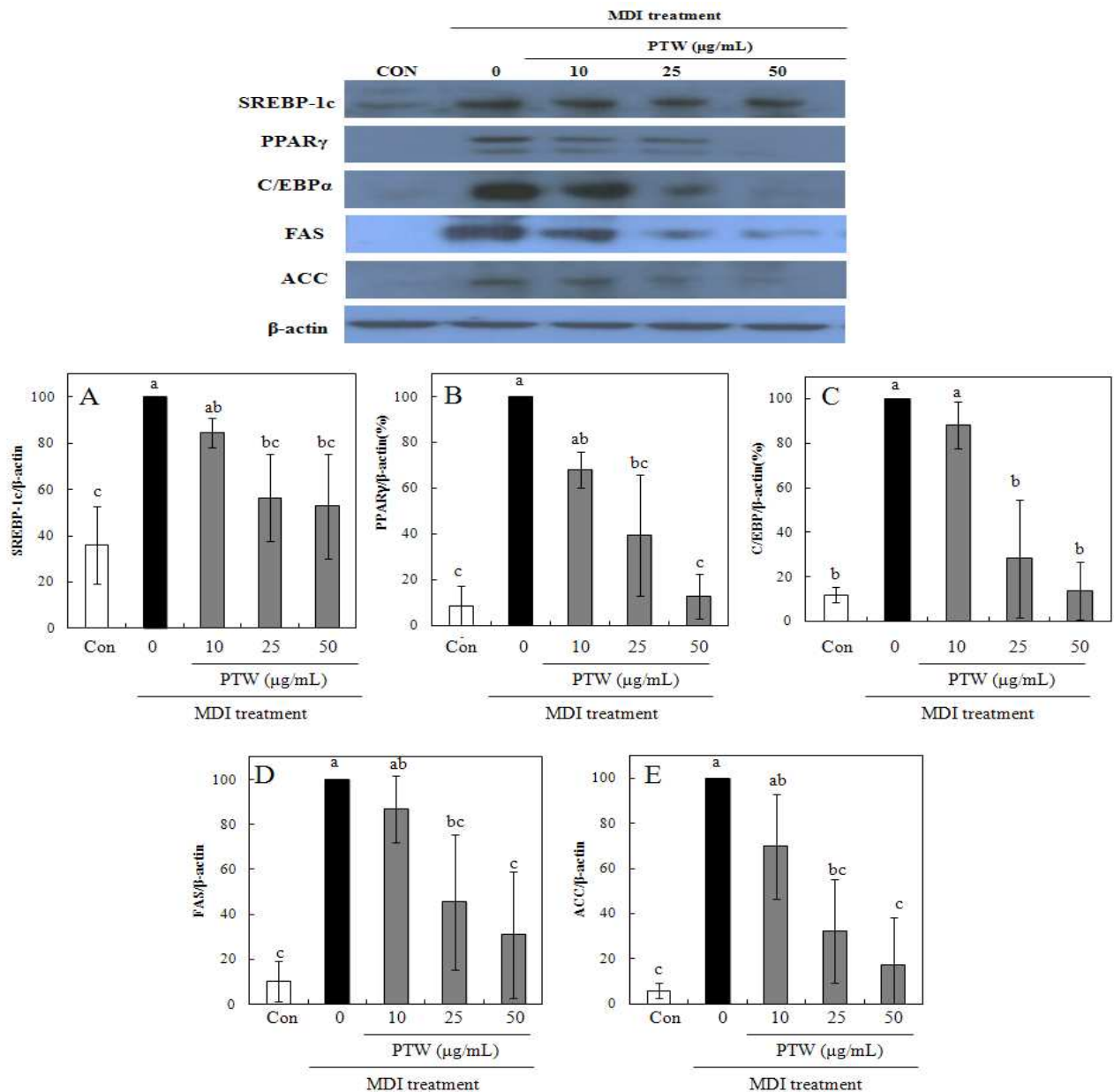
**Fig. 3. mRNA expression effects of *P. tenuifolia* water extract (PTW) on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells confirmed RT-PCR.**

Differentiation of confluent 3T3-L1 cells was initiated in DMEM containing differentiating culture mixture[MDI treatment : 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1µM dexamethasone and 1 µg/mL insulin]. Total RNA was extracted and cDNA was prepared. Equivalent amounts of cDNA were amplified using primers specific for SREBP-1c(A), PPARγ(B), CEBPα(C), FAS(D), ACC(E) and β-actin. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. Values with the same superscript letters are not significantly different from each other at p<0.05.

감소시키는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로 보아, 원지 열수 추출물이 상위 발현 유전자인 SREBP-1c, PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$ 의 mRNA 발현량을 감소시킴으로써 하위 인자인 FAS와 ACC mRNA의 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 원지 열수 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포화 인자(adipogenic factor)인 각 유전자 발현을 억제시킴으로써 지질의 합성 수송, 저장에 관여하는 FAS, ACC의 발현에 영향을 미쳐 지방분화를 억제시킨 것으로 생각된다.

**Western blot을 이용한 단백질 발현량 측정**

원지 열수 추출물의 지방 생성 및 분해와 관련된 단백질 발현과의 연관성을 확인하기 위해 western blot을 이용하여 SREBP-1c, PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$ 의 발현량을 측정하였다(Fig. 4). 이 중 SREBP-1c는 지방조직에서 발현하여 PPAR $\gamma$ 의 프로모터에 결합하여 PPAR $\gamma$ 의 발현을 조절하며, 지방산 대사물을 생성함으로써 지방세포 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다(47). 또한, CEBP $\alpha$ 는 PPAR $\gamma$ 의 활성화 및 지속적인 유지를 도와줌으로써 성숙한 지방세포의 생성을 위해



**Fig. 4. Protein expression effects of *P. tenuifolia* water extract (PTW) on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells confirmed western blotting.**

Differentiation of confluent 3T3-L1 cells was initiated in DMEM containing differentiating culture mixture [MDI treatment : 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 $\mu$ M dexamethasone and 1  $\mu$ g/mL insulin]. Western blotting was performed using 30  $\mu$ g of each sample. The loading control was assessed using  $\beta$ -actin antibody. The relative intensities SREBP-1c (A), PPAR $\gamma$ (B), CEBP $\alpha$ (C), FAS(D), ACC(E) expression compared with the  $\beta$ -actin expression were determined using quantity One Software. Each value is expressed as the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Values with the same superscript letters are not significantly different from each other at p<0.05.



인슐린 감수성에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있어, 지방세포 분화과정에 있어서 중요하게 작용하는 전사인자로써 비만 연구에 널리 이용되고 있다(48). 원지 물 추출물을 처리하지 않은 대조군은 SREBP-1c, PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$ , FAS, ACC의 발현이 증가하는 것으로 나타났고, 원지 열수 추출물을 농도 별로 처리하였을 때 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다. 특히 원지 열수 추출물은 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 SREBP-1c의 발현을 47.2%로 감소시키는 것을 확인하였고, 와 CEBP $\alpha$ 의 발현을 각각 87.4%, 86.2% 감소하는 것을 나타내었는데, 이와 같은 결과는 원지 열수 추출물이 SREBP-1c의 발현을 억제 함으로써 하위인자인 PPAR $\gamma$ 와 CEBP $\alpha$ 의 발현에 영향을 준 것으로 생각된다. 원지 열수 추출물은 비만 관련 인자들의 전사단계에서 발현을 제어하여 관련 단백질의 발현량이 감소되는 것을 확인하였고, 이에 따라 전지방세포의 지방분화 억제 및 지질함량이 감소되는 것을 확인하였다.

## 요 약

본 연구는 원지(*Polygala tenuifolia*)의 영양성분 및 항비만 효과를 측정하였다. 일반성분은 원지 원지의 경우 건부량 기준 탄수화물 21.7%, 조단백질 18.5%, 조지방 14.5%, 조회분 2.4%, 식이섬유 42.9%로 함유되어 있었다. 원지 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 단백질, 유리아미노산, 총당 및 환원당 함량은 열수 추출물이 70% 에탄올 추출물보다 함유량이 높게 나타내었다. 원지 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량과 ABTS와 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, 총 폴리페놀 함량은 열수 추출물은 26.6 mg/g으로 70% 에탄올 추출물보다 폴리페놀 함유량이 높게 나타내었으며, ABTS 라디칼 소거능은 열수 추출물의 경우 0.95 mg/mL의 농도에서 RC<sub>50</sub>값이 관찰되어 70% 에탄올 추출물보다 ABTS 라디칼 소거능이 우수한 것으로 확인하였다. DPPH 라디칼 소거능은 RC<sub>50</sub>값이 70% 에탄올 추출물의 경우 3.29 mg/mL로 관찰되어 열수 추출물보다 70% 에탄올 추출물의 높은 활성을 나타내었다. 원지의 항비만 효과를 알아보기 위해 분화된 3T3-L1 지방세포에서 원지 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 지방세포 분화 억제에 미치는 영향을 확인하였다. MTT assay를 이용하여 세포 독성을 측정된 결과 100  $\mu\text{g/mL}$  이하의 농도에서 세포 증식에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였고, 이와 같은 결과를 토대로 oil-red O 염색법을 이용하여 지방세포 분화 억제능을 측정하였다. 그 결과, 원지 열수 추출물의 경우 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 40.1% 지방세포 분화 억제능을 나타내어 70% 에탄올 추출물보다 우수한 효과를 나타내었다. 지방생성에 영향을 미치는 유전자 발현량을 측정하기 위해 western blot법과 real-time PCR 법을 시행하였다. 원지 물

추출물은 SREBP-1c, PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$ 의 단백질과 mRNA 발현을 억제 시켰고, 지방 생성에 영향을 미치는 효소인 FAS와 ACC의 생성을 조절하는 것으로 나타났다. 이와 같이 본 연구에서는 원지의 항비만 효능을 확인하였다. 원지 물 추출물의 경우 비만 예방 효능을 가진 기능성 식품 소재로서의 개발이 기대되며, 원지의 항비만 효능을 최적화를 위하여 추후 동물 실험 및 독성 실험 등에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## References

1. Albu J, Allison D, Boozer CN, Heymsfield S, Kissileff H, Kretser A, Krumhar K, Leibel R, Nonas C, Pi-Sunyer X, Vanltallie T, Wedral E (1997) Obesity solutions: report of a meeting. *Nutr Rev*, 55, 150-156
2. Grundy SM (1998) Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J Clin Nutr*, 67, 563S-572S
3. Haslam DW, James WP (2005) Obesity. *Lancet*, 366, 1197-1209
4. Leung WY, Thomas GN, Chan JC, Tomlinson B (2003) Weight management and current options in pharmacotherapy: orlistat and sibutramine. *Clin Ther*, 25, 58-80
5. Green H, Meuth M (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3, 127-133
6. Jessen BA, Stevens GJ (2002) Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene*, 299, 95-100
7. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999) PPAR is required for differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell*, 4, 611-617
8. Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Liepvre XL, Lubrano CB, Spiegelman B, Kim JB, Ferre P (1999) ADD1/SREBP1 is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol*, 19, 3760-3768
9. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F (1999) Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic, expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 12737-12742
10. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J (1999) Regulation of peroxisome proliferator-



- activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol*, 19, 5495-5503
11. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109, 1125-1131
  12. Ballinger A, Peikin SR (2002) Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur J Pharmacol*, 440, 109-117
  13. Kim HJ, Kang CH, Kim SK (2012) Anti-adipogenic effect of *Undaria pinnatifida* extracts by ethanol in 3T3-L1 adipocytes. *J Life Sci*, 22, 1052-1056
  14. Park JA, Park C, Han MH, Kim BW, Chung YH, Choi YH (2011) Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by aged black garlic extracts in 3T3-L1 preadipocytes. *J Life Sci*, 21, 720-728
  15. Suzuki R, Tanaka M, Takanashi M, Hussain A, Yuan B, Toyoda H, Kuroda M (2011) Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway. *Nutr Metab (Lond)*, 8, 14-22
  16. Lee DS, Choi HG, Li B, Kim KS, Kim SA, Chon SK, Rho JM, Kim KM, Han JH, Jeong GS, Kim YC (2011) Neuroprotective effect of the acid hydrolysis fraction of the roots of *Polygala tenuifolia*. *Korean J Oriental Physiol Pathol*, 25, 628-634
  17. Kim JS, Lee YS, Lee JH, Kim JS (1999) A study on the constituents from the roots of *Polygala tenuifolia*. *Korean J Pharmacogn* 30, 417-419.
  18. Park MK, Park JH, Kim BY, Kim JM, Liem KJ, Han BH (1993) Analysis of alkaloids in *Polygala tenuifolia* by HPLC. *Anal Sci Technol*, 6, 255-259.
  19. Jiang Y, Tu PF (2002) Xanthone O-glycosides from *Polygala tenuifolia*. *Phytochem*, 60, 813-816
  20. Ikeya Y, Sugama K, Okada M, Mitsuhashi H (1999) Two xanthones from *Polygala tenuifolia*. *Phytochem*, 30, 2305-2308
  21. Fujita T, Liu DY, Ueda S, Takeda Y (1992) Xanthones from *Polygala tenuifolia*. *Phytochem*, 31, 2061 - 2065
  22. Cheong MH, Lee SR, Yoo HS, Jeong JW, Kim GY, Kim WJ, Jung IC, Choi YH (2011) Anti-inflammatory effects of *Polygala tenuifolia* root through inhibition of NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells. *J Ethnopharmacol*, 137, 1402-1408
  23. Woo WS, Lee KY (1962) Effects of total saponin and oil fraction of *Polygala tenuifolia* on serum cholesterol level in rabbits. *Korean J Pharmacog*, 6, 8-10
  24. Xu SP, Yang YY, Xue D, Liu JX, Liu XM, Fan TP, le Pan R, Li P (2011) Cognitive-enhancing effects of polygala saponin hydrolysate in  $\alpha\beta$ (25-35)-induced amnesic mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 10, 1-12
  25. Naito R, Tohda C (2006) Characterization of anti-neurodegenerative effects of *Polygala tenuifolia*  $\alpha\beta$  (25-35)-treated cortical neurons. *Biol Pharm Bull*, 29, 1892-1896
  26. Ban JY, Lee HJ, Lee SB, Lee YJ, Seong NS, Song KS, Bae KW, Seong YH (2003) Methanol extract of *Polygalae radix* protects excitotoxicity in cultured neuronal cells. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 11, 298-305
  27. AOAC (1990) Official Methods of Analysis. 11 thed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA, p 17
  28. Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275
  29. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Biochem*, 28, 350-355
  30. Luchsinger WW, Cornesky RA (1962) Reducing power by the dinitrosalicylic acid method. *Anal Biochem*, 4, 346-347
  31. Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Anal Biochem*, 12, 239-249
  32. Blois MS (1954) Antioxidant determination by the of a stable free radical. *Nature*, 181, 1198-1200
  33. Re R, Pellegrini N, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237
  34. Kim CA, Oh DH, Eun JB (2006) Change of physicochemical characteristics and functional components in the raw materials of Saengsik, uncooked food by drying methods. *Korean J Food Sci Technol*, 38, 188-196
  35. Nishimune T, Yakushiji T, Sumimoto T, Taguchi S, Konishi Y, Nakahara S, Ichikawa T, Kunita N (1991) *Glycemic* response and fiber content of some foods. *Am J Clin Nutr*, 54, 414 - 419
  36. Rosamond WD (2002) Dietary fiber and prevention of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 39, 57-59
  37. Chau CF, Huang YL, Lin CY (2004) Investigation of the cholesterol-lowering action of insoluble fibre derived

- from the peel of *Citrus sinensis* L. cv. Liucheng. Food Chem, 87, 361-366
38. Kin DM, Kim KH, Sung NY, Jung PM, Kim JS, Kim JK, Kim JH, Choi JI, Song BS, Lee JW, Kim JK, Yook HS (2011) Effects of gamma irradiation on the extraction yield and whitening activity of polysaccharides from *Undaria pinnatifida* sporophyll. J Korean Soc Food Sci Nutr, 40, 712-716
  39. Duval B, Shetty K (2001) The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed andise root extract. J Food Biochem, 25, 361-377
  40. Choi KS, Lee HY (1999) Characteristics of useful components in the leaves of Baechohyang (*Agastache rugosa*, O. Kuntze). J Korean Soc Food Sci Nutr, 28, 326-332
  41. Yoshizawa S, Horiuchi T, Yoshida T, Okuda T (1987) Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. Phytother Res, 1, 44-47
  42. Zhang JW, Tang QQ, Vinson C, Lane MD (2004) Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 101, 43-47
  43. Gregoire FM, Smas CM, Sui HS (1998) Understanding adipocyte differentiation. Physiol Rev, 78, 783-809
  44. Lee MS, Kim CT, Kim CJ, Cho YJ, Kim YH (2006) Effects of *Portulaca oleracea* L. extract on lipolysis and hormone sensitive lipase (HSL) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Korean J Food Nutr, 55, 309-313
  45. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest 109, 1125-1131
  46. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J (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, 5495-5503
  47. Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postige AA, Dean DC (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. Cell, 98, 859-869
  48. Hwang HS, Kim SH, Yoo YG, Chu YS, Shon YH, Nam KS, Yun JW (2008) Inhibitory effect of deep-sea water on differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Mar Biotechnol, 11, 161-168