



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박사학위 청구논문
지도교수 양 영 현

감국 *Lactococcus lactis* 배양액을
활용한 smoothened 조절기반 비만억제
연구

2021년 2월

건국대학교 대학원
생물공학과
최 재 영

감국 *Lactococcus lactis* 배양액을
활용한 smoothened 조절기반 비만억제
연구

Reducing obesity via the regulation of the
smoothened using *Lactococcus lactis* and
Chrysanthemum indicum L.

이 논문을 공학 박사학위 청구논문으로 제출합니다.

2020년 11월

건국대학교 대학원

생물공학과

최재영

최재영의 공학 박사학위 청구논문을 인준함.

심사위원장 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

2020년 11월

건국대학교 대학원

목차

표 목차	v
그림 목차	vi
ABSTRACT	ix
제1장 서론	1
제1절 지방전구세포 및 지방구세포 분화 메커니즘	1
제2절 Camphor와 감국의 생리활성	4
1. Camphor의 생리활성	4
2. 감국의 생리활성	5
제3절 유산균	7
제4절 Hedgehog pathway	9
제5절 연구 목적	1
제2장 실험 재료 및 방법	1
제1절 Camphor에 대한 독성연구와 유전자 조절 분석	1
1. 단일물질	1
2. 세포분화 및 분화된 세포주의 세포독성	1
3. 세포분화 및 Oil Red O 염색	1
4. Quantitative RT-PCR	1
제2절 감국 유산균 배양액 제조	1
1. 감국 추출물의 제조	1
2. 실험 미생물 및 배양	1
3. 감국 추출물을 활용한 유산균 배양액 제조	2
제3절 3T3-L1 세포주의 세포배양	2
1. 세포배양 및 세포독성	2

2. 3T3-L1 세포주의 세포분화 및 Oil Red O 염색	2. 2
제4절 Western blot analysis	3..... 2
제5절 FACS 기기 분석	4..... 2
1. 3T3-L1 세포주의 분화도 측정	4..... 2
2. GLI1 단백질 FACS 분석	4..... 2
제6절 Small interfering RNA 유전자 조절 분석	5. 2
제7절 동물실험	6..... 2
1. 실험동물 입수 및 군 구성	6..... 2
2. 실험물질 제조 및 투여	7..... 2
2.1. 포도당 배지 제조	7..... 2
2.2. <i>Lactococcus lactis</i> 접종	7..... 2
2.3. 균주 배양액과 감국 추출물 접종	8... 2
2.4. 실험 제조물질 및 감국 추출물 제조	8. 2
2.5. 실험물질 투여	8..... 2
3. 체중 측정 및 섭취량 측정	0..... 3
4. 동물의 지방량(body fat mass) 측정	0.... 3
5. 부검	0..... 3
6. 혈청학적 검사	1..... 3
7. T 세포 분포 검사	2..... 3
7.1. C57BL/6 mice 혈액 전처리	2..... 3
7.2. T 세포 분포도 측정	2..... 3
제8절 통계분석	4..... 3
제3장 결과 및 고찰	5..... 3
제1절 Camphor의 세포독성과 mRNA 분석	5... 3
1. Camphor의 세포독성	5..... 3

2. Camphor의 mRNA 분석	8.....	3
3. Oil Red O 염색에 따른 지방구세포 분화	0..	4
제2절 감국 추출물의 유산균 발효에 따른 유산균 수 및 pH 측정	2	
1. 유산균 수 측정	2.....	4
2. 유산균 발효에 따른 pH값의 변화	4...	4
제3절 세포독성 및 세포분화도 분석	6....	4
1. 감국 추출물, 배양액의 세포독성	6....	4
2. FACS 기기 분석에 따른 세포분화 분석	9..	4
제4절 감국 추출물과 감국 배양액의 지방구세포 분화억제 확인	5	
1. Akt pathway 조절과 지방구세포 분화	1..	5
2. Hedgehog pathway 조절에 따른 분화 억제	4..	5
3. Lipogenesis pathway 조절에 따른 분화 억제	8..	5
제5절 GLI의 단백질 발현과 SMO의 조절	0..	6
1. FACS 기기 분석에 따른 GLI의 단백질 발현 차이 분석	0	
2. 감국 배양액과 camphor의 지방구세포 분화억제 비교	26	
3. SMO의 억제효과 및 지방구세포 분화 조절	5..	6
제6절 C57BL/6 mice의 감국 배양액 섭취에 따른 변화	9..	6
1. 임상증상	9.....	6
2. 체중	9.....	6
3. 사료의 섭취량	4.....	7
4. Body fat mass 측정	6.....	7
5. 장기무게	1.....	8
6. 혈청학적 검사	3.....	8
7. 혈액내의 T 세포의 변화	2.....	9
제4장 결론	8.....	9

참고문헌2...0... 1

국문초록6...2... 1

표 목차

<Table 1> Primers sequences for quantitative real-time PCR analysis	8.....	1
<Table 2> The experimental C57BL/6 mice models	7.....	2
<Table 3> The serum biochemical analysis	1.....	3
<Table 4> T cell assay antibodies and conjugates	3...	3
<Table 5> Four lactic acid bacteria species that induce cell proliferation	7.....	4
<Table 6> Body fat mass and lean mass (value) in control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for 8 weeks	8.	7
<Table 7> Body fat mass and lean mass (percent) in control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for 8 weeks	9.....	7
<Table 8> Body fat mass and lean mass in control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for 8 weeks	0.	8
<Table 9> Absolute organ weight (g) and relative organ weight (organ weight/body weight ratio) at the time of sacrifice in control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for 8 weeks	2.....	8
<Table 10> Measurement of blood chemistry in control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for 8 weeks	5.	8

그림 목차

<Figure 1> A lipogenesis targeting schematic overview of the Sonic Hedgehog pathway	1.....	1
<Figure 2> Schematic diagram of the experiment	5....	1
<Figure 3> Lactic acid bacterial culture medium process of <i>Chrysanthemum indicum</i> L. (CI) extract and resistant strain manufacturing method	1.....	2
<Figure 4> The C57BL/6 mice model experimental set-up	9... 2	
<Figure 5> T cell experimental set-up	3.....	3
<Figure 6> Cell viability at t=1 and t=10 days in response to administration of varying concentrations of camphor	6 3	
<Figure 7> MDI-induced differentiation of 3T3-L1 cells in the presence of camphor or DMSO	7.....	3
<Figure 8> Relative expression of mRNA in response to camphor	9. 3	
<Figure 9> Oil Red O staining of BSC, 3T3-L1 cells treated with camphor	1.....	4
<Figure 10> Lactic acid bacteria concentration calculated by OD ₆₀₀ ..	3. 4	
<Figure 11> The pH measurement of fermented CI after incubation with lactic acid bacteria	5.....	4
<Figure 12> Cytotoxicity effect of CI culture medium on the 3T3-L1 cell line	8.....	4
<Figure 13> Live and dead cells distinguished by flow cytometry of cultures incubated with CI	0.....	5
<Figure 14> Akt pathway control of CI on the inhibition of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells	2.....	5
<Figure 15> Oil Red O stained on the inhibition on adipocyte		

differentiation of 3T3-L1 cells	3.....	5
<Figure 16> Hedgehog pathway control of CI culture medium on the inhibition of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells	6..	5
<Figure 17> Schematic representation of inhibition of adipocyte differentiation by CI culture medium through PTCH1-Gli2-mediated down regulation of lipogenesis	7	5
<Figure 18> Lipogenesis pathway control of CI culture medium on the inhibition of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells	9..	5
<Figure 19> Protein level of Gli1 (FITC) by 3T3-L1 cells in response to CI alone, in response to each of the bacterial mediators of culture medium, and to camphor	1.....	6
<Figure 20> Oil Red O staining of BSC, cells treated with 3237 and cells treated with camphor	3.....	6
<Figure 21> Western blot of extracts from 3T3-L1 cells differentiated for 5 days in the presence of 3237, camphor or DMSO ...	4.	6
<Figure 22> Results of transfection (12 hr) with C-si, S-si or P-si 12 hr followed by MDI-mediated differentiation	7..	6
<Figure 23> Western blot analysis of SMO and PTCH inhibition targeting Hedgehog pathway proteins	8....	6
<Figure 24> Changes in body weight of control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for experimental period ..	1.	7
<Figure 25> Changes in body weight gain (vs week 0) of control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for experimental period	2.....	7
<Figure 26> Body weight of control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials on week 8	3.....	7
<Figure 27> Changes in food consumption of control and HFD fed		

C57BL/6 mice treated with test materials for experimental period	5.....	7
<Figure 28> Change in the AST rates in the blood C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts	6..	8
<Figure 29> Change in the ALT rates in the blood C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts	7..	8
<Figure 30> Change in the TG rates in the blood C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts	8..	8
<Figure 31> Change in the T-Chol rates in the blood C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts	9.	8
<Figure 32> Change in the HDL-C rates in the blood C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts	0.	9
<Figure 33> Change in the LDL-C rates in the blood C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts	1.	9
<Figure 34> Change in the T cell population in mice blood upon the oral administration of different extracts	4.....	9
<Figure 35> Change in the CD4+ T cell population in mice blood upon the oral administration of extracts	5.....	9
<Figure 36> Change in the CD8+ T cell population in mice blood upon the oral administration of extracts	6.....	9
<Figure 37> Change in the CD4+ CD8+ T cell population in mice blood upon the oral administration of extracts	7....	9

ABSTRACT

Reducing obesity via the regulation of the smoothened using *Lactococcus lactis* and *Chrysanthemum indicum* L.

Choi Jae Young

Department of Biological Engineering
Graduate School of Konkuk University

Camphor is a volatile substance that has extensively been used as a food additive, cosmetic fragrances, or preservatives. Ingesting or inhaling camphor in large amounts or for a long duration will cause poisoning and cell damage in certain tissues or organs in the body. Camphor does not threaten human safety when used in small amounts and has thus been used as an anti-inflammatory, antibacterial, anti-cancer, or antiviral drug. However, research on camphor's regulation of the Hedgehog pathway, which is involved in adipocyte differentiation, is lacking. Camphor's toxicity rendered it challenging to administer; therefore *Chrysanthemum indicum* L., which contains a relatively high concentrations of camphor, was used to investigating the effect of camphor on obesity control via the Hedgehog pathways. Considering that lactic acid bacteria is administered to improve physiological processes associated with obesity development, lactic acid bacterial fermentation of

C. indicum L. extract was used to produce a culture medium to study on obesity control. Toxicity was not detected upon treating 3T3-L1 cells with 250 mM camphor. Subsequently, qRT-PCR was used to analyze gene expression in the camphor-treated cell line. In these cells, the expression of the preadipocyte markers *Smo* and *Gli1* increased and that of the adipocyte differentiation marker *C/ebpα* decreased. The *C. indicum* L. culture media were produced from eleven *Lactobacillus* species, of which KCTC 3115, KCTC 3237, KCTC 3109, and KCTC 3074 were selected based on their pH, bacterial number, and cytotoxicity to test their potential inhibition of adipocyte differentiation via the Hedgehog pathway. Decreased adipocyte differentiation in the Q8 quadrant was noted during FACS analysis. GLI2 protein level was significantly increased in cells treated with the *C. indicum* L. extract or KCTC 3115- and KCTC 3237-containing culture media. The *C. indicum* L. extract or KCTC 3115- and KCTC 3109-containing culture mediums reduced C/EBPα and FAS protein level and increased pACC protein level. The GLI1 protein level measured by FACS was $62.7 \pm 1.5\%$ for KCTC 3237 and $32.1 \pm 2.8\%$ for KCTC 3115, which was higher than the level in differentiated cells at $24.9 \pm 3.1\%$. Adipocyte differentiation was not induced after transfecting the cells with the siRNA of *Ptch*; however, transfection with the siRNA of *Smo* differentiated the adipocytes. Moreover, *Ptch* siRNA decreased C/EBPα protein level and increased smoothened (SMO) and GLI1 protein levels. KCTC 3115 (*Lactococcus lactis*) may inhibit adipocyte differentiation by regulating the adipocyte differentiation signal and Hedgehog pathway. High fat diet (HFD) C57BL/6 mice fed with *C. indicum* L.-containing *L. lactis* culture medium a more significant weight loss than those fed with *Garcinia cambogia*. On comparing CD4⁺, CD8⁺,

and CD4+ CD8+ T cells in the HFD groups, they were significantly increased by $4.00 \pm 1.00\%$, $4.84 \pm 1.33\%$, $6.69 \pm 2.68\%$, $7.02 \pm 2.26\%$, $1.21 \pm 0.91\%$, and $1.46 \pm 0.81\%$, respectively. Obesity suppression was examined via the Hedgehog pathway, confirmed the *in vitro* inhibition of adipocyte differentiation and obesity by camphor, the *C. indicum* L. extract via the regulation of the Hedgehog pathway. The *C. indicum* L. culture medium further increased the inhibition of adipocyte differentiation and consequentially, controlled obesity. Therefore, in this study can be suggested that this extract and culture medium can be used to treat obesity by the inhibition of adipocyte differentiation via the Hedgehog pathways.

Keyword : *Chrysanthemum indicum* L., *Lactococcus lactis*, adipocyte, Hedgehog, SMO, camphor

제1장 서론

제1절 지방전구세포 및 지방구세포 분화 메커니즘

세계보건기구(WHO)에서 1998년에 이미 만성질환으로 규정한 비만은 음식물의 섭취(food intake)와 에너지 사용(energy expenditure)의 불균형으로 인해 초래되는 질병이다(Rubinstein & Low, 2017). 비만은 신체의 거의 모든 생리적인 기능에 악영향을 미치며 여러 유형의 암, 정신적 질환, 근골격계 질환 등을 증가시킨다(Chooi *et al.*, 2019). 또한, 비만은 대부분 증상이 없으나 당뇨병, 동맥경화, 고혈압 등 다양한 만성 질환의 원인이 된다(Kahan & Manson, 2019). 최근 비만 인구가 급증함에 따라 비만으로 인해 만성질환에 노출된 인구도 증가하고 있다. 더구나 이런 현상이 사회적으로 가장 왕성하게 활동하는 사람들에게서 발병하기 때문에 경제적인 손실도 상당할 뿐만 아니라, 이의 예방과 치료를 위해 쓰여지는 비용은 의약학 및 건강 산업의 최고액에 다다를 정도의 수준이다(Rubinstein & Low, 2017). 따라서 비만에 대한 심각성을 인식하고, 현재보다 뛰어난 타겟 물질을 목표로 새로운 약물을 개발하려는 노력은 끊임없이 계속되고 있다. 또한, 비만이 대사 질환과 관련된 다양한 합병증을 유발하기 때문에 시장성과 효용 가치를 떠나 전 인류가 이 분야의 연구 성과를 기다리고 있다. 하지만, 비만에 관련된 신약개발은 매우 더디며, 현재 임상에서 사용되는 비만을 포함한 대사 질환에 대한 약물은 5 종류 안팎에 머물고 있는 실정이다(Paccosi *et al.*, 2020; Steinberg & Carling, 2019).

고탄수화물의 섭취로 인한 체내로 들어온 포도당들은 체온유지와 생체 에너지 순환 및 생산에 사용되지만(Lee & Seo, 2010), 과잉으로 섭취한 잉여의 포도당을 비롯한 영양소들은 에너지 저장의 목적으로 중성지방

(triglyceride)의 형태로 지방구세포로 유입되어 축적되며, 이 순환이 반복되면 지방구세포의 비대(hypertrophy)와 과형성(hyperplasia)으로 인해 결국 비만을 초래한다(Meln *et al.*, 2019). 따라서 이러한 에너지의 과도한 저장을 막기 위해서는 에너지 흡수를 최소화하고 에너지 사용을 증대시키는 것이 필요하므로 지방구세포 연구는 필수 불가결하다. 특히 지방구세포 연구에서 지방 축적을 감소시키고 지방구세포의 수를 줄이는 방안을 찾아내는 것이 핵심이다.

지방구세포의 분화는 근육세포 분화와 신경세포 분화와는 달리 다양한 전사인자 및 호르몬의 상호작용을 기반으로 매우 복잡하게 이루어진다. 지방전구세포(pre-adipocyte)가 지방구세포로 분화해 나가는 과정에는 세포의 형태적 변화와 유전자 발현양상의 변화 등이 함께 일어난다(Gustafson *et al.*, 2019). 대부분의 경우 이러한 변화는 전사단계에서 각 유전자 발현양의 변화를 나타내는데, 지방구세포의 분화조절은 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), r/retinoid X receptor (r/RXR), adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element binding protein-1c (ADD1/SREBP-1c)라고 불리는 전사인자(transcription factor)가 중추적인 역할을 담당하고 있다(Hildreth *et al.*, 2019; Jemai *et al.*, 2020). 이들 전사인자는 지방구세포 분화 과정 중 각기 다른 시점에서 발현이 유도되며 서로 상호작용을 통하여 여러 지방구세포 특이 유전자들의 발현을 조절하고, 지방대사의 활성화와 지방구세포 분화를 점진적으로 유도해 나간다(Lim *et al.*, 2014).

3T3-L1 세포주는 지방전구세포로서 지방구세포로 분화되는 과정은 CCAAT/enhancer binding protein- β (C/EBP β)와 CCAAT/enhancer binding protein- δ (C/EBP δ)로 조절되는 초기분화 및 peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ)와 CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α)로 조절되는 후기분화로 나뉜다. 분화유도물질인 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexametason 및 insulin으로 자극을

시키면 cell arrest가 유도되면서 분화가 시작되고 다양한 인자들에 의해 C/EBP β 와 C/EBP δ 의 발현은 상승된다(Cao *et al.*, 1991). adipogenesis를 조절하는 핵심 전사인자는 adiponectin (ADIPOQ)과 glucose transporter (GLUT) 등을 포함 terminal marker의 발현을 유도한다(Lee *et al.*, 2009; Rosen & MacDougald, 2006). 이런 유전자 발현양상을 바탕으로 지방전구세포가 지방구세포로의 변화 시 나타나는 유전자 발현양의 변화를 조절해서 비만을 억제하는 연구가 진행되었다.

이와 별개로 천연물을 활용하여 비만을 억제하는 연구가 진행되고 있다. 차, 대두, 인삼, 땅콩, 사과, 포도나무 등의 추출물 중 지방 소화에 관련하는 효소 중 하나인 췌장 lipase의 활성을 억제하는 효과가 있는 물질의 선별(de la Garza *et al.*, 2011)과 *Panax quinquefolium*, *Panax ginseng*의 뿌리, 잎과 열매에서 추출한 추출물이 항 고혈당, 항비만 등의 효과를 입증했으며(Yin *et al.*, 2008), ginsenosides의 경우 주요 생리 화합물로서 미토콘드리아의 기능 억제, 해당작용 자극, AMP-activated protein kinase (AMPK) 신호의 활성화, 지방 생성 억제 및 low-density lipoprotein (LDL) 수용체 발현 유도 와 연관이 있는 것으로 나타났다. 또한, bitter melon과 *Momordica charantia*는 혈당과 지질을 감소하는 것으로 나타났다(Yin *et al.*, 2008). *Euonymus alatus* (Thunb.) Sie에서 분리한 1-O-feruloyl- β -D-glucose가 3T3-L1 세포주에서 지방구세포 분화억제(Jeong *et al.*, 2015; Kwak & Kim, 2018), protein tyrosine phosphatases 1B (PTP1B), α -glucosidase에 대한 저해를 보고했다(Jeong *et al.*, 2015). *Citrus kiyomi* \times *ponkan*의 과피 추출물의 항비만 효과(Lim *et al.*, 2014)와 상엽, 구기자, 국화, 대추, 참깨, 나복자를 활용한 차를 섭취 시 고지혈증 환자의 혈중 지질 농도를 저하 효과(Lim *et al.*, 2005) 등 천연물의 추출물을 활용하여 비만, 그리고 비만을 매개로 하는 여러 만성 질환 치료제로서의 가능성을 두고 연구가 진행되고 있다.

제2절 Camphor와 감국의 생리활성

1. Camphor의 생리활성

오랜 역사 동안 camphor는 동양에서 광범위하게 다양한 용도로 사용되었다. 180℃에서 하얀색의 왁스 형태로 존재하고 순환 자극제와 마취제, 화장품의 향료, 식품첨가물, 제과제품의 방충제, 가소제 및 아로마 화학 물질의 중간체로서 사용되고 있으며, 향균제, 항바이러스제, 향암 등의 효과가 보고되고 있다.(Chen *et al.*, 2013; Kumar & Ando, 2003). Ultraviolet (UV) 흡수제로 사용되고 있는 4-methylbenzylidene camphor (4MBC)의 경우 체중의 증가 억제, 지방저장소의 크기 축소, 혈청내의 leptin 감소 등의 보고가 있다(Seidlova-Wuttke *et al.*, 2006). 또한, camphor는 brown adipose tissue와 beige adipose tissue의 지방구세포에서 열 발생 조절을 유도하는 transient receptor potential (TRP) 발생시켜 체중조절 및 비만을 예방하는 물질로 언급이 되어 있다(Uchida *et al.*, 2018).

Camphor는 $\text{CH}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ 의 화학식을 갖는 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]-2-heptanone이며 두 가지 거울상의 이성질체 형태로 존재하고 있다(Nandi 2005). 일반적으로 합성해서 얻거나 *Cinnamomum camphora*, *Dryobalanop-saromatica*, *Ocoteausambarensis*, *Ocimum kilimandscharicum*를 증류해서 생산되어지며, 그 외에 많은 식물에서 에센셜 오일의 형태로 존재한다(Chen *et al.*, 2013). 대부분의 식물은 가공해서 섭취하는데 대표적으로 차를 들 수 있다. 다수의 기능성차의 섭취 후 혈중 지질 농도의 개선에 대한 비교 연구로서 국화가 언급이 되어 있으며(Lim *et al.*, 2005), 국화과에 속하는 산국과 감국에 공통적으로 camphor가 다량 함유되어 있다고 보고되고 있으며, 그 중 감국의 GC-MS 분석에서 peak area (%)가 10.04%로 보고한 바 있다(Hong, 2002). 또 다른 감국의 GC-MSD 분석에서도 $621.08 \pm 18.51 \mu\text{g/mL}$ 의 camphor 함유량을 확인하였다(Kim *et al.*, 2018a).

2. 감국의 생리활성

국화과(Asteraceae)에 속하는 국화(*Chrysanthemum*)는 우리나라 전역에 자생하는 식물로 조성 및 식품재료 등으로 널리 이용되고 있으며, 품종에 따라 산국(*Chrysanthemum boreale* M.)과 감국(*Chrysanthemum indicum* L.)등이 있다(Bang *et al.*, 2015). 감국은 국화과의 여러해살이풀로 중국, 일본, 한국 등 아시아 지역 햇볕이 잘 드는 지역에서 자란다. 감국은 산국과 다르게 작은 노란색 꽃을 피우며, 가을 한국의 어디에서나 볼 수 있는 들국화이다. 감국은 황국(黃菊)이라고도 불리며, 꽃이 성글게 피는 특징을 갖는다. 감국의 키는 보통 30~60 cm로 자라며, 줄기는 가늘고 자흑색을 띤다(Shao *et al.*, 2020; Yun & Jo, 2007).

감국차는 감기 예방, 두통, 장염, 변비, 관상동맥, 심장 질환 및 고혈압 치료를 위해 한약으로 널리 사용되며, 어린잎은 나물로도 쓰인다(Jiang *et al.*, 2019b; Zhong *et al.*, 2019). 감국에 포함된 페놀성 화합물에는 luteolin, apigenin, acacetin, 및 quercetin을 포함한 일부 플라보노이드 등, 약 190개 이상의 화학성분이 존재하며(Shao *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2015), 에센셜오일과 같은 알킬배당체 성분이 있어 다양한 연구가 진행되고 있다. 감국의 생리활성은 미생물 저해활성, glucosyltransferase 저해활성에 대한 보고가 있으며(Kim *et al.*, 2005), 최근 이러한 성분은 다양한 암세포주의 세포주기를 조절하고 세포사멸을 유도하는 것으로 알려졌다(Jung *et al.*, 2019). 감국 추출물을 이용한 연구에서는 MC3T3-L1 조골세포의 증식 및 분화를 조절하고(Yun *et al.*, 2011), 미용 기능성 소재와 transforming growth factor (TGF)- β /c-Jun N-terminal kinase (JNK) 신호전달 경로를 통해 피부건강을 유지하는데 활용될 수 있으며(Hwang, 2019; Kim *et al.*, 2016), α -glucosidase와 PTP1B 저해 활성을 갖는 것으로 보고되고 있다(Hwang *et al.*, 2017). 또한, 감국에 함유된 플라보노이드 성분이 우울증을 악화시켜준다는 연구가 발표되었으며(Shewale *et al.*, 2020), eucalyptol과 camphor 등을 함유한 감국 에센셜오일의 유기화합물은 흡입하면 뇌파에 관여하여 정신적,

육체적 이완을 제공하는 것으로 나타났다(Kim *et al.*, 2018a).

감국 추출물을 이용해 지방구세포 분화억제 효과를 조절하는 타겟 메커니즘에 대한 연구로는 감국 추출물 처리 농도에 따라 triglycerides (TG), total cholesterol (T-Chol), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)와 leptin이 변화를 보이고, 지방구세포 분화와 관련이 있는 전사인자 C/EBP α 를 조절하지만, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), ADIPOQ 및 peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α)는 조절하지 못하는 것으로 보고된 바 있다(Lee *et al.*, 2019a). 그리고 high fat diet (HFD)유발 비만 마우스 실험에서 체중과 epididymal white adipose tissue (EWAT), 간 중량 및 T-Chol, TG, leptin을 유의하게 감소시켰으며, ADIPOQ의 수치를 증가시켰다. 또한, EWAT에서는 PPAR γ , C/EBP α 및 지방산 합성 효소의 발현이 감소되었고, 간 조직에서는 PPAR α 를 상향시켰다(Cha *et al.*, 2018).

다양한 기능적 효과가 있는 감국은 예로부터 향료, 약용재료, 술, 차 등의 식품 첨가제로 널리 사용되었으나(Hwang *et al.*, 2017), 감국을 포함한 허브류의 경우 대부분 차로 마시기 때문에 천연화합물은 그 자체로는 인체에 쉽게 흡수되기 힘들다. 그러나 장내 미생물에 의해 구조적 변화를 일으켜 흡수될 수 있는 형태로 바뀐다면 천연화합물은 작은 분자로 분해되어 인체에 잘 흡수될 수 있게 된다. 이것이 미생물에 의한 효소 반응이며, 대표적으로 유산균에 의한 효소반응을 꼽을 수 있다(De Pasquale *et al.*, 2020). 특히, 유산균은 식품발효 뿐 아니라 식품의 영양 및 흡수 개선을 위해 이용되고 있으며 유산균을 이용한 사례들이 증가하는 추세이다.

제3절 유산균

체내에 존재하는 유산균(lactic acid bacteria)의 군주는 다양하지만 주로 이용되는 군주는 *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kitasatonis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus sakei*, *Streptococcus thermophiles*, *Bifidobacterium bifidum* 등이 있으며, 식품발효에 많이 이용되는 것으로 알려져 있다(Gupta *et al.*, 2018).

위장관 내 장내 미생물 총은 숙주와 공생하면서 장 건강에 중요한 역할을 하며(Ringø *et al.*, 2003; Round & Mazmanian, 2009), 몇 가지 복잡한 메커니즘으로 장내 미생물 총을 조절하여 면역을 증가시킨다. 장 건강을 향상시키는 과정에서 장내 유익한 세균의 증가는 장내 환경을 조절하고, 유해균 총을 억제한다. 유산균은 phylum *Firmicutes*, class *Bacilli* 및 order *Lactobacillales*로 분류되며, 그람양성(Gram-positive), 비내포성, 막대모양 또는 구균형태를 가지며 catalase 및 산화 효소는 대부분 음성을 띈다(Gupta *et al.*, 2018). 유산균의 최적 성장은 일반적으로 pH 5.5~5.8 이며, 복잡한 영양 요구 사항이 있고, homofermentative와 heterofermentative로 나뉘게 된다. homofermentative는 당에서 젖산을 생산하는 반면, heterofermentative는 젖산, 아세트산 또는 알코올, 이산화탄소를 생산한다. 유산균은 박테리오파지, 과산화수소, 다이아실 등과 같은 성장 억제 물질을 생산하여 식품에서 병원성 및 부패 박테리아의 증식을 방지한다(Alakomi *et al.*, 2000; De Vuyst & Leroy, 2007). 특히, 소화관에서 병원체의 부착 및 군집화를 억제하여 유해균 총의 수를 조절하며(Li & Webster, 2018), 장내 독소 농도를

줄이고 탄수화물 대사를 개선하여 2형 당뇨병에 대한 저항성을 키울 수 있는 것으로 보고되었다(Kim *et al.*, 2018b). 그리고 균형화 된 미생물 총에 의해 식품에 함유된 복잡한 구조의 폴리페놀을 쉽고 단순하게 페놀 화합물로써 변화시켜 흡수가 잘 되도록 해 질병, 특히 암 예방 및 치료에 효과가 있는 것으로 나타났다(Thilakarathna *et al.*, 2018).

탄수화물 대사를 통한 유산균의 발효는 주요 대사 최종 산물인 젖산을 생산한다(Abdel-Rahman *et al.*, 2013). 젖산 축적은 산성 조건으로의 pH 변화로 인해 유산균의 성장을 억제하고, 세포질의 산성화와 양성자 조절을 하여 유산균 발효를 중지시키는 작용을 한다(Wee & Lee, 2006). 젖산의 농도가 증가하거나 배지의 pH가 감소하면 배지에서 해리되지 않은 젖산의 농도도 증가되어(Broadbent *et al.*, 2010) 세포질 막 확산을 통해 박테리아 막을 통과하여 세포 내부에서 해리된다. 따라서 세포막 pH가 유산균의 성장 및 발효에 큰 영향을 준다. 다시 말해 세포 성장을 억제하고 생성물 형성 활성을 감소시키는 기질 및 생성물의 밸런스는 발효에 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있다(Hujanen *et al.*, 2001; Serrazanetti *et al.*, 2013; Yuwono *et al.*, 2008). 세포 대사 및 증식에 대한 젖산의 억제 효과는 중간 삼투압의 증가 및 억제 효과를 유발하는 아세트산, 포름산 또는 포름산 나트륨과 같은 기타 발효 부산물의 축적이 유산균의 성장을 기하급수적으로 증가되는 것을 방지할 수 있다(Cui *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2008).

유산균을 이용한 발효는 영양소의 흡수를 돕고, 본래 발효 전 물질이 가지고 있는 특성을 변화시켜 발효 시 체지방감소 및 비만억제에 대한 효과를 보고한 바 있다(Hong *et al.*, 2015). 그 중에서도 특히, *Lactobacillus casei*는 녹차 추출물과 함께 발효 시 고지방식이 섭취 마우스의 혈청 중성지방 및 콜레스테롤 수치를 낮추는 것으로 보고되었다(Wang *et al.*, 2018a). 이처럼 유산균을 이용하여 추출물을 발효시킨다면 지방분해 및 비만억제에 효과가 있는 것을 알 수 있다.

제4절 Hedgehog pathway

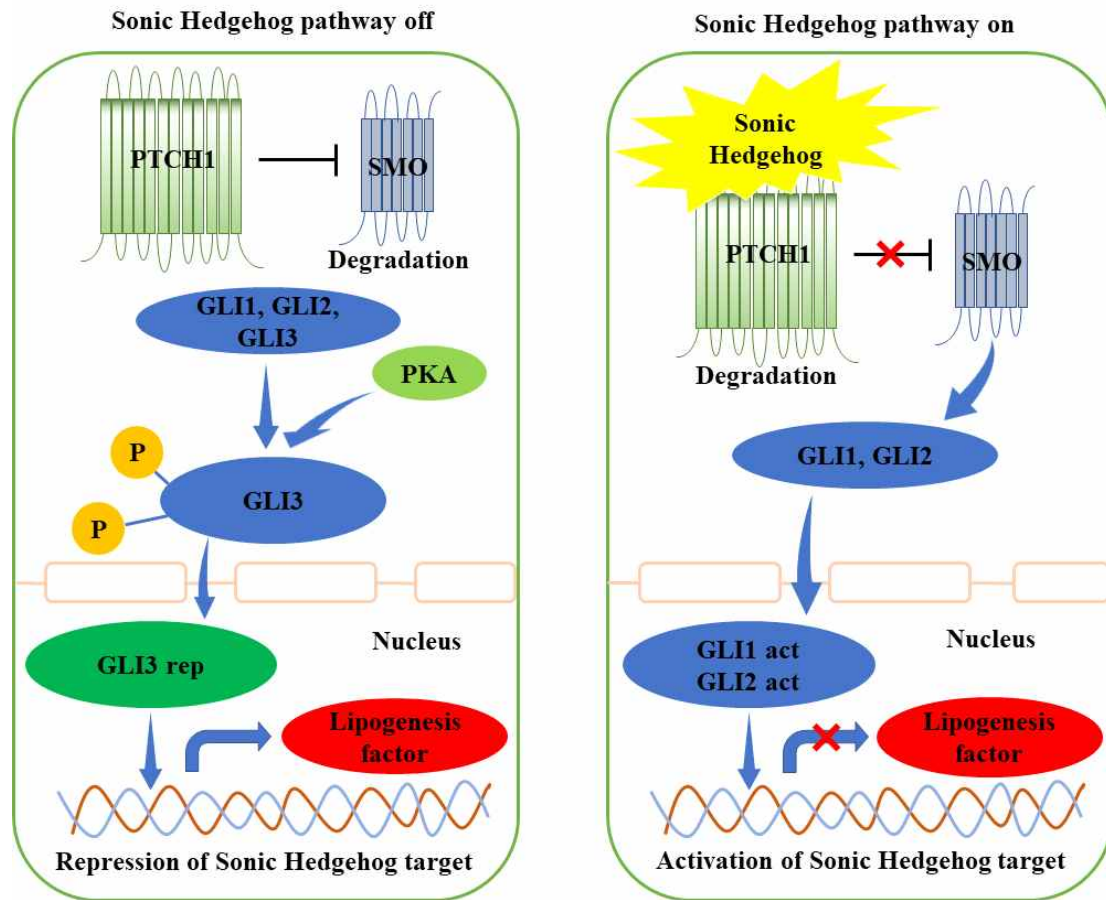
Hedgehog 신호는 고슴도치 형태의 리간드에서 붙여진 이름으로 이 신호를 억제하여 암세포를 제어하는 암세포 저해 실험 위주의 연구가 이루어졌다(Zeng *et al.*, 2014). Hedgehog 신호는 줄기세포 및 분화형질을 발현하지 않은 미분화 세포인 전구세포의 주요 증식 신호 전달 체계로 세포에서 분비되면 세포 표면의 수용체 단백질과 결합하여 세포내 신호 전달 체계를 작동시킨다. 이때 발현되는 glioma-associated oncogene homologue 1, 2 (GLI1, 2) 단백질은 glioma-associated oncogene homologue 3 (GLI3) 단백질과 함께 Hedgehog 신호의 리간드를 생성시키고 활성화시킨다(Grzelak *et al.*, 2015; Tolosa *et al.*, 2020).

Hedgehog 신호는 세포의 재생 및 항상성뿐 아니라 포유류의 거의 모든 기관의 조직 생성에 중요한 역할을 한다(Varjosalo & Taipale, 2008). 일부 암세포에서는 세포의 증식에 영향을 미치기 때문에 신호 억제제의 개발이 주 연구소재로 이용되었다(Varjosalo & Taipale, 2008). 척추동물 Hedgehog 신호 전달은 다른 필수 발달 신호 전달 경로와 달리 극도로 특수화된 세포 기관에서 발달되어 있으며, wingless (Wnt), platelet-derived growth factor (PDGF), Sonic Hedgehog (Shh) 및 Notch와 같은 발달세포 또는 줄기세포의 분화에 필요한 신호를 처리하는 중요한 역할을 한다(Hoyos Cadavid *et al.*, 2019; Tolosa *et al.*, 2020).

Figure 1과 같이 Shh 신호는 당 단백질 Shh 리간드가 12-transmembrane protein patched 1 (PTCH1)에 결합하고 비활성화 할 때 발생한다. 리간드가 없으면 7개막으로 구성된 단백질인 smoothened (SMO)의 활성이 PTCH1에 의해 억제되므로 Shh 단백질 결합 PTCH1은 SMO 활성을 조절한다(Hoyos Cadavid *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2019c). SMO는 G protein-coupled receptor (GPCR) 유사 (G 단백질 결합 수용체) 단백질이며

섬모 막으로의 이동하는 glioma-associated oncogene homologue (GLI) 활성화에 필수요소다. Shh 신호에 대한 응답으로 PTCH1이 내재화되고 저해되면 SMO가 PTCH1 억제에 풀어지면서 Shh 신호전달의 시작을 활성화한다(Regl *et al.*, 2004). 이를 역으로 이용하면 SMO는 Shh 신호 전달체계의 억제제로 활용될 수 있다. SMO가 억제되면 GLI의 활성화가 저해되며 이는 특정세포에서의 분화 억제를 초래하게 된다. 실제로 SMO를 타겟으로 한 연구가 진행 중에 있으며, 그 중 SMO 억제제로 알려진 두 가지 약물이 항암제로서 FDA의 승인을 받았다(Rimkus *et al.*, 2016). 반면, 또 다른 SMO 억제제의 과도한 투여는 luciferase의 비활성으로 뼈 성장의 저해를 보고하였다(Kimura *et al.*, 2008).

12-transmembrane protein patched 2 (PTCH2)는 PTCH1과 약 54% 상동성을 공유하는 Shh의 또 다른 수용체지만, PTCH2의 발현과 신호 전달은 PTCH1과 다르며, SMO를 조절하는 것은 PTCH1으로 알려져 있다(Holtz *et al.*, 2013; Levanat *et al.*, 2004). GLI는 표적 유전자의 전사를 시작하는 핵으로 GLI 계열 단백질의 전사를 초래하고, Wnt와 Noggin의 단백질 조절을 유도한다(Hirsinger *et al.*, 1997; Messina *et al.*, 2015). GLI protein (GLI1, GLI2, GLI3)은 Shh에 의존적으로 발현되며 GLI1을 제외하고 GLI2는 주로 활성화 전사 행동을 가지고 있고 GLI3은 주로 비활성의 전사 행동을 가지고 있다(Carballo *et al.*, 2018). 상호 연관성을 살펴보면, GLI2의 비활성은 Shh의 유도 표적 유전자의 발현 감소를 가져왔으며, GLI3의 비활성은 GLI2와 반대로 발현의 증가를 가져온다. GLI1의 비활성의 경우 단독으로 있을 시 유전자의 발현에 영향을 미치지 않지만, GLI2 또는 GLI3의 비활성과 결합 시 감소되었으며, 과발현 시 GLI2, GLI3의 활성을 유도한다(Lipinski *et al.*, 2006). 항암을 타겟으로 연구되던 Hedgehog 신호는 최근 비만을 억제하는 기전으로 연구되어지고 있으며, 일부 보고에서는 GLI를 조절하여 미분화된 지방전구세포를 활성화시켜 비만억제를 유도하는 연구가 진행되고 있다(Ingham *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013).



<Figure 1> A lipogenesis targeting schematic overview of the Sonic Hedgehog pathway.

제5절 연구 목적

Camphor는 예전부터 사용되어졌던 물질로서 여러 가지 효능이 있다. 특히 향균, 항바이러스, 식품 첨가물, 화장품 향료 등으로 사용되고 있지만, 2.0 g 이상의 다량 섭취 또는 장기적인 섭취, 고농도의 흡입은 camphor의 독성으로 인해 뇌 손상, 신장의 세포 파괴, 또는 central serous chorioretinopathy (CSCR, 망막변증)등의 보고가 있으며, 3.5 g 이상 복용 시 사망에 이르게 한다(Chen *et al.*, 2013). 또한, 상용화된 *Salvia officinalis* 오일의 경우 3.2 g/kg 만으로 마취되지 않은 rat를 긴장성 경련을 일으켜 죽음에 이르게 하였는데, 이는 *Salvia officinalis* 오일의 독성으로 camphor와 관련이 있음을 보고한 바 있다(Millet *et al.*, 1981). Camphor는 독성의 문제로 쓰임에 주의를 요하는 물질이다. 이런 문제점이 있음에도 다양한 효능으로 인해 여러 연구가 진행되고 있는데 그 중 비만억제 관련 연구로는 지방구세포 분화 관련 유전자의 발현 조절을 통해 비만을 억제하는 보고가 있다(Park, 2011). 하지만, Hedgehog 신호에 따른 비만억제에 대한 연구는 미미한 실정이다.

Camphor를 함유하는 대표적인 국내 작물로서 국화과의 감국을 들 수 있다. 감국은 천연소재의 작물 중에서 예로부터 술, 차 등으로 함께 섭취해왔던 천연작물로서 주변에서 흔하게 볼 수 있고, 비교적 쉽게 구할 수 있는 천연작물 중 하나이다. 감국을 소재로 한 비만억제 연구로는 감국 추출물을 viscozyme, tnanase와 같은 효소로 처리하여 aglycorn 형태의 플라보노이드로 변화시켜 체내 흡수율을 증대해 체지방을 감소시켰다(Lee *et al.*, 2019a). 그리고 감국 추출물의 ethyle acetate 분획물이 AMPK 신호를 조절해 지방을 감소시킨 연구 등이 있다(Nepali *et al.*, 2018). 또한, 같은 국화과 속하는 산국의 비만억제에 대한 연구로는 산국에서 추출한 에센셜오일이 3T3-L1 세포주의 분화를 억제시켰다(Hwang *et al.*, 2019). 그리고 열수 추출한 산국 추출물이 glycerol 지질대사에 강한 영향을 미치는 glycerol-3-phosphate

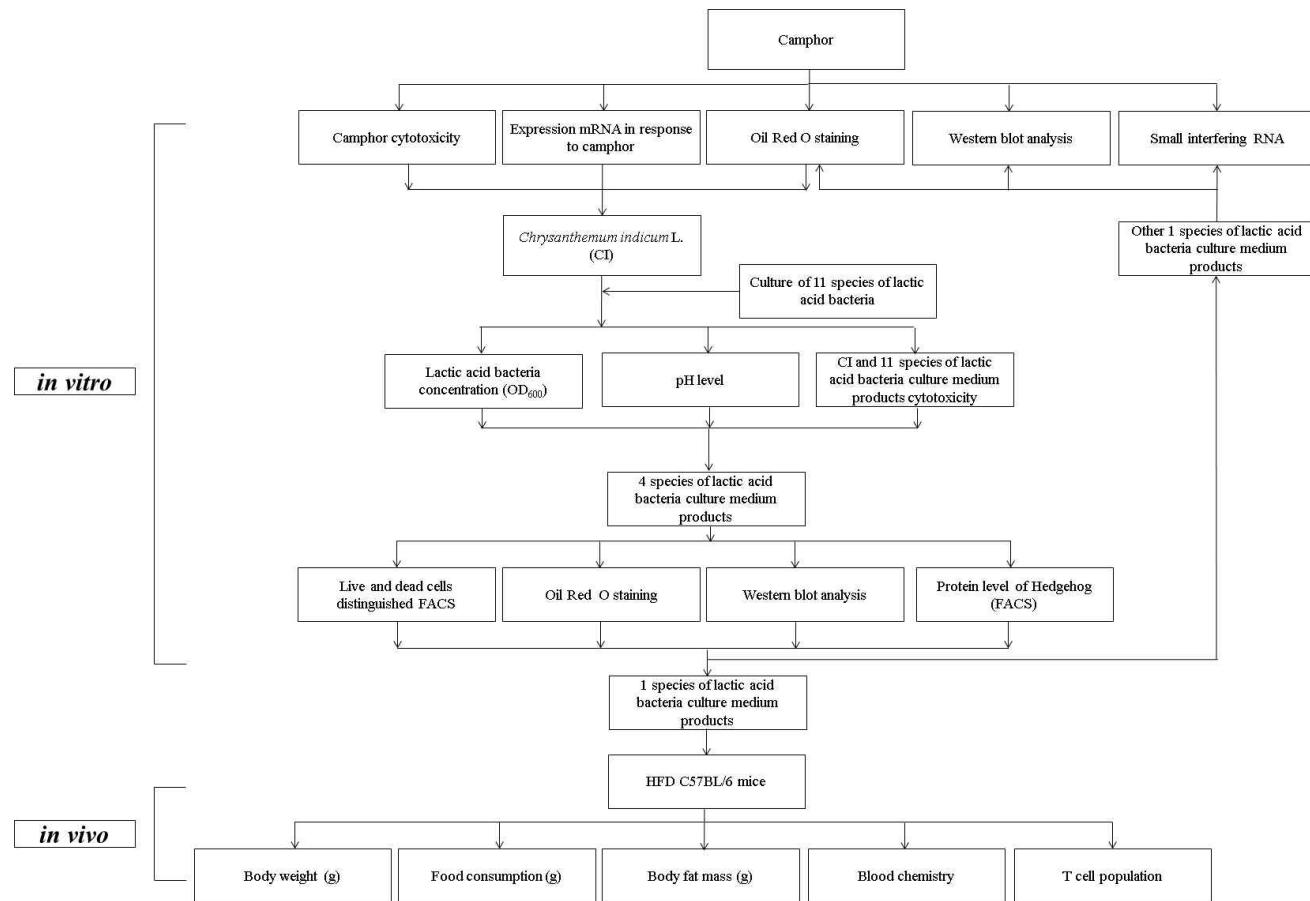
dehydrogenase (GPDH), AMPK와 sirtuin 1(SIRT1)의 활성을 조절해 비만을 억제시킨 연구 등이 있다(Lee & Kim, 2020). 하지만, 감국 추출물의 비만억제 관련 생리활성 연구로서 lipogenesis 신호에 대한 연구는 많이 보고되어 있지만 지방전구세포의 Hedgehog 신호에 관한 연구는 전무한 실정이다.

유산균은 숙주 동물의 건강에 매우 유익한 효과를 주는 균주로서 고혈압, 콜레스테롤 저하, 대장증후군과 같은 위장관 질환과 장내 미생물총을 조절하여 면역체계를 개선시켜 암 예방, 지질대사 개선 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Bhathena *et al.*, 2009; Kim & Lim, 2017; Lye *et al.*, 2009; McFarland, 2009). 특히 비만억제 관련 연구로는 김치에서 분리한 유산균의 비만억제 및 혈중 지질저하 효과(Kwon *et al.*, 2004), *Lactobacillus plantarum* DR7는 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase의 mRNA 발현을 조절하는 AMPK의 phosphorylation을 통해 콜레스테롤을 저해하고(Lew *et al.*, 2018), *Lactobacillus plantarum* Q180는 3T3-L1 세포주에서 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현을 감소시켰다(Park *et al.*, 2018). *Lactobacillus reuteri* 263은 지방조직의 에너지 대사 시스템을 조절하여 비만을 억제하는 연구가 발표되었다(Chen *et al.*, 2018b).

유산균은 식품발효에도 많이 사용되는 균주로서 각종 식품에 많이 이용되고 그에 따른 효능을 발표하고 있다. *Lactobacillus casei* L16으로 산양유를 발효시켜 향산화 효능의 증가를 확인했으며(Shu *et al.*, 2018), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*에 의해 발효된 파파야 주스에서는 향산화, 유기산, 휘발성 물질의 증가를 확인했다(Chen *et al.*, 2018c). 또한, *Lactobacillus rhamnosus* GG는 메밀의 발효기간 동안 기타 미생물의 증식을 억제했다(Matejčková *et al.*, 2017). 이렇듯 유산균 발효를 통해 식품의 품질 향상에 대한 연구는 많지만, 비만에 직접적인 연관이 있는 lipogenesis 신호와 유산균과 유산균 발효를 통해 Hedgehog 신호를 타겟으로 하는 연구는 부족한 상황이다.

Hedgehog 신호는 암세포 분화억제와 관련된 연구가 주를 이루고 있으며, 암의 치료를 목적으로 개발되는 제약의 기반으로 그 효과가 매우 강력하다. 기존의 비만억제 관련 연구를 살펴보면, 대부분 lipogenesis 신호에 초점이 맞추어 지고 있다. 하지만, Hedgehog 신호는 lipogenesis 신호를 상회하는 세포 신호전달체계로서 그 효과가 더 강력하다.

따라서 본 연구에서는 천연작물을 기반으로 작물이 함유하고 있는 기능성 성분을 유산균 발효라는 매개체를 통해서 체내 흡수를 효율적으로 하고, lipogenesis 신호보다 상회하는 Hedgehog 신호를 타겟으로 비만억제 치료제를 개발하기 위한 기반을 마련하고자 한다. 이를 위해 Figure 2와 같은 순서로 감국이라는 천연소재의 Hedgehog 신호에 대한 유전자 및 단백질 발현과 유산균으로 발효시킨 감국 배양액과의 Hedgehog, 지방구세포 분화 관련 유전자 및 단백질 발현을 비교 분석을 진행, 비만억제에 대한 그 효과를 입증하고자 한다.



<Figure 2> Schematic diagram of the experiment.

제2장 실험 재료 및 방법

제1절 Camphor에 대한 독성연구와 유전자 조절 분석

1. 단일물질

비만억제 효과가 있는 것으로 알려진 몇 가지 단일 물질 중 camphor를 확인(Uchida *et al.*, 2018)하였고, camphor (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)를 구매하여 본 실험에 이용하였다.

2. 세포분화 및 분화된 세포주의 세포독성

3T3-L1 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 Cyto-X (LPS Solution, Daejeon, Korea)시약으로 세포의 독성테스트를 진행하였다. 3T3-L1 세포주를 96 well plate (SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 1×10^4 세포수로 10% bovine calf serum (BCS, Welgene Inc., Gyeongsan, Korea), 1% penicillin streptomycin (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany)를 사용하여 37℃, 5% CO₂조건의 incubator (WS-180CA, World Science, Bucheon, Korea)에서 배양하였다. 12시간 배양한 뒤 camphor를 500 mM부터 연속희석법으로 처리한 후 배양 24시간 후 각 well에 10% (v/v) 농도로 Cyto-X 시약을 첨가한 뒤 알루미늄 호일로 밀폐하여 4시간 동일 조건으로 배양 후 450 nm 흡광도 (SpectraMax i3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에서 측정하였다.

3. 세포분화 및 Oil Red O 염색

3T3-L1 세포주를 32 well plate (SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 3.5×10^5 세포수로 10% BCS, 1% penicillin streptomycin가 함유된 DMEM배지에 배양 후 95% 세포배양이 완료된 후 10 $\mu\text{g/mL}$ insulin (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA), 0.1 mM dexamethasone (DEX, Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)가 포함된 10% fetal bovine serum (FBS, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) 분화 배지로 교환하여 2일간 배양하였다. 2일마다 10 $\mu\text{g/mL}$ insulin이 포함된 10% FBS배지로 교환하며 camphor을 250 mM로 처리한다. 10일간 배양을 유지하며 Oil Red O (ORO, Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA) 염색 후 3T3-L1 세포주를 현미경(Olympus CKX53, Olympus, Tokoy, Japan)으로 관찰하였다.

4. Quantitative RT-PCR

3T3-L1 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 4.5×10^5 세포수로 12시간 배양한 뒤 camphor를 250 mM로 처리한다. 세포를 수집하여 3T3-L1 세포주로부터 Easy-Blue reagent (iNtRON Biotechnology Co., Seoul, Korea)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 M-MLV RTase (Promega, Madison, WA, USA)와 Random primer (Promega, Madison, WA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하고 SYBR Green Real time polymerase chain reaction (PCR) Master Mix (Roche, Mannheim, Germany)와 LightCycler system (Roche, Mannheim, Germany)을 사용하여 qPCR을 수행하였다. 모든 유전자 발현 정도는 glyceral-dehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*)의 발현값으로 보정하였다. qPCR 분석에 이용되는 primers는 Table 1에 표기하였다.

<Table 1> Primers sequences for quantitative real-time PCR analysis.

Target gene	Primer	Sequence
<i>Pparγ</i>	Forward	5'-GGAAGACCACTCGCATTCCTT-3'
	Reverse	5'-GTAATCAGCAACCATTGGGTC-3'
<i>C/ebpa</i>	Forward	5'-GCAGCCACTTGAGTTCTCAGG-3'
	Reverse	5'-GATGTAGGCGGAGAGGTCGAT-3'
<i>Gapdh</i>	Forward	5'-AGCTTCGGCACATATTTTCATCTG-3'
	Reverse	5'-CGTTCACTCCCATGACAAACA-3'
<i>Adipoq</i>	Forward	5'-GAAGCCGCTTATGTGTATCGC-3'
	Reverse	5'-GAATGGGTACATTGGGAACAGT-3'
<i>Smo</i>	Forward	5'-CAGCAAGATCAACGAGACCA-3'
	Reverse	5'-GCTGAAGGTGATGAGCACAA-3'
<i>Gli1</i>	Forward	5'-ACTGGGGTGAGTTCCCTTCT-3'
	Reverse	5'-TGGCAGGGCTCTGACTAACT-3'

Pparγ: Peroxisome proliferator-activated receptor-γ, *C/ebpa*: CCAAT/enhancer-binding protein-α, *Gapdh*: Glyceral-dehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Adipoq*: Adiponectin, *Smo*: Smoothed, *Gli1*: Glioma-associated oncogene homologue 1.

제2절 감국 유산균 배양액 제조

1. 감국 추출물의 제조

감국의 꽃잎 부분은 서울 경동시장에서 구입하여 본 연구의 시료로 사용하였다. 감국 850.2 g을 상온에서 48시간 80% ethanol (Duksan Reagents, Ansan, Korea) 2,000 mL에서 추출하였다. 추출물은 filter paper (NO. 2, Whatman, Little Chalfont, UK)에 여과 후 45℃에서 감압, 농축 및 동결건조(MCFD8518, Ilshin Bio Base, Dongducheon, Korea) 하여 감국 동결 건조분 115 g을 얻었다.

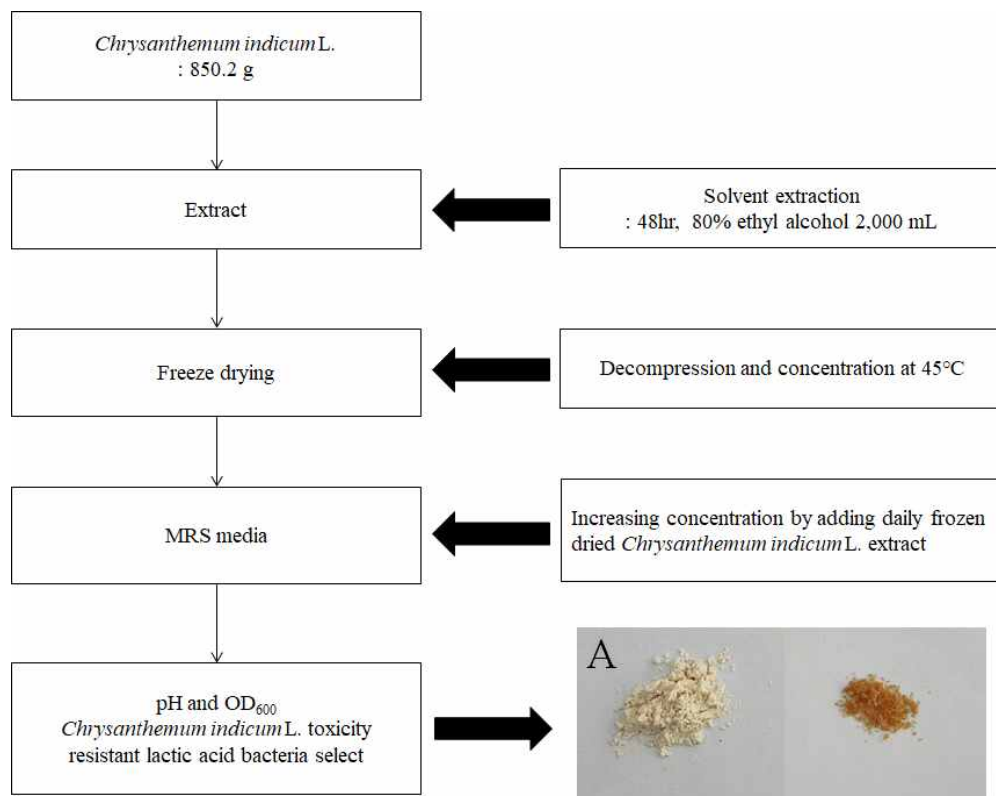
2. 실험 미생물 및 배양

본 연구에 사용된 유산균 11종(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3034, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3718, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074, *Lactobacillus casei* KCTC 3109, *Lactobacillus brevis* KCTC 3498, *Lactobacillus kitasatonis* KCTC 3155, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594, *Lactobacillus fermentum* KCTC 3112)은 공시균주로서 생물자원센터(KCTC, Jeongeup, Korea)에서 분양 받아 실험에 이용하였다.

균주는 MRS (Conda Pronadisa, Madrid, Spain) 배지에 37℃의 온도에서 24시간 정치 배양, 동정해 이를 각각의 stock으로 제조해 본 연구에 사용하였다.

3. 감국 추출물을 활용한 유산균 배양액 제조

감국 추출물에서 유산균을 발효시키기 위해 MRS (Conda Pronadisa, Madrid, Spain) 액체배지와 혼합하고(1,000 mL)를 11종의 유산균을 각각 접종하였다. 하지만, 감국 추출물에 배양균과 배지를 동시에 처리 시 유산균이 죽고, 발효가 안 되는 문제점이 발생하여 감국 동결 건조분(40 g)을 유산균 자란 배지에 20% (v/w)의 비율로 섞어 유산균을 감국 동결 건조분 함유 배지에 적응시켰고, 37℃의 온도에서 96시간, 회전배양으로 진행, 발효의 적절성을 위해 pH (HI99181N, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA)와 발효기간에 따른 유산균의 증식을 OD₆₀₀값(SpectraMax i3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)을 기준으로 측정, 관찰하였다. 배양액 제조과정은 Figure 3의 과정으로 진행하였으며 최종발효 된 감국 유산균 배양액은 동결 건조 후 실험에 이용하였다. 미분화된 세포는 BSC, 분화 유도된 세포는 MDI, 감국 추출물 처리군은 CI, 각 유산균으로 발효된 감국 배양액 처리군은 유산균의 KCTC의 숫자로 표기하였다.



<Figure 3> Lactic acid bacterial culture medium process of *Chrysanthemum indicum* L. (CI) extract and resistant strain manufacturing method.

A. Lactic acid bacterial culture medium powder of *Chrysanthemum indicum* L. extract.

제3절 3T3-L1 세포주의 세포배양

1. 세포배양 및 세포독성

3T3-L1 세포주를 96 well plate에 1×10^4 세포수로 10% BCS, 1% penicillin streptomycin 이 함유된 DMEM를 사용하여 37℃, 5% CO₂조건의 incubator (WS-180CA, World Science, Bucheon, Korea)에서 배양하였다. 12시간 배양한 뒤 감국 추출물과 감국 배양액을 250, 500 및 1,000 ppm으로 처리한 후 배양 24시간 후 각 well에 10% (v/v) 농도로 Cyto-X 시약을 첨가한 뒤 알루미늄 호일로 밀폐하여 4시간 동일 조건으로 배양 후 450 nm 흡광도(SpectraMax i3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에서 측정하였다.

2. 3T3-L1 세포주의 세포분화 및 Oil Red O 염색

3T3-L1 세포주를 32 well plate에 3.5×10^5 세포수로 10% BCS, 1% penicillin streptomycin가 함유된 DMEM배지에 배양 후 95% 세포배양이 완료된 후 10 µg/mL insulin, 0.1 mM DEX, 0.5 mM IBMX 가 포함된 10% FBS 분화 배지로 교환하여 2일간 배양하였다. 2일마다 10 µg/mL insulin이 포함된 10% FBS배지로 교환하며 감국 추출물과 감국 배양액을 1,000 ppm으로 처리한다. 10일간 배양을 유지하며 Oil Red O 염색 후 3T3-L1 세포주를 현미경(Olympus CKX53, Olympus, Tokoy, Japan)으로 관찰하고 isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 용출시켜 SpectraMax i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에서 510 nm로 확인한 뒤 실험을 종료하였다.

제4절 Western blot analysis

3T3-L1 세포주를 60 mm 세포배양 접시(SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 4.5×10^5 세포수로 12시간 배양 후 감국 추출물과 감국 배양액을 1,000 ppm로 24시간 처리하여 세포를 수집하였다. RIPA lysis buffer (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)에 phosphatase inhibitor cocktail (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)과 protease inhibitor cocktail (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)을 1×로 섞어 1시간 동안 얼음에서 lysis 후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리기(Smart R17 Plus, Hanil, Daejeon, Korea)에서 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 상층액을 회수하여 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 활용해 정량 후 10~25 µg의 단백질을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel method를 이용하여 전기영동 하였다. Gel transfer된 단백질을 1×phosphate-buffered saline (PBS, LPS Solution, Daejeon, Korea) buffer 1,000 mL과 Tween20 (USB Corp., Cleveland, OH, USA) 1 mL를 섞어 만든 PBS-T에 5% skim milk (KisanBio, Seoul, Korea)를 1시간 동안 blocking한 뒤 1차 항체를 각 1:1,000의 농도로 12시간 4℃의 냉장실에 처리하였다. PBS-T로 3회 세척한 뒤 2차 항체를 각 1:5,000의 농도로 실온에서 처리한 뒤 다시 PBS-T로 3회 세척 후 Amersham enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)를 이용하여 발색을 측정하였다. 항체는 anti-p21, anti-p-Akt, anti Akt, anti-PTEN, anti-C/EBPα anti-p-p38 MAPK, anti-p-AMPKα, anti-PPARγ (BioVision, Milpitas, CA, USA), anti SMO, anti-AMPK1, anti AMPK, anti-pACC, anti-FAS, anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) 및 anti-GLI1, anti-GLI2 (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA)를 이용하였다.

제5절 FACS 기기분석

1. 3T3-L1 세포주의 분화도 측정

3T3-L1 세포주의 독성테스트를 위해 1.5×10^5 세포수로 준비 후 감국 추출물 및 배양액을 1,000 ppm으로 처리한다. pH 7.4 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) 로 1회 세척 후 DPBS, 0.5% bovine serum albumin (BSA, Amresco, Solon, OH, USA), 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)로 만든 fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer 500 μ L에 LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)시약 5 μ L를 첨가하여 30분간 얼음에서 염색하였다. 이후 FACS buffer로 1회 세척 후 Attune ® FACS machine (Life Technologies, Darmstadt, Germany)을 이용하여 635 nm excitation 파장에서 분석하였다.

2. GLI1 단백질 FACS 분석

분화된 3T3-L1 세포주의 GLI1 단백질 발현을 분석하기 위해 1.5×10^5 세포수로 준비 후 camphor는 250 mM, 감국 추출물, 감국 배양액은 1,000 ppm로 처리한다. 4일 분화유도 후 pH 7.4 DPBS 로 1회 세척 후 DPBS, 0.5% BSA, 0.1% sodium azide로 만든 FACS buffer 500 μ L에 0.1% (v/v) 농도로 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 조제하여 15분간 permeabilization 시켰다. FACS buffer로 1회 세척 후 GLI1-fluorescein isothiocyanate (FITC conjugate) antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)로 1시간 염색하였다. FACS buffer로 1회 세척 후 Attune ® FACS machine (Life Technologies, Darmstadt, Germany)을 이용하여 490 nm excitation, 520/20 nm emission 파장에서 분석하였다.

제6절 Small interfering RNA 유전자 조절 분석

3T3-L1 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 3.5×10^5 세포수로 24시간 배양한 뒤 serum free DMEM에 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 20 μ L 와 15 pmol *Ptch* siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 또는 15 pmol *Smo* siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 6 μ L를 혼합하여 transfection 하였다. 대조구는 control siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였다. 12시간 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환한 뒤 48시간 동안 추가 분화 유도하였다.

제7절 동물실험

1. 실험동물 입수 및 군 구성

동물실험은 동물보호법(제정 1991년 5월 31일 법률 제 4379호, 일부 개정 2019년 8월 27일 법률 제 16544호)에 근거한 (주)케이피씨의 동물실험윤리위원회에 의해 승인 후 실험을 진행하였다(승인번호: P202006). Orient Bio Inc.에서 구입한 다수의 연구에서 고지방식이를 통한 비만 모델이 체중 조절이나 지방간 형성 기전 연구에 적합한 모델이라고 알려져 있는 C57BL/6 mice (Orient Bio Inc., Seongnam, Korea) 수컷 42마리 6주령을 구매 후 1주일간의 검역·순화 기간을 거치며 건강 및 실험의 실시에 적합성 여부를 확인하여 건강한 동물을 선별하였다. 순화 기간 중에는 입수 시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체 표시(tail marking)를 하고, 사육상자에는 검역·순화 기간 중 임시 개체식별카드(실험명, 개체 번호, 입고 시기)를 부착하였다. 군 분리 시에 동물의 꼬리에 검정색 유성펜을 이용하여 개체 표시를 하고 각 사육상자에 개체식별카드(실험명, 군 정보, 개체 번호, 성별, 입고 시기, 투여 기간)를 부착하였다. 군 분리 후 정상 동물군을 제외한 모든 군에 고지방사료를 제공하였다. 고지방사료의 정보는 5.24 kcal/g with 60% of fat, 20% of protein and 20% of carbohydrate-derived calories를 포함하고 있으며 Reserarch Diets Inc.의 제품(Reserarch Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA)을 사용하였다. 급이 방법은 급이기에 60% high fat diet (HFD)를 넣어 자유섭취 시켰다. 상수도수를 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하고, 폴리카보네이트 재질의 음수병(250 mL)을 이용하여 자유섭취 시켰다. 군구성에 따른 정보는 Table 2에 첨부하였다.

<Table 2> The experimental C57BL/6 mice models.

Group	High fat diet	Test article	Dose frequency	Dose (mg/kg)	Vol. (ml/kg)	Head
				0~8 Week		
G1	X	Vehicle	QD	-	10	5
G2	O	Vehicle	QD	-	10	8
G3	O	GC (Control)	QD	400 mg/kg	10	8
G4	O	CI (Test 1)	QD	300 mg/kg	10	8
G5	O	CILL (Test 2)	QD	300 mg/kg	10	8

2. 실험물질 제조 및 투여

2.1. 포도당 배지 제조

C57BL/6 mice에게 섭취하기 MRS 배지에서 포도당 배지로 교체하였다. 포도당 배지는 tryptone (LPS Solution Daejeon, Korea) 2%, yeast extract (LPS Solution Daejeon, Korea) 0.5%, D-glucose monohydrate (LPS Solution Daejeon, Korea) 1%의 비율(w/v)로 생수(Suksu, HITEJINRO, Cheongju, Korea) 1,000 mL에 용해시킨다. 용해된 혼합물을 121℃에서 15분간 auto clave (SH-AC-60M, Samheung, Seoul, Korea)에서 멸균 후 사용하였다.

2.2. *Lactococcus lactis* 접종

*Lactococcus lactis*를 본 실험의 균주로 사용하였다. 포도당 배지 50 mL에 *L. lactis*를 접종하여 37℃의 온도에서 48시간 회전 배양으로 전 배양을 시킨 후 포도당 배지 1,000 mL에 전 배양된 균주를 접종 37℃의 온도에서 96시간, 회전 배양으로 진행시켰다.

2.3. 균주 배양액과 감국 추출물 접종

96시간 배양시킨 균주 배양액 200 mL에 동결건조를 진행한 감국 추출물 3.75 g을 멸균한 생수 50 mL에 희석시킨다. 균주 배양액 200 mL에 감국 추출물의 희석액 25 mL을 접종 후 37℃의 온도에서 24시간, 회전배양으로 발효를 진행하고 다시 감국 추출물 희석액을 25 mL 투입해 37℃의 온도에서 96시간 발효 후 동결건조 시켜 감국 *L. lactis* 배양액(CILL)을 완성시켰다.

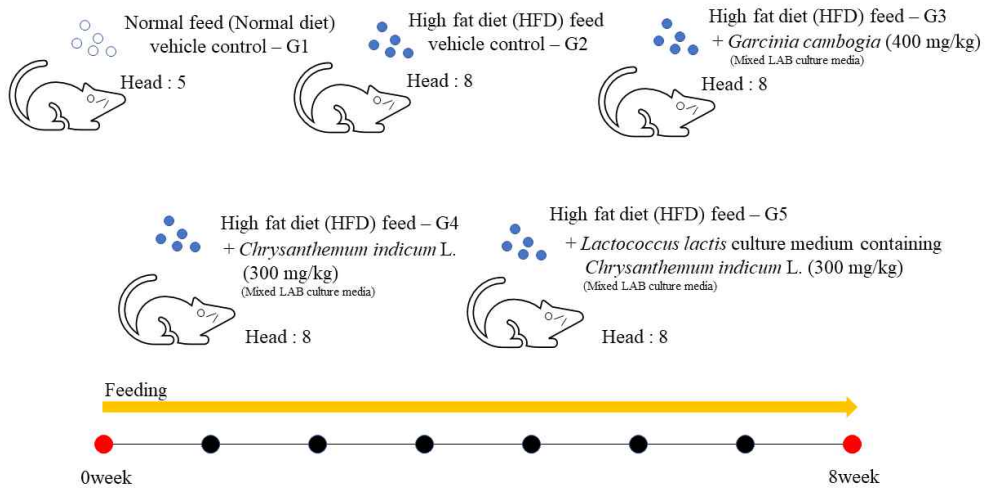
2.4. 실험 대조물질 및 감국 추출물 제조

대조물질로서 *Garcinia cambogia* (GC)를 메디오젠(MEDIOTEN, Chungju, Korea)에서 구매하여 사용하였으며, 감국 추출물은 동결건조 후 실험의 공정성을 위해 각 3.75 g, 50 mL 생수에 희석시킨 후 포도당 배지 200mL에 희석하여 동결건조 후 GC, 감국 추출물(CI)을 완성하였다. 각 군은 일반군은 G1, 비만유도군은 G2, 비만유도군 중 GC 섭취군은 G3, CI 섭취군은 G4, CILL 섭취군은 G5로 표기하였다.

2.5. 실험물질 투여

대조물질을 free form으로 계산하여 칭량하고, 칭량한 물질에 부형제를 넣은 후 vortexing을 1분간 진행하고, sonication을 20분씩 실시하여 clear 상태가 된 후 투여하였다. 각 실험물질을 free form으로 계산하여 칭량하고, 칭량한 물질에 부형제를 넣은 후 vortexing을 1분간 진행하고, sonication을 20분씩 실시하여 clear 상태가 된 후 투여하였다. 실험물질의 경구 투여로 실험동물이 받는 스트레스를 최소화하기 위해 실험물질 투여 7일전부터 순화 기간 동안 경구 투여용 존데를 이용하여 모든 동물에 음용수를 300 ul/head로 경구 투여하여 경구 투여에 대한 사전 적응 훈련을 실시하였다. 투여액량은 10 ml/kg으로 하고, 개체 별 투여액량은 매주 1회의 측정 체중을 기준으로 산출하였다. 매일 오전에 경구 투여용 존데를 부착한 일회용 주사기(1 mL)를 이용하여 8주간 1일 1회 위 내로 강제 투여하였다. 상수도

수를 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하고, 폴리카보네이트 재질의 음수병(250 mL)을 이용하여 자유섭취 시켰다(Figure 4).



<Figure 4> The C57BL/6 mice experimental set-up.

3. 체중 측정 및 섭취량 측정

모든 동물에 대하여 1일 1회 일반증상을 관찰하고, 1일 2회 빈사 및 사망 동물의 유무를 확인하고 관찰은 투여 1일부터 투여 종료 시까지 실시하였다. 군 분리를 위해 실험물질 투여 개시 전일에 체중을 측정하고, 투여 개시 후 주 1회 체중을 측정하여 이를 기준으로 실험물질 투여액량을 결정하였다. 실험물질 투여가 최종 종료되면 16시간 절식 후 체중을 측정한 다음 부검을 실시하였다. 군 분리 후 주 1회 사육 상자별 사료 섭취량을 측정하고, 체중 측정 전일 사료 급이량을 측정한 후 체중 측정 당일 잔량을 측정하여 사료 섭취량을 계산하였다.

4. 동물의 지방량(body fat mass) 측정

투여 종료일에 body fat mass를 측정하며, 측정시에는 동물을 isoflurane으로 흡입 마취한 후 dual energy X-ray absorptiometry (InAlyzer, Medikors, Seongnam, Korea)를 이용하여 fat mass와 lean mass를 측정하였다.

5. 부검

투여 종료일에 각 군별 음수제공 하에 16시간 절식을 시키고 부검은 개체 순서에 따라 진행했다. 혈액 채취 후 복부 장기에 대해 육안검사를 실시하고, 내부 장기의 이상 유무를 확인하고 간과 복부 지방 조직을 적출하였다. 적출된 간과 복부 지방은 생리식염수로 세척하고 여과지로 수분을 제거한 후 전자저울로 절대 중량을 측정하고, 부검 전 절식 된 체중에 대한 각각의 상대 중량을 산출하였다.

$$\text{Formula: Relative organ weight} = \frac{\text{Organ weight (g)}}{\text{Fasting weight before autopsy (g)}}$$

6. 혈청학적 검사

투여 종료 후 다음날까지 16시간 절식 후 부검을 실시하며, 부검 시 동물을 복대정맥으로 전채혈을 실시하였다. 복대정맥에서 채취한 혈액은 0.6 mL SST tube (Microtainer, Becton Dickinson, NJ, USA)에 담고 혈액을 완전히 굳힌 다음 4℃에서 5,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 혈청을 취하여 1.5 mL tube에 담아 -70℃ 이하의 deep freezer (DF8517, Ilshin Bio Base, Dongducheon, Korea)에 보관하며, 보관된 혈청을 이용하여 혈청 생화학 분석기(Blood chemistry analyzer, AU480, Beckman Coulter, Germany)로 Table 3의 항목들을 측정하였다.

<Table 3> The serum biochemical analysis.

Distinction	Measurement list	Unit
Liver inflammation blood marker	AST (Aspartate aminotransferase)	U/L
	ALT (Alanine aminotransferase)	U/L
Blood lipid profile	T-Chol (Total cholesterol)	mg/dL
	TG (Triglycerides)	mg/dL
	LDL-C (LDL-cholesterol)	mg/dL
	HDL-C (HDL-cholesterol)	mg/dL

7. T 세포 분포 검사

7.1. C57BL/6 mice 혈액 전처리

C57BL/6 mice의 혈액에 동량의 PBS를 처리한 후 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)를 PBS와 동량으로 처리하여 20°C, 20분간, 2,000 rpm, no breaking 조건으로 원심분리를 진행하였다. 층이 분리되면 red blood cell (RBC) 층을 제외하고 모두 분리해 낸 뒤 PBS를 2배를 넣어 20분간, 2,000 rpm, No breaking 조건으로 원심분리한 뒤 pellet에 RBC lysis buffer (BioLegend, San Diego, CA, USA)를 처리하여 반응시킨 후 PBS를 넣어주고 원심분리 후 상층액을 제거한다. 상층액 제거 후 PBS를 이용하여 1회 세척하고 단일세포로 실험에 사용하였다. 실험항체는 PE anti-mouse CD45, PE/Cy7 anti-mouse CD3ε, FITC anti-mouse CD4, APC anti-mouse CD8α (BioLegend, San Diego, CA, USA)와 같다(Table 4).

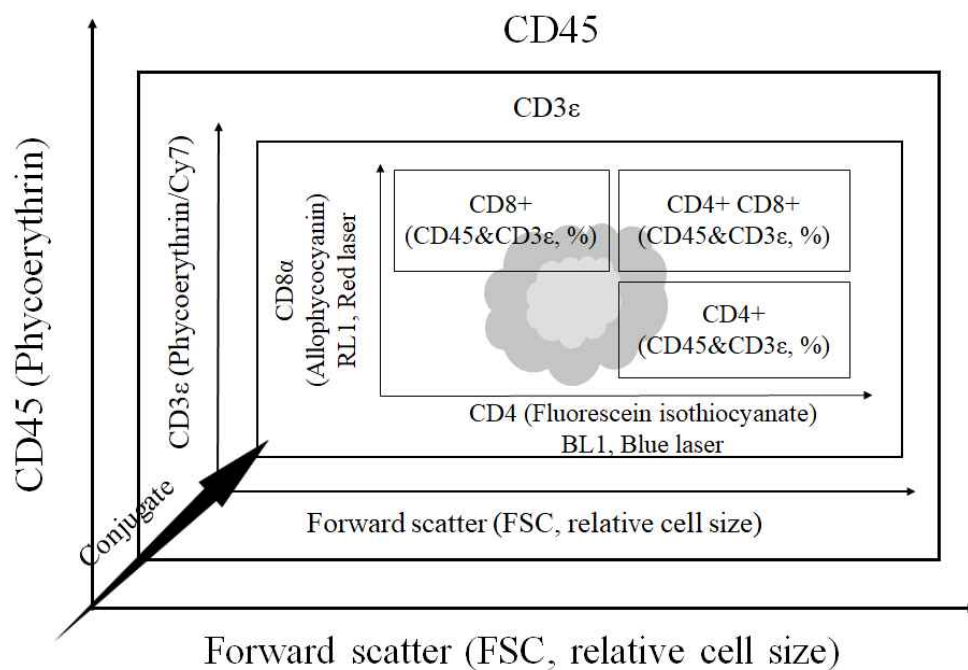
7.2. T 세포 분포도 측정

세포분리 실험방법에 따라 분리된 종양의 단일세포는 각각 Fc blocker를 10분간 전 처리하여 blocking을 한 후 FACS buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA)에 항체를 희석한 후 4°C에서 차광하여 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 세포는 FACS buffer를 이용하여 2회 세척한 후 2% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)를 이용하여 고정하였다. 염색이 끝난 세포는 flow cytometer (Attune NxT flow cytometer, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정된 데이터는 FlowJo™ V10 (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA)를 이용하였으며, 각각의 Th subset은 기재된 marker (CD45 & CD3ε)를 기준으로 하여 분석하였다(Figure 5)

<Table 4> T cell assay antibodies and conjugates.

Sample	Antibody	Conjugate
PBMC	Anti-mouse CD45	PE
	Anti-mouse CD3ε	PE/Cy7
	Anti-mouse CD4	FITC
	Anti-mouse CD8α	APC

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells. PE: Phycoerythrin. PE/Cy7: Phycoerythrin/Cy7. FITC: Fluorescein isothiocyanate. APC: Allophycocyanin.



<Figure 5> T cell experimental set-up.

제8절 통계분석

모든 생리활성 실험은 3회 반복 실험을 통해 수치화했으며, 평균치±표준 편차로 표시하고 SPSS(version 20, IBM SPSS Statistics, Cary, NC, USA)를 이용, 통계분석은 analysis of variance (ANOVA)로 신뢰구간 $p<0.05$ 로 검정을 실시하였으며, 대조군과의 유의차를 확인하기 위해 Dunnett's test 또는 Bonferroni's test를 실시하였다. 통계프로그램은 Graph Pad Prism 5 software (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하였다.

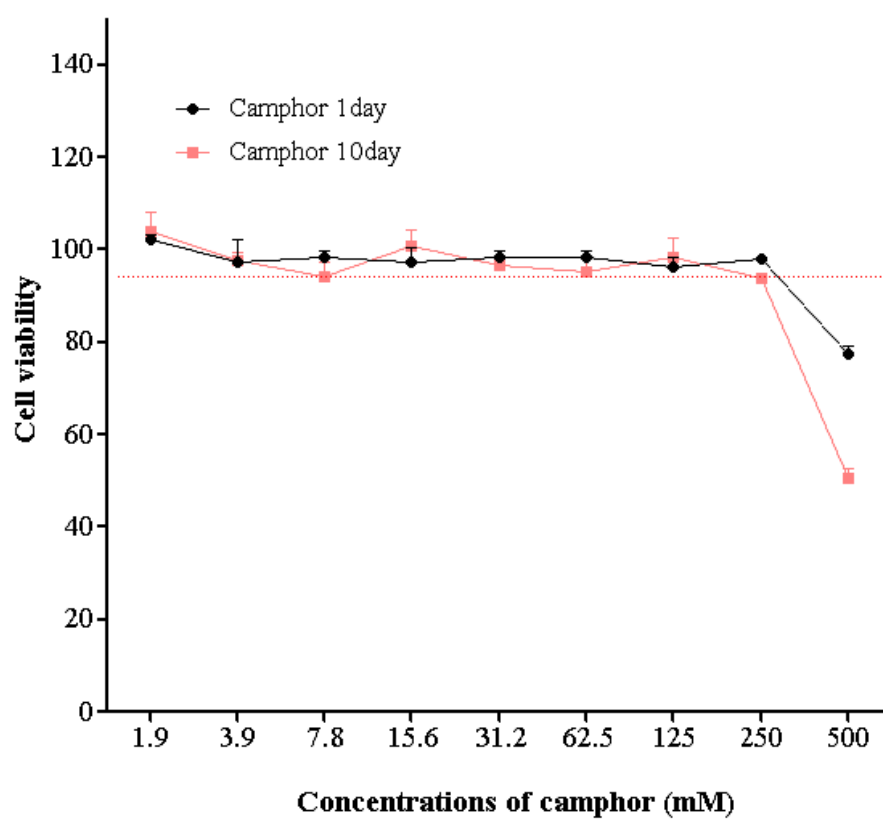
제3장 결과 및 고찰

제1절 Camphor의 세포독성과 mRNA 분석

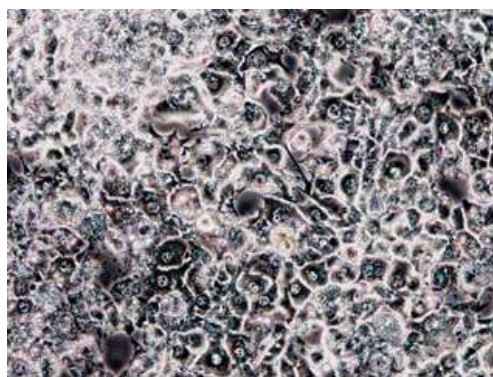
1. Camphor의 세포독성

Camphor는 감국, 뽕나무, 측사 등에 포함된 monoterpene류의 휘발성 정유 성분으로 구조식은 $C_{10}H_{16}O$, 분자량은 152.2이다. Camphor는 소량으로 예전부터 살균작용, 피임약, 수유억제제 등에 이용되어 왔으며, 비만억제 관련 연구로는 lipogenesis 신호의 표적 유전자인 *C/ebpa*, *Ppary*의 발현을 감소시켜 복부지방을 감소시키는 것으로 알려져 있다(Park, 2011). 하지만, 고농도로 흡입 및 섭취 시에 호흡억제 및 전신 발작 등의 독성 증세를 일으키는 것으로 알려져 있다(Theis & Koren, 1995). 따라서 camphor의 실험농도 설정을 위해 세포독성을 확인하였다. Mitochondrial dehydrogenase와 반응하는 WST계열의 시약을 이용하여 세포의 증식률을 측정하였다.

Camphor의 3T3-L1 세포주에 대한 세포독성은 고농도인 500 mM에서도 보이지 않았다(Figure 6). 또한, 3T3-L1 세포주의 분화는 7일 이상 소요되기 때문에 10일까지의 세포독성을 확인한 결과 250 mM 이하의 농도에서 세포독성이 없었다. 분화 5일차 세포모양도 dimethyl sulfoxide (DMSO) 처리된 대조군 대비 세포독성을 보이지 않았다(Figure 7). 본 연구에서 camphor는 500 mM에서 세포내 독성을 보이지 않았으며, 3T3-L1 세포주의 분화 기간인 10일간 처리에도 세포독성을 보이지 않아 250 mM의 세포처리가 적정 농도로 보였다(Figure 6).



<Figure 6> Cell viability at t=1 and t=10 days in response to administration of varying concentrations of camphor.



MDI + DMSO (5day)



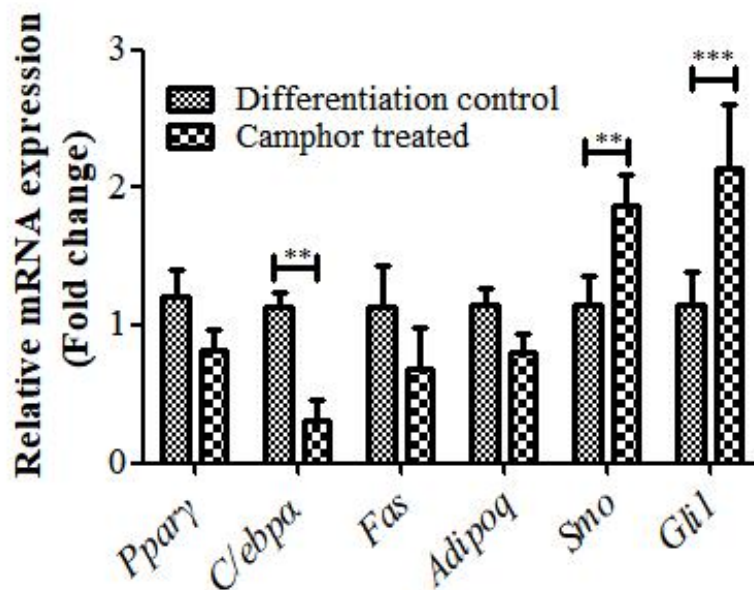
MDI + Camphor (5day)

<Figure 7> MDI-induced differentiation of 3T3-L1 cells in the presence of camphor or DMSO.

MDI, Methyl-isobutyl-xanthine, dexamethasone and insulin.

2. Camphor의 mRNA 분석

Camphor에 대한 비만억제 효과가 있는지를 확인하기 위해 lipogenesis 신호의 타겟과 Hedgehog 신호의 타겟 유전자의 발현을 qPCR을 통해 camphor를 처리하지 않은 세포주와 mRNA 수준을 비교를 하였다. Camphor를 처리하지 않은 세포주에서는 *Ppar γ* 는 1.21 ± 0.20 , *C/ebpa* 1.13 ± 0.10 , *Fas* 1.13 ± 0.30 , *Adipoq* 1.15 ± 0.12 , *Smo* 1.14 ± 0.21 , *Gli1* 1.14 ± 0.24 의 발현을 보였으며, 250 mM 농도의 camphor로 처리한 세포주에서는 *Ppar γ* 는 0.83 ± 0.15 , *C/ebpa* 0.30 ± 0.15 , *Fas* 0.68 ± 0.30 , *Adipoq* 0.81 ± 0.12 , *Smo* 1.86 ± 0.22 , *Gli1* 2.14 ± 0.45 의 발현을 보였다. 또한, *C/ebpa*, *Smo*, *Gli1*에서 두 군과의 유의성을 확인할 수 있었으며, 특히 *Gli1*의 경우 $p<0.001$ 의 유의성을 확인할 수 있었다(Figure 8). 또한, 전체적인 mRNA의 발현 수준에서 camphor를 처리했을 경우 *Smo*, *Gli1*의 증가와 *C/ebpa*의 감소를 확인하였다. 이러한 결과는 camphor가 *C/ebpa*의 발현을 저해시켜 복부의 지방을 감소시킨 선행 연구(Park, 2011)와 일치하며, *Smo*와 *Gli1*의 유전자 발현 증가를 통해 camphor가 *Ptch1*을 조절하는 것으로 추측할 수 있다.



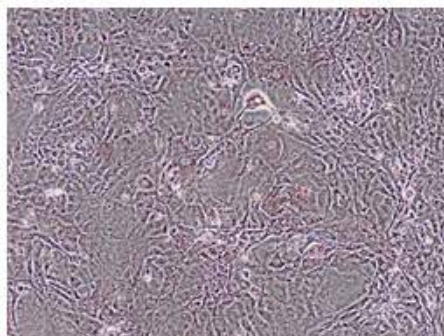
<Figure 8> Relative expression of mRNA in response to camphor. Data are expressed as mean±SD. Significant difference from differentiation control by two-way ANOVA followed by the Bonferroni's test: ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

3. Oil Red O 염색에 따른 지방구세포 분화

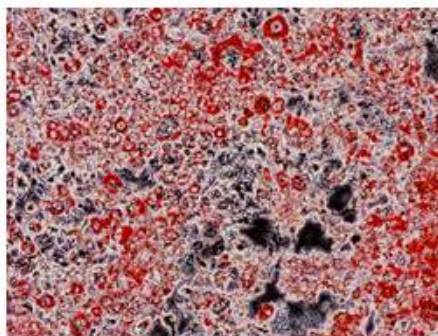
Camphor가 3T3-L1 세포주에 따른 지방구세포 분화 억제를 확인하기 위해 ORO 염색을 진행하였다. Figure 9에서 camphor 250mM의 농도로 처리한 세포주에서 MDI 대비 지방구세포 분화가 억제 되는 것을 확인 할 수 있었다. 선행연구(Ingham *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013)에선 GLI의 활성화를 이용하여 지방전구세포를 조절하여 비만억제 관한 효과가 보고되어지고 있다. mRNA 유전자 발현분석에서 camphor은 *Pparγ*, *C/ebpa*, *Adipoq*, *Fas*와 Hedgehog 신호인 *Smo*, *Gli1*을 조절하였으며, 특히 *C/ebpa*, *Smo*, *Gli1*의 변화가 컸으며, 유의성도 확인할 수 있었다(Figure 8). 따라서 이러한 전사인자가 지방구세포의 분화를 억제하는 것으로 추측할 수 있다.

감국은 천연소재의 작물로서 예전부터 섭취해왔던 작물이다. 2000년부터 2018년까지의 여러 천연작물의 비만억제 효과에 대한 조사 중 감국에서 비만억제 효과의 가능성을 확인하였다(Karri *et al.*, 2019). 특히 감국이 함유하고 있는 대표적인 물질(Oh *et al.*, 2018; Shunying *et al.*, 2005)중에서 camphor를 확인했으며, camphor에 대한 mRNA 유전자 발현 실험결과를 바탕으로 감국이 Hedgehog 신호에 영향을 줄 것으로 사료되어 감국에 대한 추가 연구를 진행하였다. 이와 함께, 감국이 가지고 있는 camphor를 비롯한 폴리페놀의 흡수율을 높이기 위해 식품발효에 주로 사용되는 유산균 11종을 선정, 감국 배양액을 제작하여 Hedgehog 신호 관련 연구를 진행하였다. 또한, camphor에 대한 Hedgehog 신호, lipogenesis 신호에 연관된 단백질의 발현을 비교하기 위해 FACS 기기 분석 및 western blot을 진행하였다.

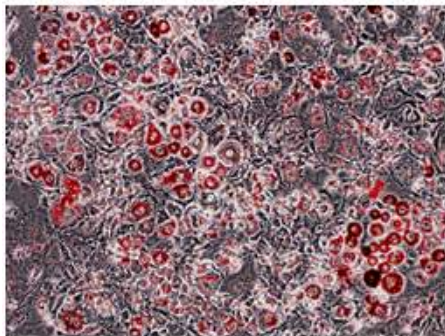
BSC



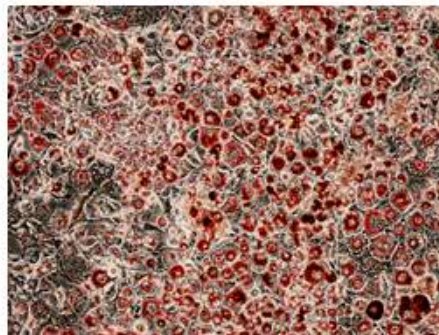
MDI



DMSO



Camphor



<Figure 9> Oil Red O staining of BSC, 3T3-L1 cells treated with camphor.

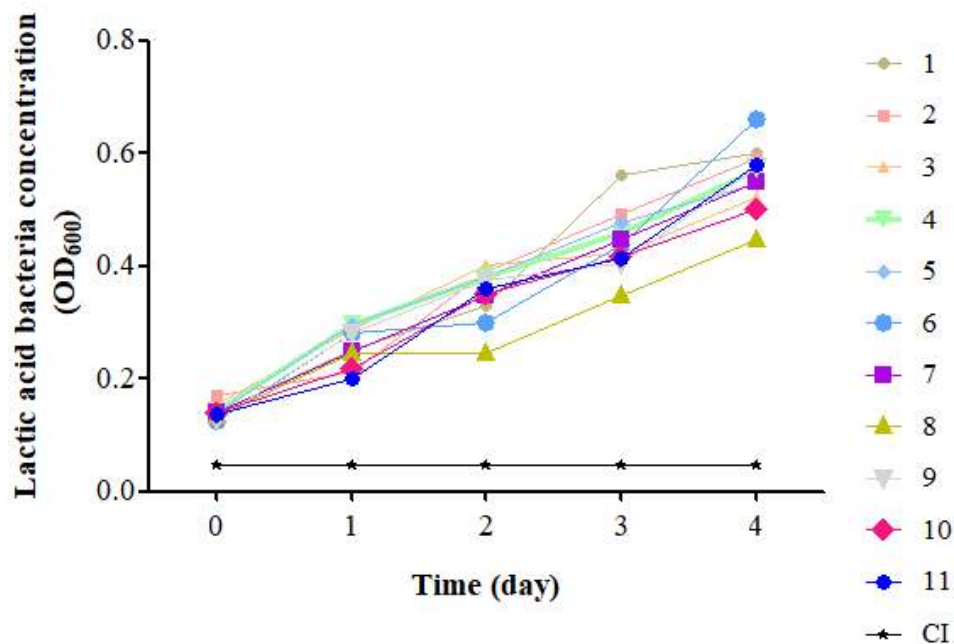
BSC, Undifferentiated cells; MDI, Differentiated cells; DMSO, Dimethyl sulfoxide.

제2절 감국 추출물의 유산균 발효에 따른 유산균 수 및 pH 측정

1. 유산균 수 측정

감국 추출물 및 배양액이 갖는 지방구세포 분화 억제효과를 관찰하기 위해 감국 추출물을 이용하여 저항성 유산균의 제조와 감국 추출물에 저항성을 가진 유산균을 활용한 감국 배양액을 제작하였다. 유산균은 각 군주별로 0일차에 OD₆₀₀값 기준 0.10~0.13으로 접종시켰다. 유산균 발효 시 모든 유산균의 수치가 OD₆₀₀값 기준 평균 1일차에 0.21~0.29, 2일차에 0.30~0.39, 3일차에 0.41~0.56, 4일차에 0.52~0.67로 특히 KCTC 3237, KCTC 3034의 4일간의 변화 값이 각 0.29에서 0.57, 0.25에서 0.6으로 증가하였다. 이는 다른 군에 비해 증식의 속도가 높았으며, KCTC 3498의 경우 다른 군에 비해 4일간의 변화 값이 0.24에서 0.48로 증가가 더디게 나타났다. 그 외에 군들은 전부 0.26에서 0.56으로 증가된 것을 확인하였다(Figure 10).

유산균의 발효는 탄소원을 유산균의 증가 및 생장의 영양원으로 사용하며 사용하고 남은 일부의 탄소원들은 Krebs cycle을 거쳐 생산된 최종 산물(pyruvic acid)을 환원시켜 lactic acid를 생성한다(Liu *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2020). 이렇게 생성된 lactic acid는 총 산도를 증가시키며, pH를 낮춘다. 즉, 유산균의 수가 증가하면 산도가 증가하게 되며 pH는 낮아진다(Kim *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2006). 또한, 일반적으로 증식이 진행되는 과정에서 총 당과 환원당은 하루정도 상승했다가 이후로 점차적으로 감소하게 되는데 이는 유산균이 증식 및 생장을 위해 에너지원으로서 당을 소진하기 때문이다(Reddy *et al.*, 2015). 따라서 유산균 수의 증가는 총 산도의 증가와 총 당 및 환원당의 감소를 추측할 수 있다. 이는 기존의 유산균 발효 연구에서 확인 할 수 있다(Kim *et al.*, 1994; Oh *et al.*, 2020).



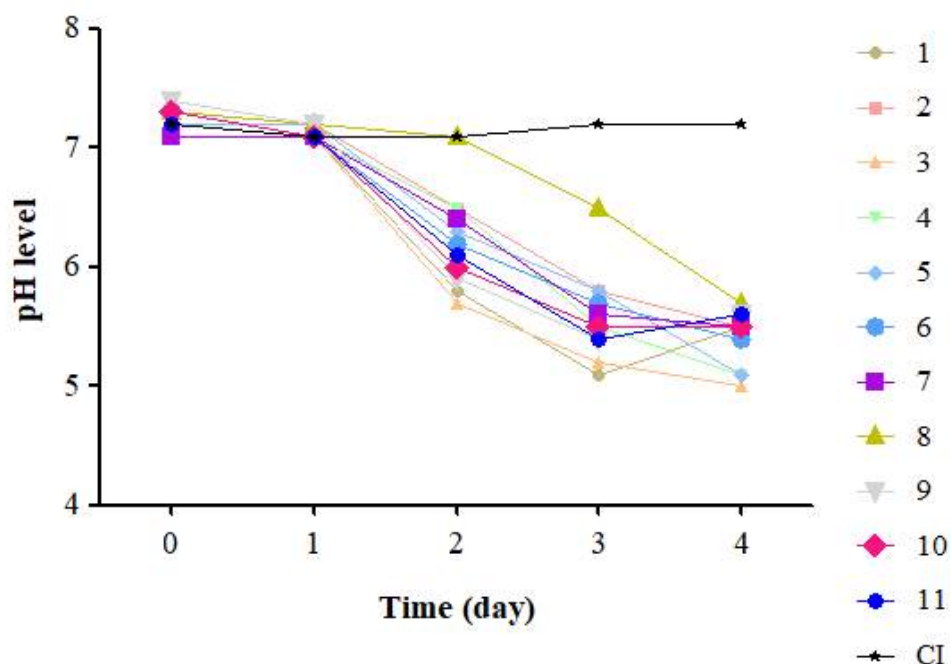
<Figure 10> Lactic acid bacteria concentration calculated by OD₆₀₀.

1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3034; 2, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140; 3, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3718; 4, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237; 5, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115; 6, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074; 7, *Lactobacillus casei* KCTC 3109; 8, *Lactobacillus brevis* KCTC 3498; 9, *Lactobacillus kitasatonis* KCTC 3155; 10, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594; 11, *Lactobacillus fermentum* KCTC 3112; CI, *Chrysanthemum indicum* L..

2. 유산균 발효에 따른 pH값의 변화

pH는 평균적으로 0일차와 1일차에 7.1~7.2, 2일차에 5.8~6.5, 3일차에 5.1~5.5, 4일차에 5.0~5.6으로 변화되었다. 특히 KCTC 3237, KCTC 3115, KCTC 3108은 다른 군에 4일간의 pH 변화 값이 각 7.1에서 5.1로, 7.2에서 5.1, 7.1에서 5.0으로 다른 군에 비해 수치가 빠르게 낮아지는 것을 확인했다. KCTC 3498의 경우 다른 군에 비해 4일간의 pH 변화 값이 7.2에서 5.7로 다른 군에 비해 수치가 더디게 낮아졌다. 그 이외의 군들은 평균 7.0~7.2에서 5.0~5.7로 낮아진 것을 확인하였다(Figure 11). 유산균 발효 과정에서 감국 추출물에 저항성을 가진 유산균으로 적응시키지 않으면 초기 유산균 접종 시 모두 사멸되는 것을 확인하였다. 이는 감국 추출물에 균을 사멸시키는 항균작용이 있는 것으로 판단되며, 이를 극복하기 위해 전배양액(균주 배양액)에 감국 추출물 농도를 전체 배양배지의 5%씩 증가시켜 감국 추출물에 생존하는 저항성 유산균을 제작하였다.

Figure 10, Figure 11의 자료를 바탕으로 감국 추출물에서 11개의 유산균이 발효가 대부분 진행 되었다는 것을 확인할 수 있다. 감국에 대한 항박테리아 활성은 다양한 연구를 통해 이루어졌다. 감국의 정유(오일성분)에서 박테리아를 억제하는 hexokinase, phosphofructokinase 및 pyruvate kinase 등이 박테리아의 억제를 보였고, 이 같은 억제 효과는 유산균에도 적용되는 것으로 보인다(Lin *et al.*, 2019; Rajanna *et al.*, 2019).



<Figure 11> The pH measurement of fermented CI after incubation with lactic acid bacteria.

1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3034; 2, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140; 3, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3718; 4, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237; 5, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115; 6, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074; 7, *Lactobacillus casei* KCTC 3109; 8, *Lactobacillus brevis* KCTC 3498; 9, *Lactobacillus kitasatonis* KCTC 3155; 10, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594; 11, *Lactobacillus fermentum* KCTC 3112; CI, *Chrysanthemum indicum* L..

제3절 세포독성 및 세포분화도 분석

1. 감국 추출물, 배양액의 세포독성

3T3-L1 세포주를 활용해 감국 추출물 및 배양액이 갖는 세포독성을 확인하였다. 세포주의 증식을 억제하는 기전은 다양한 신호를 조절하면서 발생되는데, 그 중 세포독성은 세포독성을 갖는 물질을 세포에 처리 시 세포의 사멸을 유도하기 때문에 매우 중요한 요소이다. 따라서 감국 추출물 및 배양액의 세포주에 대한 세포 사멸효과를 확인하기 위해 미토콘드리아에서 배출되는 mitochondrial dehydrogenase와 반응하는 WST계열의 시약을 이용하여 세포의 증식률을 측정하였다(Chamchoy *et al.*, 2019). 감국 추출물 및 배양액의 세포독성은 모두 확인되지 않았으며, 특히 KCTC 3109 는 1,000 ppm 처리 시 평균 3.02의 증식을 유도했으며, 500, 250 ppm 처리 시 각 평균 2.10, 1.54의 증식을 보였다. 그 외에 KCTC 3074의 경우 평균 2.54, 2.41, 2.12로 1,000, 500, 250 ppm 처리 시 증식을 보였다. KCTC 3115는 평균 2.59, 2.16, 1.90의 증식을 보였다. KCTC 3237은 2.64, 2.07, 1.84로 각 농도별 처리 시 세포주의 증식을 유도했으며, KCTC 3498은 2.84, 1.93, 1.84의 증식을 보였으나, 250 ppm과 500 ppm과의 증식값의 차이를 볼 수 없었다. 대부분의 균주에서 1,000 ppm 처리 시 세포주의 증식을 유도하였고, 감국 추출물과 11종의 감국 배양액에서 세포독성은 확인할 수 없었다(Figure 12).

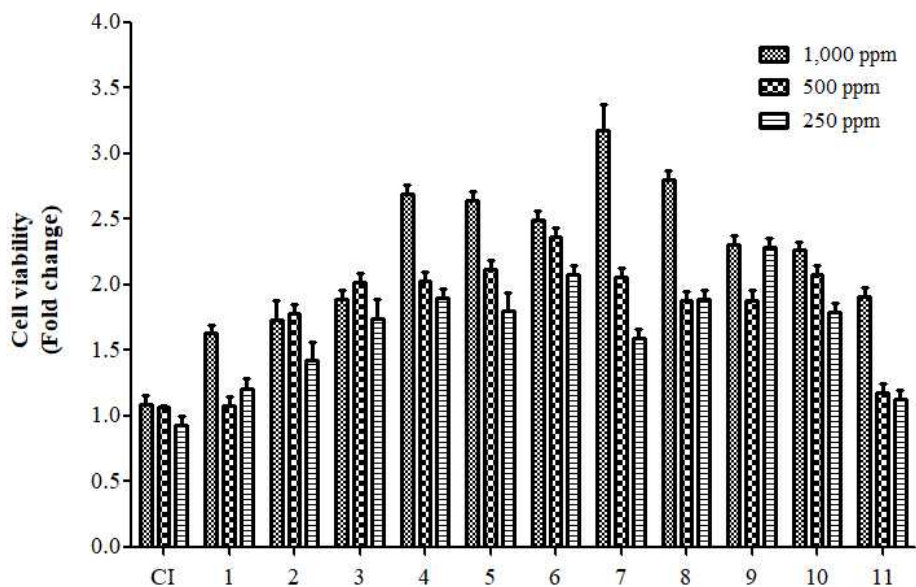
세포독성은 세포주에 산화스트레스를 발생시켜 단백질, DNA, RNA 손상 및 미토콘드리아를 손상시키고 전체적으로 세포의 생존유지를 저해하는 세포독성 형태로 나타나 세포를 사멸시킨다(DesMarais & Costa, 2019). 특히, 유입량에 관계없이 세포 속으로 유입된 독성성분은 세포막의 일부 단백질과 결합하여 2차 신호전달 경로를 차단 또는 변형시키고, 독성성분 중 이온형태의 성분은 세포막을 통해 세포 내로 유입되어 세포를 변형시킨다(Carusso *et al.*, 2017). 현재 연구된 세포독성을 띄는 많은 물질들은 전하를 띄는 수

용성의 세포막에 전기적 성질의 이온형태로 결집을 유도하고 세포내 유입을 원활히 할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Holmes *et al.*, 2020).

천연물 기원 alkaloid는 세포독성이 없으면서 일부 암세포에서만 독성을 갖는 물질이 있다(Chou *et al.*, 2017; Shweta *et al.*, 2013). Figure 12의 결과를 통해 감국 추출물 및 배양액에서 세포독성을 확인할 수 없었으며, 3T3-L1 세포주의 분화 시 감국 추출물 및 배양액을 1,000 ppm까지 처리하여도 무관할 것으로 판단되었다. 특히 지방구세포 분화는 7일 이상의 분화기간을 거치는데 세포독성이 있으면 분화 시 단기간 내 세포사멸을 빠르게 유도한다. 하지만, 본 실험에 이용된 감국 추출물 및 배양액은 3T3-L1 세포주의 증식을 유도하며, 일부 감국 배양액의 경우 3배가량의 세포증식을 보이는 것을 확인하였다. Figure 10, Figure 11, Figure 12의 결과를 배경으로 11개의 균주 중에서 4개의 균주를 선별(Table 5)하여 3T3-L1 세포주의 세포분화 후 세포독성, 세포 생존률에 대한 연구가 추가적으로 이루어졌다.

<Table 5> Four lactic acid bacteria species that induce cell proliferation.

No.	Lactic acid bacteria	KCTC
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3237
5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3115
6	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	3074
7	<i>Lactobacillus casei</i>	3109

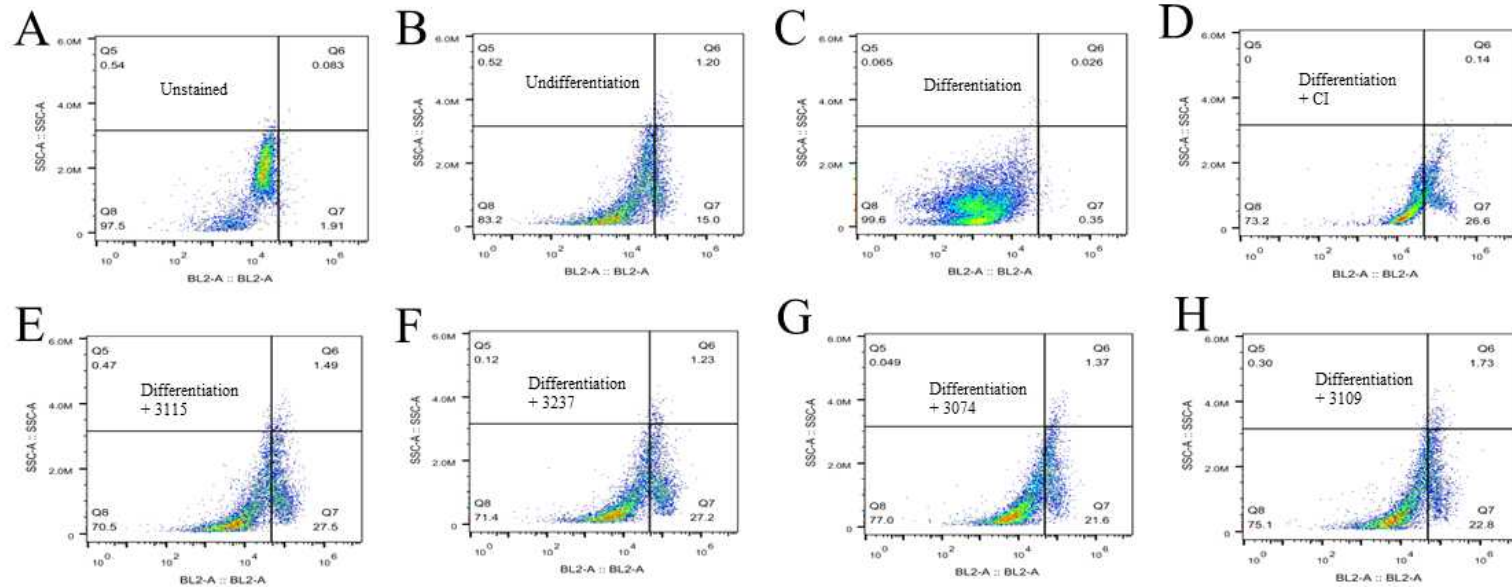


<Figure 12> Cytotoxicity effect of CI culture medium on the 3T3-L1 cell line.

CI, CI solution; 1,000 ppm, 1 mg/mL; 500 ppm, 500 µg/mL; 250 ppm, 250 µg/mL. CI, *Chrysanthemum indicum* L.; 1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3034; 2, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140; 3, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3718; 4, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237; 5, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115; 6, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074; 7, *Lactobacillus casei* KCTC 3109; 8, *Lactobacillus brevis* KCTC 3498; 9, *Lactobacillus kitasatonis* KCTC 3155; 10, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594; 11, *Lactobacillus fermentum* KCTC 3112.

2. FACS 기기 분석에 따른 세포분화 분석

미분화된 3T3-L1 세포주(undifferentiated cells, Figure 13B)와 염색하지 않은 3T3-L1 세포주 (unstained cells, Figure. 13A)의 패턴을 대조군으로 지정하여 모든 세포의 형광발현을 유도하였다. Negative control로서 undifferentiated cells 패턴을 분석하였으며, 이를 통해서 분화를 유도한 3T3-L1 세포주 (differentiated cells)의 side scatter (SSC)와 undifferentiated cells의 SSC가 서로 다른 패턴임을 확인하였다(Figure. 13B, Figure. 13C). 이렇게 undifferentiated cell과 differentiated cells의 SSC의 패턴이 다른 이유는 지방전구세포가 지방구세포로의 분화과정에 따른 패턴으로 유추할 수가 있다. 지방전구세포는 지방구세포로 분화하면 세포모양이 변하는데, 이때 지방구세포가 늘어나면서 세포소기관의 변화로 SSC가 작은 사이즈로 증가되어 Q8 (4분면 왼쪽아래)의 구성이 증가된다. FACS 분석에서 Q8의 분포를 통해 감국 추출물을 포함한 모든 배양액에서 지방구세포의 감소를 확인하였다(Figure 13). 특히, 감국 추출물을 포함한 4종의 감국 배양액에서 나타난 SSC light (granularity) 패턴은 undifferentiated cells SSC의 패턴과 유사했다. 이러한 결과는 감국 추출물과 감국 배양액이 3T3-L1 세포주의 지방구세포로의 분화를 억제한 것으로 사료된다. 또한, Q7 (4분면 오른쪽아래)의 분포로 세포의 독성을 보이는 패턴이 감국 추출물 대비 KCTC 3074와 KCTC 3109를 이용한 감국 배양액에서 월등히 감소되었다. 이 같은 패턴은 세포의 분화 과정에서 좀 더 복잡한 구조를 갖는 세포소기관의 형성으로 발생하는 현상으로 보인다(Xiao *et al.*, 2016). 또한, 분석을 통해 분화억제가 어떻게 유도되는지 확인할 수 있는 메커니즘이라고 판단되며, 이를 뒷받침하기 위해 GLI의 단백질 발현 수준을 분석했다.



<Figure 13> Live and dead cells distinguished by flow cytometry of cultures incubated with CI. SSC, Side scatter; BL2, Fixable dead cells. A. Unstained cells; B. Undifferentiated cells; C. Differentiated cells; D. Differentiated and CI-treated cells; E. Differentiated and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115+ CI-treated cells; F. Differentiated and *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237+ CI-treated cells; G. Differentiated and *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074+ CI-treated cells; H. Differentiated and *Lactobacillus casei* KCTC 3109+ CI-treated cells.

제4절 감국 추출물과 감국 배양액의 지방구세포 분화 억제 확인

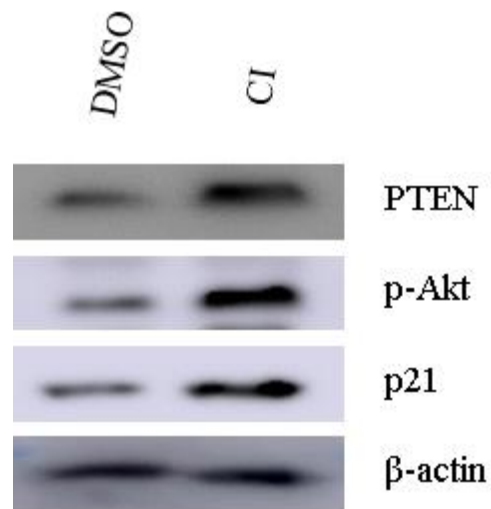
1. Akt pathway 조절과 지방구세포 분화

세포분화 과정에서 장시간 분화를 조절하는 기전인 cyclin D1, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 및 mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) 등 다양한 기전이 존재한다(Qiu *et al.*, 2014; Shukla & Gupta, 2007). 이 중 protein kinase B (Akt)는 PPAR γ 와 C/EBP α 의 상위를 조절하여 지방구세포 형성에 중요한 역할을 한다(Jiang *et al.*, 2019a; Wang *et al.*, 2019). Akt 활성화가 결여된 섬유아세포 또는 Akt 활성화가 억제된 지방전구세포에서 낮은 Akt 활성은 지방구세포로의 분화를 억제한다(Guo *et al.*, 2019). Western blot을 통해 감국 추출물의 phosphatase and tensin homolog (PTEN)-Akt-p21로 이어지는 Akt 신호 활성화의 증가를 확인하였다(Figure 14). 하지만, 예측한 결과와 다르게 3T3-L1 세포주의 지방구세포로 분화 유도 시 감국 추출물과 배양액을 첨가하면 지방구세포로의 분화를 억제할 뿐 아니라 이미 분화된 지방구세포의 감소도 확인하였다(Figure 15). 이 같은 원인은 세포의 증식을 조절하는 Akt 이외의 세포신호가 지방구세포의 분화를 억제하는 것이라 추측할 수 있다.

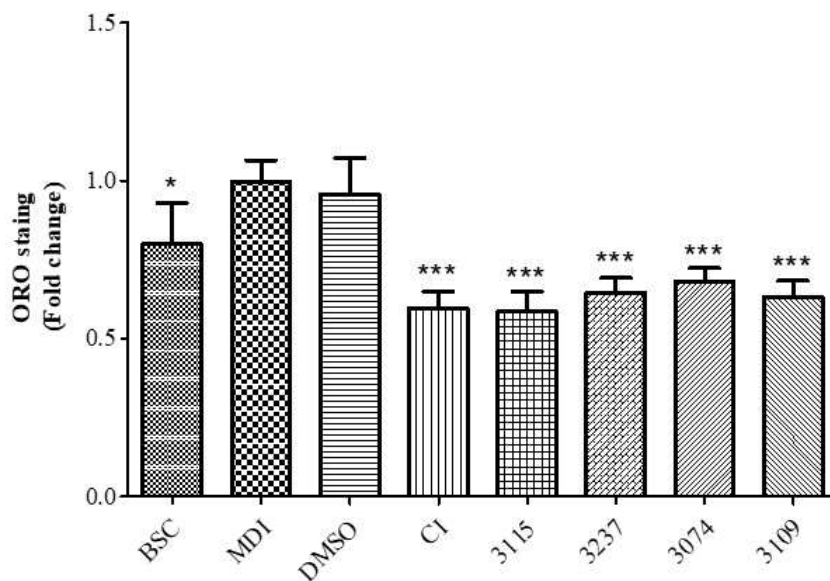
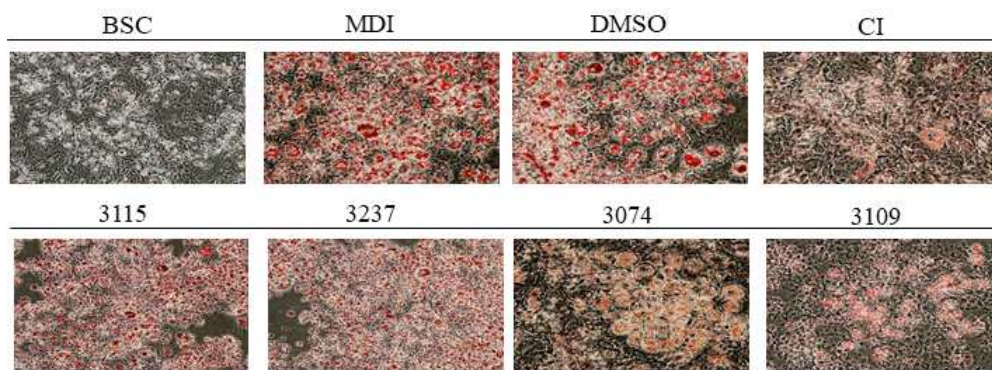
위 결과를 토대로 지방전구세포를 조절하는 다양한 신호 기전을 확인하였다. 3T3-L1 세포주는 지방전구세포로서 지방구세포로의 기능적인 역할을 위해서 지방구세포로 분화 시 활성화되는 Wnt/ β -catenin, Notch 및 Hedgehog 신호는 세포의 유전자 발현 또는 세포의 성장과 관련하여 다른 신호경로와 함께 작동된다고 보고된 바 있다(Matz-Soja, 2019).

지방전구세포에서 이러한 신호의 감소는 분화시기에 많이 발생하며, 다양한 연구에서 세포의 조절에 제어 역할을 하는 것으로 발표되었다(Li *et al.*,

2016; Weiszenstein *et al.*, 2016). Figure 15의 결과는 감국 추출물 및 배양액의 처리가 3T3-L1 세포주의 분화를 조절하는 신호에 영향을 주었을 것이라 사료된다. 따라서 지방전구세포의 분화 신호와 Hedgehog 신호와 관련이 있음을 확인하고자 하였다.



<Figure 14> Akt pathway control of CI on the inhibition of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells.



<Figure 15> Oil Red O stained on the inhibition of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells.

3115, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115+ CI-treated cells; 3237, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237+ CI-treated cells; 3074, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074+ CI-treated cells; 3109, *Lactobacillus casei* KCTC 3109+ CI-treated cells. Data are expressed as mean \pm SD. Significant difference from MDI by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: * p <0.05, *** p <0.001.

2. Hedgehog pathway 조절에 따른 분화 억제

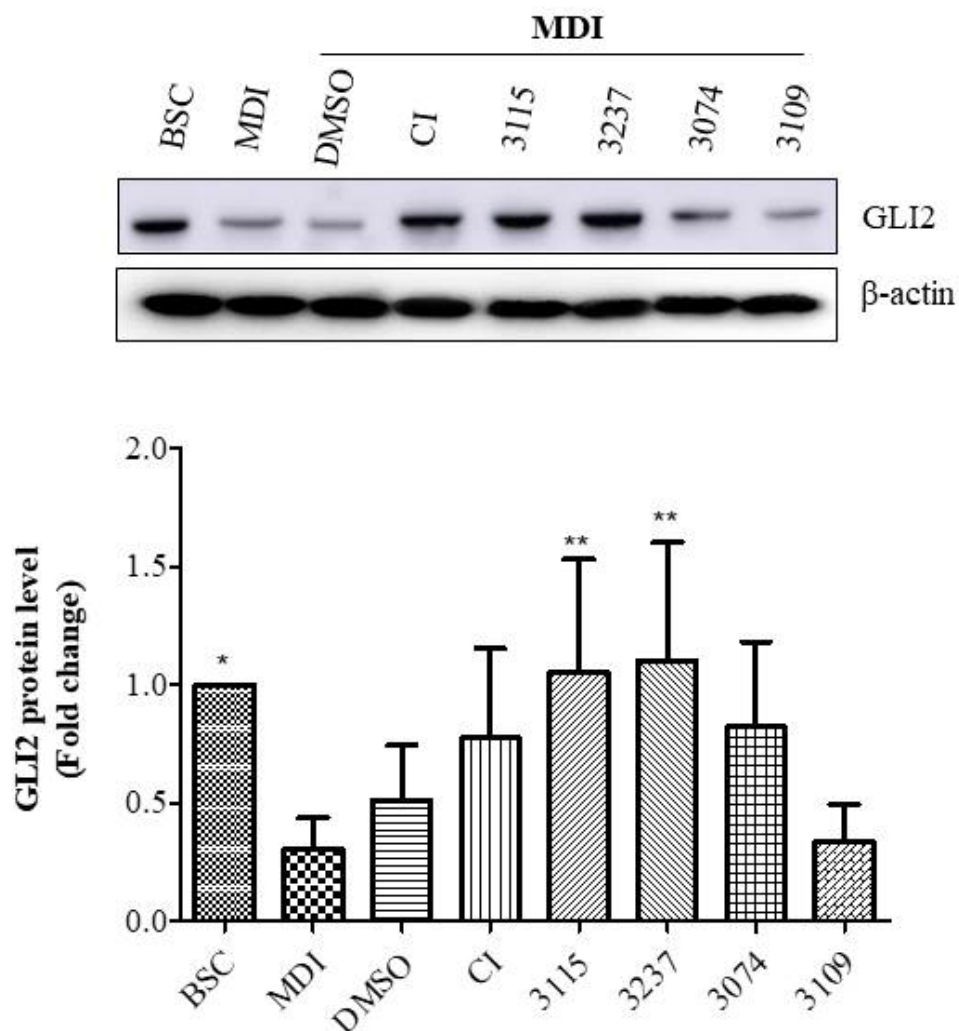
Hedgehog 신호는 1980년 초파리에서 발견되어 척추동물에서 3가지 타입의 유전자 상동체가 발견되었다(Xia *et al.*, 2019). Shh, Indian Hedgehog (Ihh) 및 Desert Hedgehog (Dhh)의 3가지 타입 중 *Shh*가 리간드 중 가장 광범위하게 발견되며, 특히 배아 발달에 필수적인 역할을 한다(Pereira *et al.*, 2014). 리간드와 결합된 12개의 막단백질로 이루어진 PTCH1과 결합하여 억제된 단백질인 SMO를 유동적으로 조절하고, suppressor of fused (SUFU)가 GLI 전사인자(GLI1, GLI2 및 GLI3)를 핵으로 이동할 수 있게 불활성화시켜 이후 타겟 유전자를 전사시킨다(Pession *et al.*, 2019). 척추동물에 존재하는 GLI 전사인자 중 GLI1, GLI2는 Shh 리간드 비 의존적 자극에 활성화될 수 있기 때문에 이를 표적화하는 다양한 분자 경로적 연구가 진행되었다(Rimkus *et al.*, 2016).

Western blot을 통한 실험결과에서 GLI2의 단백질 발현은 분화대조군(MDI) 대비 감국 추출물(CI), KCTC 3115, KCTC 3237 및 KCTC 3074에서 증가하였으며, 특히 KCTC 3115, KCTC 3237의 경우 GLI2의 단백질 발현이 유의성 있게 증가되었다(Figure 16). 3T3-L1 세포주의 지방구세포 분화를 보여주는 ORO 염색 결과에서도 감국 추출물과 KCTC 3115, KCTC 3237 및 KCTC 3074에서 분화가 억제되었다(Figure 15). 반면, 3T3-L1 세포주의 지방구세포 분화가 증가되면서 GLI2의 단백질 발현은 낮아지는 것을 확인하였다(Figure 15, Figure. 16). 그리고 GLI2의 단백질 발현과 무관하게 지방구세포의 분화를 억제한 KCTC 3109는 Hedgehog 신호가 아닌 다른 신호에 의한 영향으로 보인다. Figure 15, Figure 16의 결과로 독성이 없고 농도 의존적으로 3T3-L1 세포주의 지방구세포 분화 억제를 보였던 4종의 감국 배양액 중 Hedgehog를 가장 잘 조절하는 유산균 KCTC 3115 및 KCTC 3237인 것을 확인하였다.

Hedgehog 신호는 지방구세포와 암세포 사이에서 전혀 다른 경향으로 보고된다(Carpenter & Ray, 2019; Virca & O'Donnell Jr, 2019). 암세포는 정

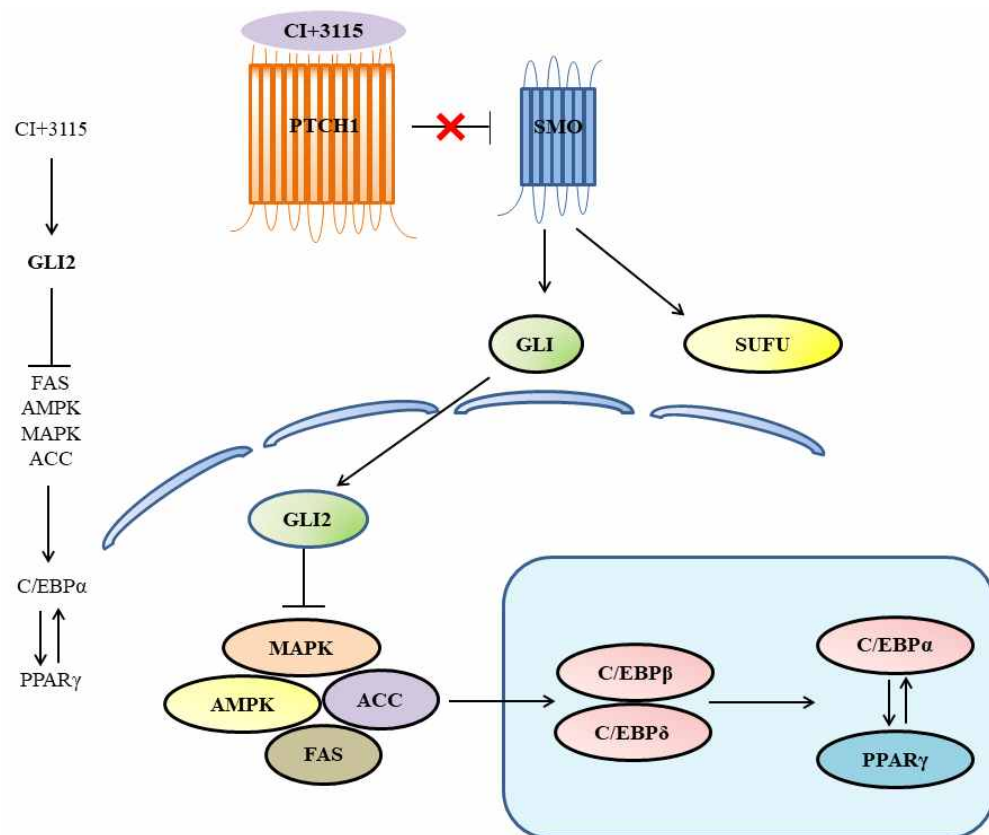
상세포의 변이로 인해 발생한 세포로 체내에 존재하는 기능손실을 야기시킨다. 그리고 각 기관의 구조에 침투하여 혈액 내 이동하기 때문에 전이가 발생되어 생명을 위협한다(Jamal *et al.*, 2020). 반면, 지방구세포는 지방전구세포에서 분화를 통해 형성되기 때문에 지방전구세포의 분화 억제는 지방구세포의 감소와 밀접하게 연결되어 있다(Dirat *et al.*, 2011).

암세포에서 Hedgehog 신호는 억제되어 세포의 사멸을 유도하기 때문에 (Carpenter & Ray, 2019), Hedgehog 신호를 조절하는 인자는 암세포에 초점을 맞춰 Hedgehog 신호가 억제되는 약물로 이미 개발이 되어있다. 따라서 지방전구세포에서 Hedgehog 신호의 증가가 지방구세포 분화를 억제 및 조절할 수 있기 때문에 이는 비만에 대한 또 다른 대안으로 볼 수 있다 (Figure 17).



<Figure 16> Hedgehog pathway control of CI culture medium on the inhibition of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells.

3115, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115+ CI-treated cells; 3237, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237+ CI-treated cells; 3074, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074+ CI-treated cells; 3109, *Lactobacillus casei* KCTC 3109+ CI-treated cells. Data are expressed as mean \pm SD. Significant difference from MDI by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: * p <0.05, ** p <0.01.



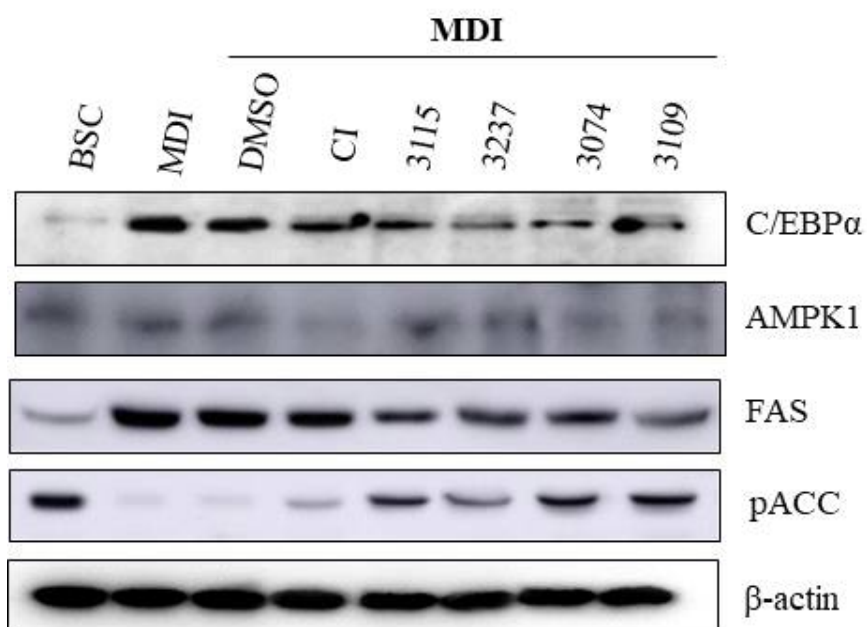
<Figure 17> Schematic representation of inhibition of adipocyte differentiation by CI culture medium through PTCH1-GLI2-mediated down regulation of lipogenesis.

3. Lipogenesis pathway 조절에 따른 분화 억제

지방구세포 분화와 관련된 다양한 신호기전은 서론에서 언급한 바와 같이 C/EBP, PPAR, α /RXR, ADD1/SREBP-1c 등이 존재한다. 특히 C/EBP α 와 PPAR γ 는 서로 발현의 차이를 조절하는 상보적인 역할을 한다(Sohn *et al.*, 2015). 지방구세포 분화를 억제하는 신호에서 AMPK, acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS) 및 C/EBP α 를 타겟으로 확인하였고, 분화와 관련된 단백질 발현 수준에서 4종의 감국 배양액 모두 C/EBP α 및 FAS, AMPK1을 감소시키고, phosphor acetyl-CoA carboxylase (pACC)를 효과적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 특히 KCTC 3115, KCTC 3074 및 KCTC 3109에서 pACC가 강하게 증가하는 것을 알 수 있다(Figure 18). 위 결과를 토대로 4종의 감국 배양액 중 효과적으로 3T3-L1 세포주의 lipogenesis 신호를 조절하는 감국 배양액은 KCTC 3115, KCTC 3074, KCTC 3109인 것을 확인하였다.

따라서 감국 추출물과 4종의 감국 배양액 중 KCTC 3115가 lipogenesis 신호와 지방전구세포에서의 Hedgehog 신호를 같이 조절하여 효과적으로 지방구세포 분화를 억제하는 것으로 알 수 있다. 또한, 감국 추출물과 4종의 감국 배양액에서 Hedgehog 신호 중 GLI1에 대한 연구가 필요할 것으로 사료되어 추가연구를 진행했다.

하지만, 분화 후 세포독성이 감국 추출물과 비슷하게 유지되어 있는 문제와 KCTC 3115과 같이 Hedgehog 신호를 조절하면서 지방구세포 분화를 억제하는 camphor을 포함한 단일물질에 대한 후속연구가 필요할 것으로 판단된다. 그리고 유산균 자체의 Hedgehog, lipogenesis 신호 관련 단백질의 발현 수준과 감국 추출물, 감국 배양액의 단백질 발현 수준에 대한 비교가 필요하다.



<Figure 18> Lipogenesis pathway control of CI culture medium on the inhibition of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells.

3115, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115+ CI-treated cells; 3237, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237+ CI-treated cells; 3074, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074+ CI-treated cells; 3109, *Lactobacillus casei* KCTC 3109+ CI-treated cells.

제5절 GLI의 단백질 발현과 SMO의 조절

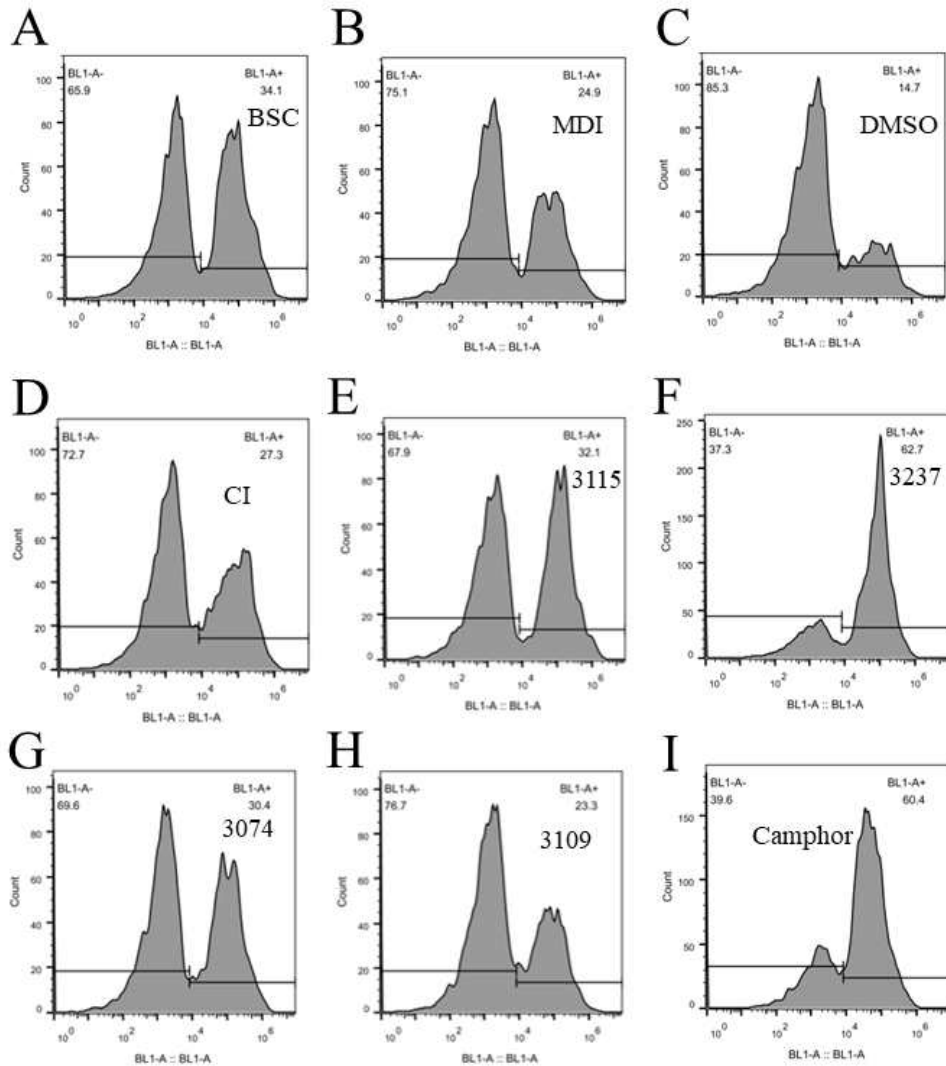
1. FACS 기기 분석에 따른 GLI의 단백질 발현 차이 분석

Hedgehog 신호 GLI2 이외에 지방구세포에 영향을 줄 수 있는 GLI1의 활성을 확인하고자 지방구세포 분화과정 중 감국 추출물, 감국 배양액 및 camphor에서의 GLI1 단백질 발현 수준을 FACS 기기를 이용하여 분석하였다. GLI1에 fluorescein isothiocyanate (FITC) 형광이 conjugation되어 있어, GLI1이 염색되면 blue-laser 1 (BL1)의 수치가 증가된다. GLI1의 단백질은 BL1-A+ 부위에 증가되면서 GLI1의 단백질 발현 수준을 확인할 수 있다.

일반적인 3T3-L1 세포주의 GLI1 단백질 발현은 $34.1 \pm 5.2\%$ 인 반면, 분화된 세포는 $24.9 \pm 3.1\%$ 로 KCTC 3109 $23.3 \pm 1.9\%$ 와 동일하게 감소되었고, KCTC 3115는 $32.1 \pm 2.8\%$, KCTC 3074는 $30.4 \pm 4.2\%$ 로 정상수치 만큼 발현되었다. 반면, KCTC 3237은 $62.7 \pm 1.5\%$, camphor는 $60.4 \pm 2.2\%$ 로 GLI1의 단백질 발현이 정상수치보다 높게 발현되는 것을 확인하였다(Figure 19).

GLI1 또는 SMO를 조절하는 타겟은 직접적인 영향 이외에 Wnt/ β -catenin의 타겟인 Wnt3a에 의해 T-cell factor 4 (TCF4)/ β -catenin을 통한 조절에 대한 연구가 보고되었다(Wang *et al.*, 2018b). 더불어 PI3/Akt를 통해서 조절되는 연구가 보고되어 있지만(Zhou *et al.*, 2016), 본 실험에서 camphor에 의해 Akt가 조절되지 않았다(Figure 21). 추후 연구로서 TCF4 및 β -catenin이 감국 배양액과 camphor에 의해 조절되어 Wnt3a를 발현시켜 GLI1, SMO를 조절하는지 확인할 필요가 있다.

FACS를 통한 GLI1의 단백질 발현에서 KCTC 3237과 camphor의 수치가 상대적으로 높게 나타났다. 따라서 이전 연구에서 Hedgehog 신호 관련 단백질의 발현이 높게 나왔던 KCTC 3237의 경우 GLI1, GLI2의 활성 수치가 모두 높은 것으로 확인 할 수 있었다. 따라서 KCTC 3237과 camphor에 대한 단백질 발현 수준을 비교하기 위한 실험을 추가로 진행했다.



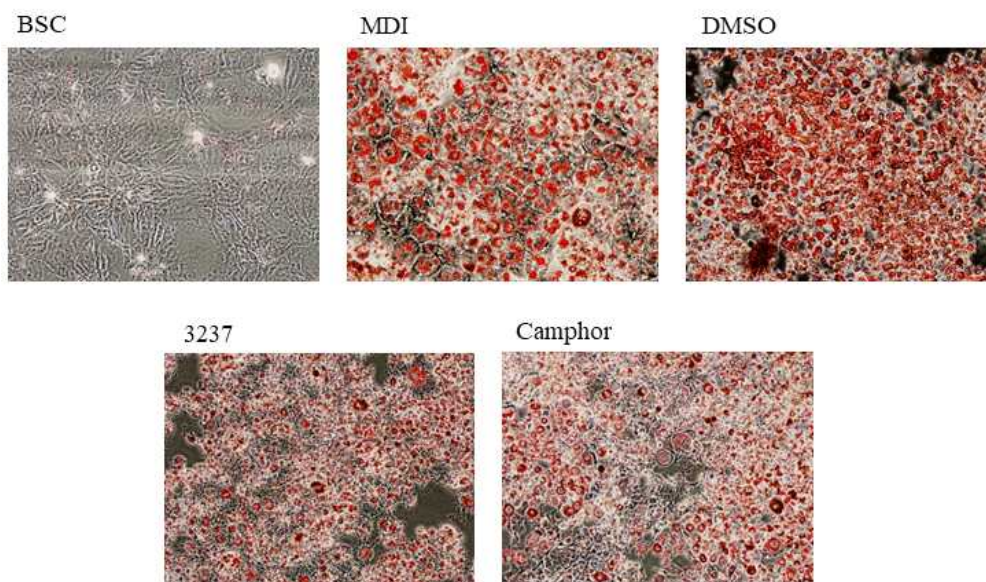
<Figure 19> Protein level of GLI1 (FITC) by 3T3-L1 cells in response to CI alone, in response to each of the bacterial mediators of culture medium, and to camphor.

A. BSC; B. 3T3-L1 cells differentiated in response to MDI; C. Cells treated with DMSO; D. CI; E. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115+ CI-treated cells; F. *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237+ CI-treated cells; G. *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC 3074+ CI-treated cells; H. *Lactobacillus casei* KCTC 3109+ CI-treated cells; I. Camphor.

2. 감국 배양액과 camphor의 지방구세포 분화억제 비교

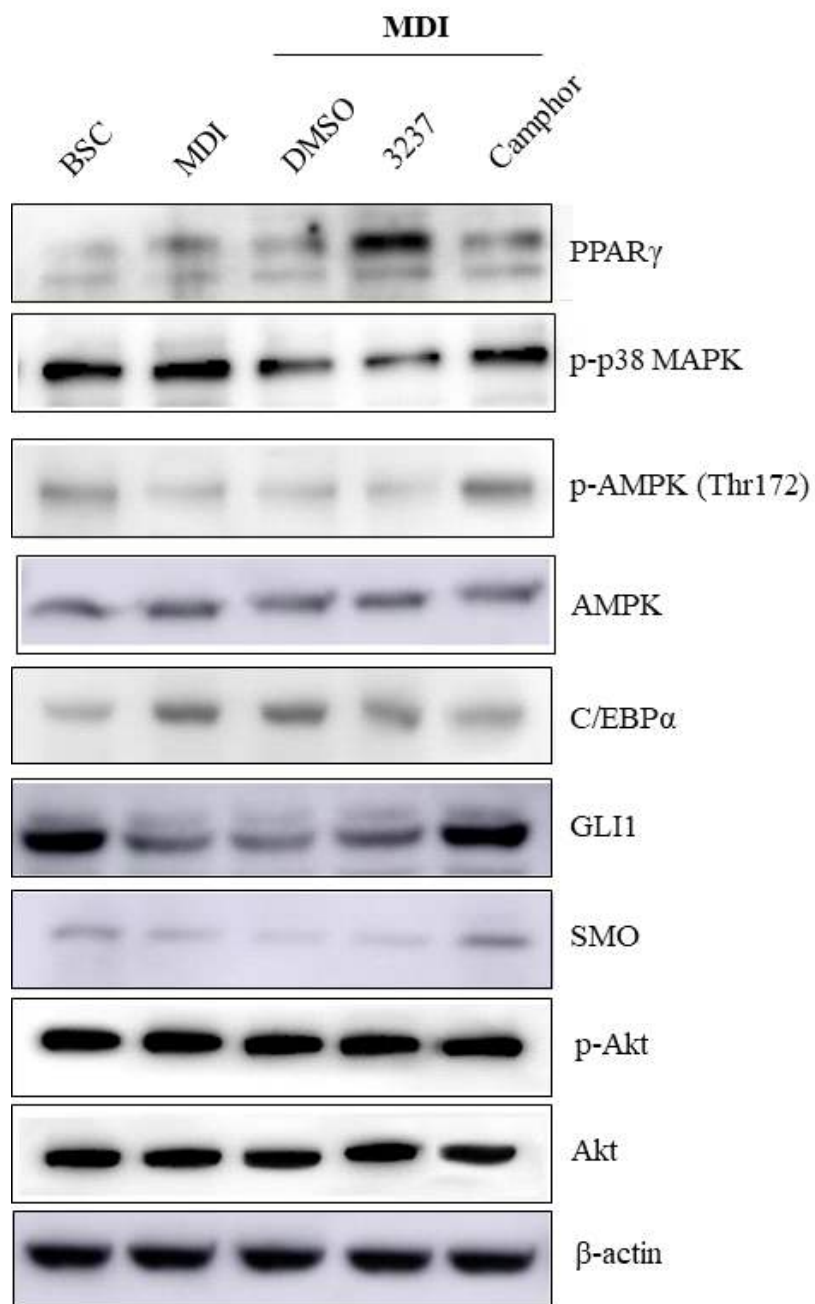
4종의 감국 배양액 중 Hedgehog 신호를 가장 잘 조절하는 배양액은 FACS 기기분석에서 GLI1 단백질 발현이 가장 높게 나타난 KCTC 3237이다. 따라서 KCTC 3237과 감국 추출물의 단일물질인 camphor에 대한 PTCH-SMO-GLI1로 이어지는 Hedgehog 신호를 확인하고자 추가연구를 진행하였다.

ORO 염색을 통해 MDI 대비 KCTC 3237 및 camphor 처리군에서 지방구세포 분화가 억제된 것을 확인하였다(Figure 20). Hedgehog 신호와 관련된 단백질 발현에서 GLI1은 KCTC 3237과 camphor 처리군에서 증대된 것을 확인할 수 있었으며, 특히 camphor 처리군에서 더욱 증대되었다. 또한, 미세하지만 MDI 대비 camphor 처리군에서 SMO의 단백질 발현의 증대를 확인할 수 있었으며, C/EBP α 에서 MDI 대비 KCTC 3237과 camphor 처리군에서 단백질 발현의 감소를 확인하였다. 반면, PPAR γ 에서 KCTC 3237 처리군에서 단백질 발현의 증대를 확인했고, AMPK는 따로 조절되지 않는 것을 확인할 수 있었다(Figure 21). KCTC 3237 처리군이 기존의 연구와 다르게 AMPK와 PPAR γ 와 C/EBP α 의 단백질 발현 시점이 다른 것은 추가연구를 통해서 확인 할 필요가 있다. 분화를 조절하는 신호는 Hedgehog 신호 이외에도 cyclin D1, PI3K/Akt 및 MAPK/Erk 등이 존재한다. 하지만, camphor의 처리 시 Akt는 조절되지 않았으며(Figure 21), 이는 기존 연구에서 감국 추출물에서 Akt가 조절된 이유는 camphor 이외의 물질에 대한 영향이라 보인다. 감국 추출물에서 Akt를 조절한 연구는 Raw264.7 세포주를 이용하여 감국 메탄을 추출물 처리 시 세포독성은 없었고, lipopolysaccharide에 의해 유도된 산화질소와 prostaglandin E2 생성을 억제하였다. 또한, Akt1/Akt2를 표적으로 luteolin이 약리성분으로 확인된 바 있다(Lii *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2017). Akt 조절인자인 루테올린은 감국 추출물에서 high performance liquid chromatography (HPLC)를 통해 14.9 mg/g으로 높은 함량으로 확인되었다(Yang *et al.*, 2017).



<Figure 20> Oil Red O staining of BSC, cells treated with 3237 and cells treated with camphor.

3237, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237+CI-treated cells



<Figure 21> Western blot of extracts from 3T3-L1 cells differentiated for 5 days in the presence of 3237, camphor or DMSO. 3237, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237+CI-treated cells.

3. SMO의 억제효과 및 지방구세포 분화 조절

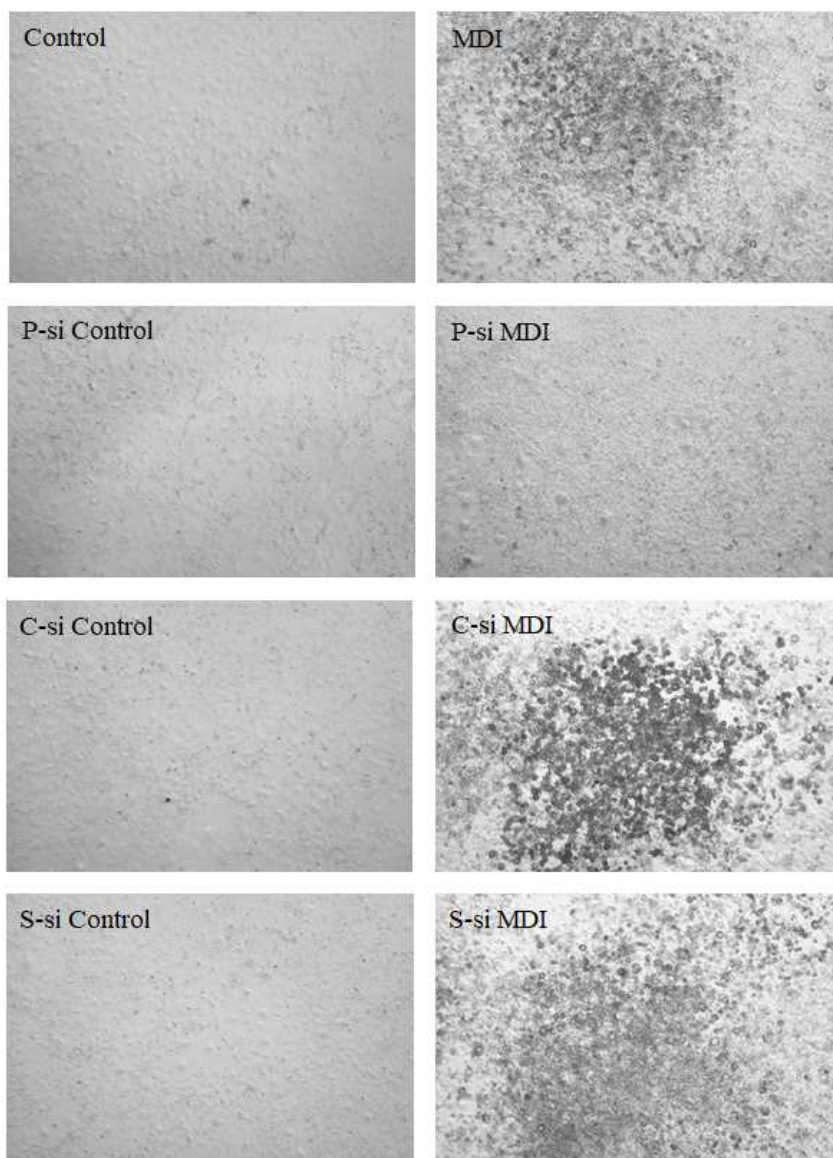
세포분화 과정에서 장시간 농도 별 camphor를 처리한 3T3-L1 세포주에서 Hedgehog 신호 중 siRNA에서 *Smo*, *Ptch*와 western blot에서 SMO, PTCH, GLI1을 측정하였다. Small interfering RNA (siRNA)는 두 가닥의 대조적으로 반응하는 sense를 가지고 있다. 세포 흡착 후 특정 표적의 messenger RNA (mRNA)에 대한 상위 계열을 가진 siRNA의 antisense 가닥이 RNA-induced silencing complex (RISC)에 통합되어 RNA interference (RNAi) 메커니즘이 시작된다(Jeong *et al.*, 2009).

RNAi 메커니즘을 활용해 siRNA에서 *Ptch*와 *Smo*의 연관성을 확인했다(Figure 22). *Ptch* siRNA 단독 처리 시 *Ptch*가 억제되어 분화가 억제되었고, *Smo* siRNA 단독 처리에서도 *Smo*가 억제되어 분화가 유도되었다(Figure 22). camphor 처리에서도 *Ptch* siRNA를 처리한 것과 동일하게 분화가 억제되었으며(Figure 20), 분화 4일차 camphor를 제거하고 *Smo* siRNA를 이용하여 *Smo*를 억제 시 분화가 유도되었다(Figure 22). 또한, western blot에서도 *Ptch* siRNA 처리 시 SMO와 GLI1이 강하게 C/EBP α 은 약하게 발현이 되었지만 *SMO* siRNA 처리 시 SMO와 GLI1이 약하게 C/EBP α 은 강하게 발현이 시키며 siRNA의 결과와 동일하게 발현을 나타냈다(Figure 23). 즉, PTCH 억제는 SMO를 활성화시키는 기전으로 Hedgehog 신호를 활성화시킨 것이다. 이러한 결과는 Hedgehog 신호의 활성화가 지방구세포 분화를 억제시키는 것을 보여준다. *Ptch* siRNA와 *Smo* siRNA를 통해 *Smo*를 조절하면 분화기전에 큰 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었으며, camphor도 동일한 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

Hedgehog 신호의 활성화 단계는 PTCH을 비활성화 시키는 Hedgehog 리간드의 결합에 의해 시작되며 리소좀을 통해 PTCH의 분해가 유도된다(Levanat *et al.*, 2004). PTCH의 분해를 통해 SMO가 CSNK1A1 (CK1 α) 및 GPCR kinase2 (GRK2)와의 연관을 통해 인산화가 활성화되고, β -arrestin과의 연관을 통해 하위로 전달되도록 한다(Chen *et al.*, 2011; Corbit *et al.*,

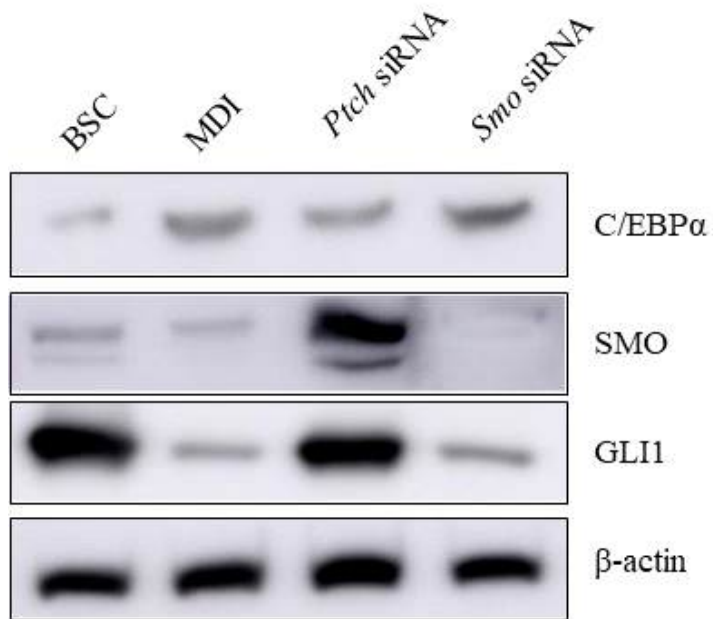
2005). 활성화된 SMO는 GLI를 활성화시키고 Hedgehog 신호와 관련된 유전자를 자극, SUFU로부터 해리를 촉진하여 활성화된 GLI가 세포 증식, 생존, 자가 재생 및 암세포에서의 침습성에 관련된 인자를 활성화시킨다 (Katoh & Katoh, 2009). 또한, SMO를 타겟으로 활성화 또는 억제시키는 메커니즘을 통해 Hedgehog 신호를 조절하는 연구가 다양하게 진행되었다 (Chen *et al.*, 2018a; Gu *et al.*, 2019). 특히, 3T3-L1 세포주에서는 SMO를 활성화시키고, 암세포에서는 SMO를 억제해 세포의 성장 및 침습성을 조절하는 연구들이 보고되고 있다(Kim *et al.*, 2014).

감국 추출물보다 감국 배양액에서 Hedgehog 신호가 효과가 큰 이유로 유산균의 영향을 들 수 있다. 예를 들면 luteolin의 경우 식물체에서 비배당체 형태로 존재하나 배당체의 형태로도 존재하기도 한다. luteolin-5-*O*-glucoside와 luteolin-7-*O*-glucoside가 있으며(Hu & Kitts, 2004; Jung *et al.*, 2012), 이러한 배당체는 주로 β -glucosidase에 의해 비배당체로 전환되며 그 활성이 증가한다(Day *et al.*, 1998). 이러한 β -glucosidase는 여러 유산균에서도 발견된다(Michlmayr & Kneifel, 2014). 또 다른 천연작물의 활성 성분을 강화의 예로 유산균을 통한 ginsenoside, quercetin 활성 강화 (Devi *et al.*, 2020; Zhong *et al.*, 2016) 등이 있으며, 이는 유산균의 발효로 인해 감국 추출물의 내에 있는 특정 물질의 활성을 강화시킨 것으로 볼 수 있다. 활성이 강화된 특정 물질과 감국 배양액의 camphor의 변화를 후속 연구를 통해서 규명할 필요가 있다. 그리고 Hedgehog 신호를 강하게 조절하는 감국 KCTC 3237 (*Lactobasillus rhamnosus*) 배양액의 경우 물질변화와 활성변화 및 *in vivo* 등의 후속연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한, *in vitro* 연구를 기반으로 *in vivo*에서 감국 추출물과 비만억제에 더 효율적인 감국 KCTC 3115 (*Lactococcus lactis*) 배양액이 비만유도 동물모델에서 적용이 가능한지 확인하기 위해 동물실험을 진행했다.



<Figure 22> Results of transfection (12 hr) with C-si, S-si or P-si 12 hr followed by MDI-mediated differentiation.

C-si, Control siRNA; S-si, *Smo* siRNA; P-si, *Ptch* siRNA.



<Figure 23> Western blot analysis of SMO and PTCH inhibition targeting Hedgehog pathway proteins.

제6절 C57BL/6 mice의 감국 배양액 섭취에 따른 변화

1. 임상증상

동물 실험은 Lee의 방법을 응용하여 진행되었다(Lee *et al.*, 2019b). 실험 동물 입고 후 순화 기간 동안 이상 증상이 관찰되는 동물은 없었다. 실험 기간 동안 지속적인 고지방식이(HFD) 급이로 동물은 비만 상태가 되었고 이로 인해 점차적으로 동물의 활동력 저하가 관찰되었다. 이를 제외하고는 특이할 만한 임상증상은 관찰되지 않았고, 또한 실험물질로 인해 발생할 수 있는 이상반응도 관찰되지 않았다.

2. 체중

군 분리 실시 후 주 1회 체중을 측정하였다. 모든 투여 군은 지속적으로 체중이 증가하였고, 실험물질 투여 후 4주부터 실험 종료 시까지 G1 normal vehicle control 군과 G2 HFD vehicle control 군에서 유의한 차이가 관찰되었다. 실험물질 투여 군에서는 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(25.15 ± 2.44 g)이 투여 후 4주부터 G2 HFD vehicle control 군(28.22 ± 1.48 g)과 비교하여 유의한 수준으로 체중이 감소하였고 실험 종료 시까지 이러한 체중 감소 효과가 관찰되었다(Figure 24).

증체량 결과에서는 체중 측정 결과와 같은 양상으로 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(1.00 ± 0.53 g)에서 G2 HFD vehicle control 군(1.99 ± 0.48 g)과 비교하여 투여 후 1주부터 유의한 차이가 관찰되었고 투여 종료 시까지 유의한 수준으로 낮은 증체량을 유지하였다(Figure 25).

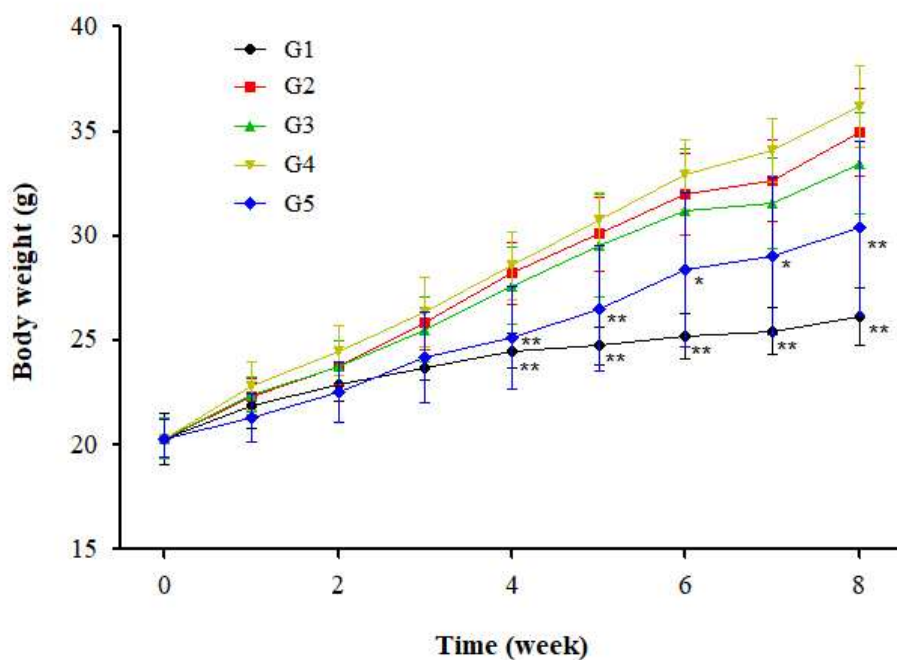
투여 종료일에 측정한 체중 결과에서 G2 HFD vehicle control 군(34.98 ± 2.09 g)과 비교하여 대조물질 투여 군인 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군(33.47 ± 2.41 g)과 실험물질 투여 군인 G4 HFD CI 300 mg/kg 투여 군(36.18 ± 1.94 g) 및 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(30.38 ± 4.17 g)은 각각 4.32%, -3.42%, 13.15%의 체중 감소를 보였고, 그 중 G5 HFD CILL 300

mg/kg 투여 군에서만 유의한 차이를 확인할 수 있었다(Figure 26).

*G. cambogia*는 비만을 억제시키는 것으로 알려져 있으며, 특히 *G. cambogia*가 함유하고 있는 (-)-Hydroxycitric acid (HCA)는 체중의 감소에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Oluyemi *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2005). 하지만, 본 실험에서 *G. cambogia* (G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군)를 섭취시킨 군은 선행연구의 용량과 동일하게 투여했으나 지방억제 효과가 낮게 나타났던 이유로 감국의 유산균 발효 시 들어가는 배지의 양을 동일하게 *G. cambogia*에 첨가하였기 때문에 실제 복용된 양은 선행연구의 40%에 해당되기 때문이다. 하지만, 본 실험에서 *G. cambogia*를 섭취시킨 G3 HFD GC 400 mg/kg 군에 비해 감국 *L. lactis* 배양액을 섭취시킨 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군에서 체중의 감소를 확인할 수 있었다.

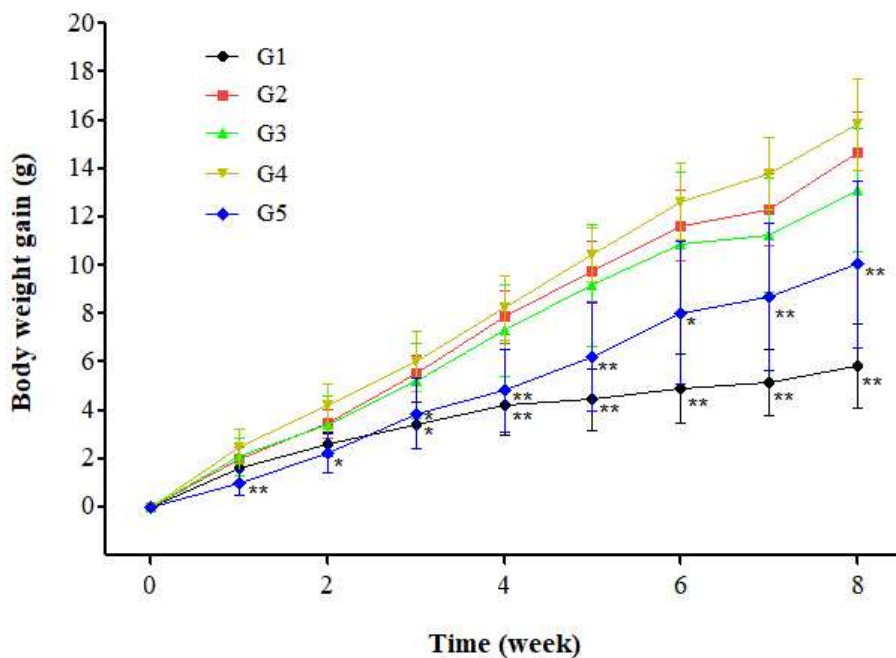
이 같은 결과는 동일한 배지가 섞여 있더라도 *G. cambogia*보다 적은 양이 함유된 감국 배양액에서 체중감소를 보였다는 것은 HCA 보다 효과적으로 체중을 조절하는 물질이 감국 배양액에 포함되어 있는 것이라 판단했다. 특히, camphor를 비롯한 감국 배양액의 경우 *in vitro*에서 3T3-L1 세포주에 단일처리 된 결과에서도 효과적으로 지방구세포 분화를 억제시키는 것을 확인한 바 있다. 일반적으로 감국의 독성으로 인해 투여량은 *G. cambogia*의 투여량보다 적으며, 동일량을 투여했을 경우 그 효과가 *G. cambogia*보다 미미하다고 알려져 있다(Cha *et al.*, 2018). 반면, 감국 추출물의 분획물의 경우 *G. cambogia*보다 효과가 더 좋게 나타나는 것으로 보고된 바 있다(Nepali *et al.*, 2018).

G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군의 체중의 감소 효과는 유산균 발효를 통해 감국 추출물의 특정 물질들의 활성 변화 및 지방구세포 분화억제 물질의 증가 등을 통한 효과로 추측할 수 있다. 하지만, 배양액의 특성상 배지와 함께 섭취를 해야 하는 문제점으로 인해 최적의 투여량과 배지와와의 비율, 배지의 함유물이 *G. cambogia*, 감국 추출물과 감국 배양액 내의 물질과의 연관성과 상호작용에 대한 추가연구가 필요하다.



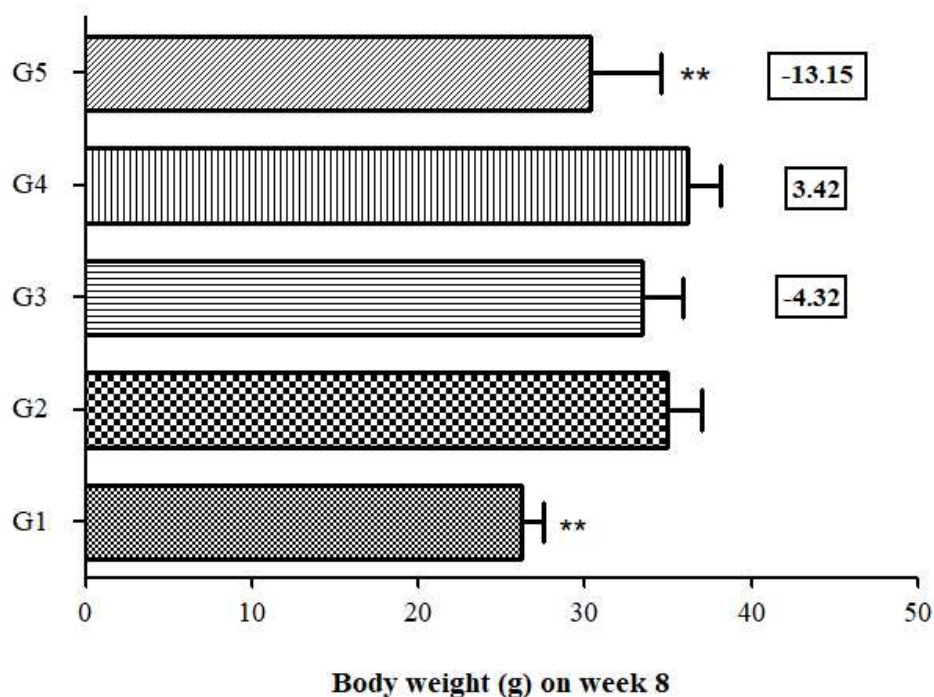
<Figure 24> Changes in body weight of control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for experimental period.

G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. Data are expressed as mean \pm SD. Significant difference from G2 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: * p <0.05, ** p <0.01.



<Figure 25> Changes in body weight gain (vs week 0) of control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for experimental period.

G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. Data are expressed as mean±SD. Significant difference from G2 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



<Figure 26> Body weight of control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials on week 8.

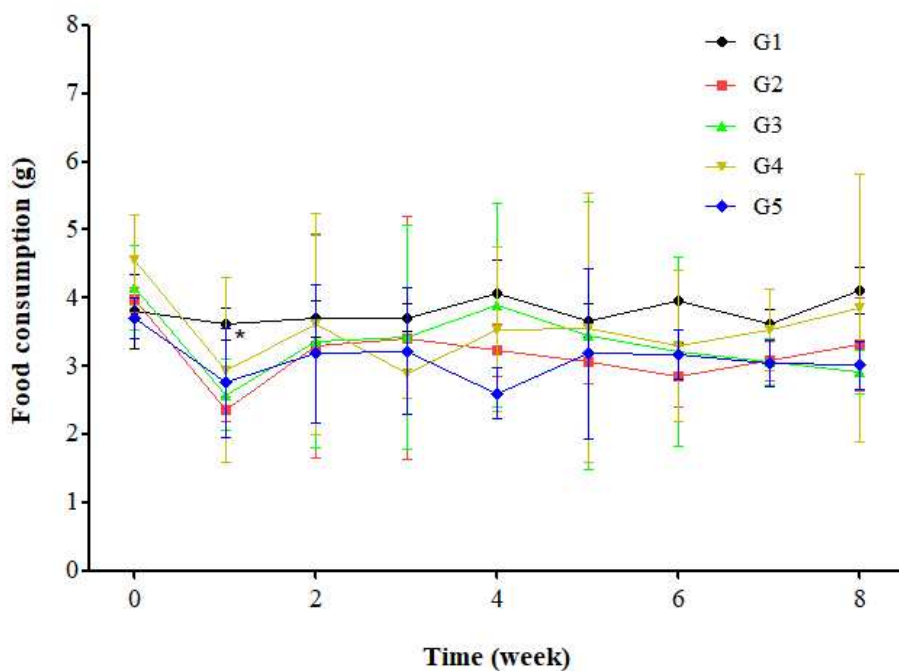
G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. Data are expressed as mean±SD. Significant difference from G2 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: ** $p<0.01$.

3. 사료의 섭취량

전 실험기간에 걸쳐 매주 사료 섭취량을 측정한 결과, G1 normal vehicle control 군(3.62 ± 0.23 g)이 G2 HFD vehicle control 군(2.37 ± 0.19 g)과 비교하여 투여 후 1주에 유의하게 사료 섭취량이 증가한 것을 제외하고, 전 실험 기간 동안 G2 HFD vehicle control 군과 비교 시 유의한 차이가 관찰되는 투여 군은 없었다(Figure 27).

G1 normal vehicle control 군은 4, 8주에 각 4.07 ± 0.48 g, 4.11 ± 0.34 g 로 증가한 것을 확인할 수 있었으며, G2 HFD vehicle control 군은 1, 6주에 각 2.37 ± 0.19 g, 2.85 ± 0.45 g로 낮게 섭취한 것으로 나타났다. 또한, G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군은 0주에는 4.15 ± 0.63 g, 1, 8주에는 2.58 ± 0.53 g, 2.92 ± 0.32 g 섭취량을 보였으며, G4 HFD CI 300 mg/kg 투여 군은 0주에는 4.57 ± 0.66 g, 1, 3주에는 2.94 ± 1.36 g, 2.89 ± 0.35 g, G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군은 1, 4주에 2.94 ± 0.80 g, 2.60 ± 0.37 g로 관찰되었다. 이외에 5개의 투여 군이 평균적으로 3.52 ± 1.11 g의 섭취량을 보였다(Figure 27).

동물성 식품, 포화지방, 나트륨 등 다량으로 포함된 가공식품의 섭취는 영양의 불균형 및 과도한 지방을 축적시켜 복부비만을 유도한다. 본 실험에서 사용된 고지방사료는 마우스의 지방을 생성시키고 비만을 유도하여 관련된 시험에서 이용되는 비만유도식품이다. 사람에게 해당하는 체중관리 프로그램에서 식이섭취량의 조절은 체중감량 중 제일 처음 적용되는 팩터이며, 총 에너지에서 차지하는 탄수화물의 비율을 줄이고, 식이를 감소시켜 지방의 증가를 억제시키는 역할을 한다. 동물 실험에서 투여 후 1주를 제외한 모든 시험기간에서 섭취량에 유의한 차이를 관찰하지 못했다는 건 체중의 증가에 사료 섭취량이 적용된 건 아니라는 결론을 얻을 수 있으며, 체중의 감소가 있는 것은 투여된 물질의 영향으로 볼 수 있다.



<Figure 27> Changes in food consumption of control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for experimental period. G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. Data are expressed as mean \pm SD. Significant difference from G2 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: * p <0.05.

4. Body fat mass 측정

실험물질 투여종료일에 body fat mass를 측정한 결과, fat mass 결과에서 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(10.3022 ± 2.8813 g)이 G2 HFD vehicle control 군(13.5717 ± 1.7576 g)과 비교하여 유의하게 감소하였고, lean mass 결과에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Table 6, Table 7, Table 8). Bone mineral content (BMC) 결과에서 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(0.7845 ± 0.0915 g)은 G1 normal vehicle control 군(0.7945 ± 0.1114 g)과 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군(0.8152 ± 0.0423 g)보다 낮게 측정되었다(Table 6).

Total mass 결과에서 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(30.9005 ± 4.1264 g)이 G2 HFD vehicle control 군(35.7668 ± 1.9725 g)과 비교하여 유의하게 감소하였다. 또한, bone mineral density (BMD)결과에서 G1 normal vehicle control 군(0.0928 ± 0.0117 g/cm²)과 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군(0.0935 ± 0.0032 g/cm²), G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(0.0936 ± 0.0090 g/cm²)은 유의적 관찰은 없었지만 거의 동일하게 측정되었다. Bone area의 경우 G2 HFD vehicle control 군(8.7011 ± 0.3761 cm²)과 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군(8.7199 ± 0.4353 cm²)을 제외하고는 나머지 3개의 투여 군에서 유의적 관찰은 없었지만 거의 동일하게 측정되었다(Table 6, Table 8).

Bone volume의 결과에서 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군(0.4931 ± 0.0256 cm²), G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(0.4745 ± 0.0554 cm²)은 G1 normal vehicle control 군(0.4806 ± 0.0674 cm²)과 거의 차이가 없었다. Fat in tissue에서 유의적 관찰은 없었지만, G2 HFD vehicle control 군($38.7405 \pm 3.4035\%$)에 비해 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군($35.2968 \pm 4.1011\%$), G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군($33.7106 \pm 5.6155\%$)만이 감소하였다(Table 8).

천연작물을 이용한 항비만 실험에서는 caffeine과 같은 페놀 화합물이 지질 축적에 억제 역할을 하는 것이 밝혀졌다. 천연작물에 포함된 화합물질은 혼합물의 형태로 chlorogenic acid, rutin 및 quercetin 등 지방의 조절에 효과가 있음이 밝혀졌다(Ohara *et al.*, 2015). 특히, 페놀성 화합물 중 C/EBP β ,

C/EBP α , PPAR γ , FAS와 같은 지방산 합성과 관련된 단백질 발현 억제 및 특정 타겟에 대해 보고된 바 있다(Park, 2015). 본 연구에서도 3T3-L1 세포주를 이용한 *in vitro*에서 감국 추출물 및 감국 배양액의 지방구세포 분화억제 효과를 확인하였다.

<Table 6> Body fat mass and lean mass (value) in control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for 8 weeks.

				Value (g)			
Group				Total mass	BMC	Fat	Lean
Normal diet	G1	N	Mean	26.4709**	0.7945	6.1012**	19.5751
	vehicle control	5	SD	1.1848	0.1114	1.2540	0.9731
HFD	G2	N	Mean	35.7668	0.8409	13.5717	21.3542
	vehicle control	8	SD	1.9725	0.0797	1.7576	0.9272
	G3	N	Mean	34.1802	0.8152	11.8517	21.5133
	GC 400 mg/kg	8	SD	2.5784	0.0423	2.1687	0.9744
	G4	N	Mean	36.8405	0.8447	14.2209	21.7749
	CI 300 mg/kg	8	SD	2.0066	0.0578	2.1651	1.4344
	G5	N	Mean	30.9005**	0.7845	10.3022*	19.8138
	CILL 300 mg/kg	8	SD	4.1264	0.0915	2.8813	1.8010

BMC: Bone mineral content. Significant difference from G2 HFD vehicle control group by One-way ANOVA followed by the Dunnett's test:

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

<Table 7> Body fat mass and lean mass (percent) in control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for 8 weeks.

				Percent (%)			
Group				Total mass	BMC	Fat	Lean
Normal diet	G1 vehicle control	N	Mean	100.00	2.9970**	22.9696**	74.0333**
		5	SD	0.00	0.3570	4.2332	4.3360
HFD	G2 vehicle control	N	Mean	100.00	2.3493	37.8282	59.8226
		8	SD	0.00	0.1471	3.2933	3.3701
	G3 GC 400 mg/kg	N	Mean	100.00	2.3954	34.4559	63.1487
		8	SD	0.00	0.2016	4.0489	3.9201
	G4 CI 300 mg/kg	N	Mean	100.00	2.2983	38.4828	59.2189
		8	SD	0.00	0.1915	4.4760	4.5095
	G5 CILL 300 mg/kg	N	Mean	100.00	2.5544	32.8511	64.5944
		8	SD	0.00	0.2556	5.4785	5.4475

Significant difference from G2 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: ***p*<0.01.

<Table 8> Body fat mass and lean mass in control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for 8 weeks.

Group				BMD (g/cm ²)	Bone area (cm ²)	Bone volume (cm ²)	Fat in tissue (%)
Normal diet	G1 vehicle control	N	Mean	0.0928	8.5523	0.4806	23.6828**
		5	SD	0.0117	0.4468	0.0674	4.3898
	G2 vehicle control	N	Mean	0.0965	8.7011	0.5086	38.7405
		8	SD	0.0057	0.3761	0.0482	3.4035
HFD	G3 GC 400 mg/kg	N	Mean	0.0935	8.7199	0.4931	35.2968
		8	SD	0.0032	0.4353	0.0256	4.1011
	G4 CI 300 mg/kg	N	Mean	0.1039	8.3252	0.5109	39.3894
		8	SD	0.0182	1.3415	0.0349	4.5960
	G5 CILL 300 mg/kg	N	Mean	0.0936	8.3727	0.4745	33.7106
		8	SD	0.0090	0.4946	0.0554	5.6155

BMD: Bone mineral density. Significant difference from G2 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test:
 ** $p < 0.01$.

5. 장기 무게

부검 전 측정된 절식 체중 결과에서 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(28.44 ± 4.00 g)이 G2 HFD vehicle control 군(33.04 ± 1.97 g)과 비교하여 유의하게 체중이 감소하였고, 적출한 간의 절대 중량에서도 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(0.7748 ± 0.0849 g)이 G2 HFD vehicle control 군(0.8716 ± 0.0342 g)과 비교하여 간 절대 중량이 유의하게 감소하였다.

간 절대 중량에서 G1 normal vehicle control 군(0.9748 ± 0.0540 g), G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군(0.8514 ± 0.0525 g)과 비교해서 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(0.7748 ± 0.0849 g)이 낮게 측정되었다. 더불어 간 조직의 상대 중량 결과에서도 유의한 차이를 확인할 수 없었다(Table 9).

부고환 지방의 절대 중량 및 상대 중량 결과에서 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군이 G2 HFD vehicle control 군과 비교하여 감소하는 경향을 보였지만 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또한, G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군(1.6998 ± 0.4519 g)과 비교해서 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(1.3671 ± 0.06018 g)이 낮게 측정이 되었다. 부고환 상대 중량 결과에서도 비슷한 결과가 나왔다(Table 9).

간에서 감국 배양액이 지방구세포 분화억제 효과 및 분화된 지방구세포 감소로 간의 무게를 줄였다는 것으로 추측할 수 있었으며, *G. cambogia* (G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군)보다 절식 체중에서 효과가 탁월한 것으로 나타났다. 하지만, 부고환 중량에서는 G1 normal vehicle control 군보다 높게 측정되었는데, 이는 신체 장기 부위별에 대한 단계별 중량감소의 차이로 볼 수 있으며, 감국 배양액(G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군)이 각각의 해당 장기의 중량에 미치는 시기 및 영향에 관한 추가 연구가 필요할 것으로 추측되어진다.

<Table 9> Absolute organ weight (g) and relative organ weight (organ weight/body weight ratio) at the time of sacrifice in control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for 8 weeks.

Group				Body weight (g)	Absolute organ weight (g)		Relative organ weight	
					Liver	Epididymal fat	Liver	Epididymal fat
Normal diet	G1	N	Mean	23.58**	0.9748*	0.4380**	0.0413**	0.0184**
	vehicle control	5	SD	1.21	0.0540	0.1323	0.0008	0.0045
HFD	G2	N	Mean	33.04	0.8716	1.9216	0.0264	0.0579
	vehicle control	8	SD	1.97	0.0342	0.2969	0.0010	0.0062
	G3	N	Mean	31.71	0.8514	1.6998	0.0269	0.0530
	GC 400 mg/kg	8	SD	2.53	0.0525	0.4519	0.0009	0.0106
	G4	N	Mean	34.32	0.9020	2.2302	0.0263	0.0645
	CI 300 mg/kg	8	SD	2.00	0.0503	0.5026	0.0010	0.0117
	G5	N	Mean	28.44**	0.7748**	1.3671	0.0274	0.0463
	CILL 300 mg/kg	8	SD	4.00	0.0849	0.6018	0.0014	0.0155

Significant difference from G2 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test:

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

6. 혈청학적 검사

실험물질 투여 종료 후 전 개체의 혈액으로부터 혈청을 분리하여 분석한 결과, T-Chol 측정 결과에서 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군(135.13 ± 11.86 mg/dL)과 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군(133.38 ± 9.26 mg/dL)이 G2 HFD vehicle control 군(151.13 ± 11.32 mg/dL)과 비교하여 유의하게 T-Chol 수치가 감소하였다. HDL-C 측정 결과에서는 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군(88.75 ± 3.45 mg/dL)이 G2 HFD vehicle control 군(94.00 ± 3.63 mg/dL)과 비교 시 HDL-C 수치가 유의한 수준으로 감소하였다. T-Chol 수치를 제외한 다른 항목에서 전반적으로 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군이 G2 HFD vehicle control 군과 비교하여 수치가 감소하는 경향을 보였지만 유의한 차이는 확인할 수 없었다(Table 10).

또 다른 유의적 차이를 확인하기 G1 normal vehicle control 군과의 유의성을 확인해 보았다. AST 측정 결과 G2 HFD vehicle control, G4 HFD CI 300 mg/kg, G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군에서 유의성 차이($p < 0.01$)를 확인했다(Figure 28). T-Chol 측정 결과에서 G2 HFD vehicle control, G4 HFD CI 300 mg/kg 투여 군에서 $p < 0.001$ 의 유의성 차이와 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군에선 $p < 0.05$ 의 유의성 차이를 확인할 수 있었다(Figure 31). HDL-C 측정 결과에서 G2 HFD vehicle control, G4 HFD CI 300 mg/kg 투여 군에서 $p < 0.001$ 의 유의성 차이와 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군에선 $p < 0.01$ 의 유의성 차이를 확인할 수 있었다(Figure 32). ALT, TG, LDL-C 측정에서는 G1 HFD vehicle control 군과 비교해서 ALT 측정 결과에서 G4 HFD CI 300 mg/kg 투여 군만 높게 측정되고 나머지 군들은 낮게 측정되었으나, 유의한 차이를 볼 수 없었다. TG, LDL-C 측정 결과에서 G2 HFD vehicle control 군만 높게 측정되고 다른 군들은 비슷하거나 낮게 측정이 되었으며 유의적 차이를 확인 할 수 없었다(Figure 29, Figure 30, Figure 33).

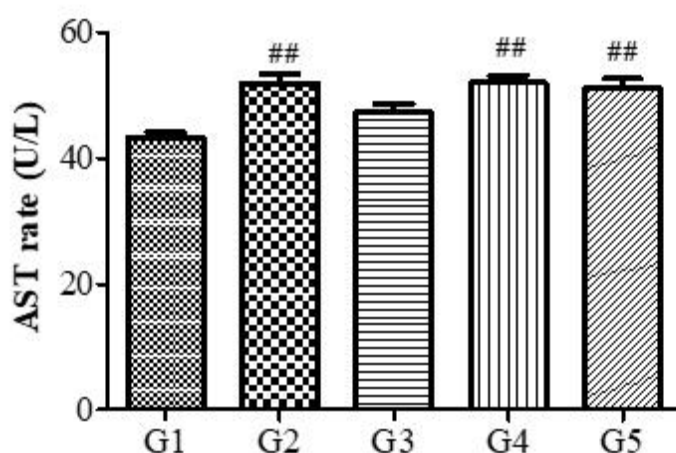
혈중 콜레스테롤은 동맥경화 및 심장병의 가장 위험한 요소로 총 콜레스

테롤의 양으로 위험도를 측정한다. 콜레스테롤은 지질의 한 종류로 소수성 성질을 가진 스테로이드 계열의 유기물이며, 세포막의 구조를 형성하는 필수성분이기 때문에 모든 동물세포에서 생합성 된다(Kim & Nam, 2020). 콜레스테롤의 하루 적정 섭취량은 300 mg으로 고기류 또는 식용유와 같은 지방에 함유되어 있으며, 소금과 같은 조미료를 통해 혈중 콜레스테롤 수치를 높이고, 고지혈증이나 고혈압 등의 질환을 발생시킨다(Perini *et al.*, 2019). 혈중 콜레스테롤 수치가 200 mg/dL 이상으로 높아지면 고콜레스테롤 혈증으로 진단되며 식이요법, 운동 및 금연과 같은 활동으로 혈중 콜레스테롤 양을 조절하여 콜레스테롤을 조절한다(Kim & Nam, 2020; Zwickl *et al.*, 2020). 성인을 기준으로 정상 혈중 콜레스테롤의 양은 200 mg/dL 미만이며, 200~239 mg/dL는 경계선, 240 mg/dL은 고위험군에 속한다. 혈중 지질에 대한 관찰은 콜레스테롤, TG, HDL-C, LDL-C, T-Chol/HDL 수치로 평가하며, 콜레스테롤 수치를 낮추기 위해 가급적 섬유소가 많이 포함된 식품, 기능성 식품 또는 약물 등을 복용하여 조절한다(Liang *et al.*, 2017). 본 연구에서 진행된 감국 배양액은 G2 HFD vehicle control 군에서 확인되는 높은 콜레스테롤 수치를 G1 normal vehicle control 군에 근접하게 낮춰준 것으로 확인할 수 있으며, 이는 콜레스테롤 조절 기능이 포함되어 있는 것으로 판단된다.

<Table 10> Measurement of blood chemistry in control and HFD fed C57BL/6 mice treated with test materials for 8 weeks.

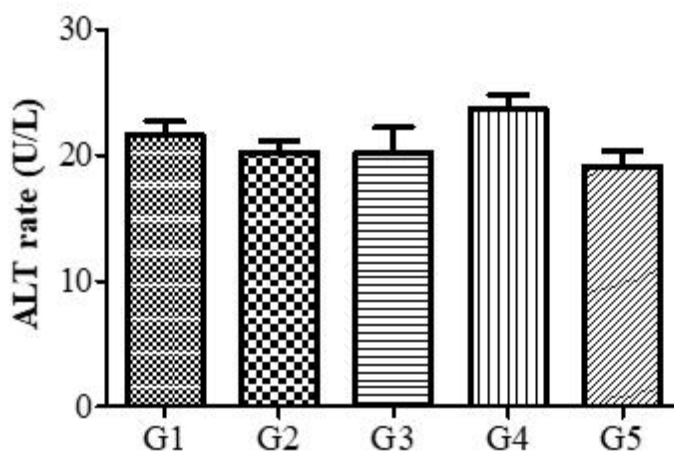
				Blood chemistry					
Group				AST (U/L)	ALT (U/L)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)
Normal diet	G1	N	Mean	43.20**	21.60	114.40**	43.80	83.80**	11.00
	vehicle control	5	SD	2.17	2.51	9.34	7.98	1.79	0.71
HFD	G2	N	Mean	51.88	20.25	151.13	50.38	94.00	12.25
	vehicle control	8	SD	4.36	2.66	11.32	9.36	3.63	1.04
	G3	N	Mean	47.25	20.25	135.13*	45.63	88.75*	11.88
	GC 400 mg/kg	8	SD	4.06	5.63	11.86	7.13	3.45	1.36
	G4	N	Mean	52.00	23.75	148.88	44.38	93.63	12.00
	CI 300 mg/kg	8	SD	3.46	2.92	14.29	6.86	5.01	0.93
	G5	N	Mean	51.13	19.13	133.38*	41.75	90.88	11.00
	CILL 300 mg/kg	8	SD	4.22	3.60	9.26	6.96	3.52	0.76

AST: Aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase, T-Chol: Total cholesterol, TG: Triglycerides, HDL-C: HDL-cholesterol, LDL-C: LDL-cholesterol. Significant difference from G2 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



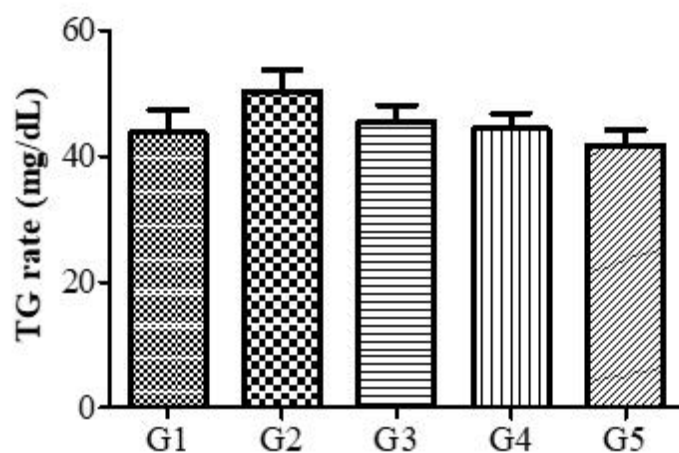
<Figure 28> Change in the AST rates in the blood of C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts.

G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. AST, Aspartate aminotransferase. The data represent typical result and are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. Significant difference from G1 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: ## p <0.01.



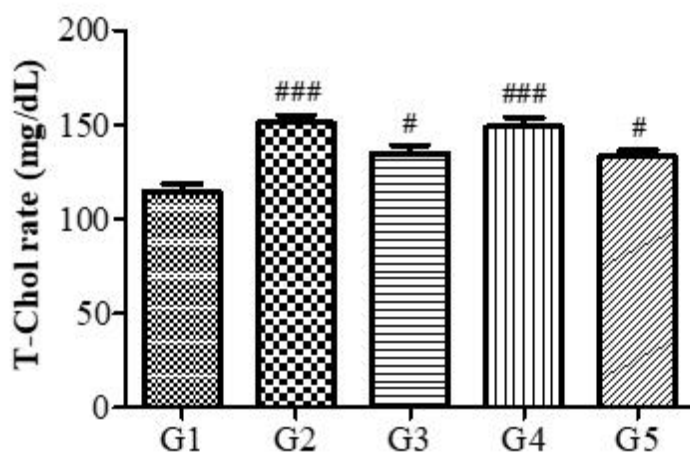
<Figure 29> Change in the ALT rates in the blood of C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts.

G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. ALT, Alanine aminotransferase. The data represent typical result and are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. Significant difference from G1 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: ns.



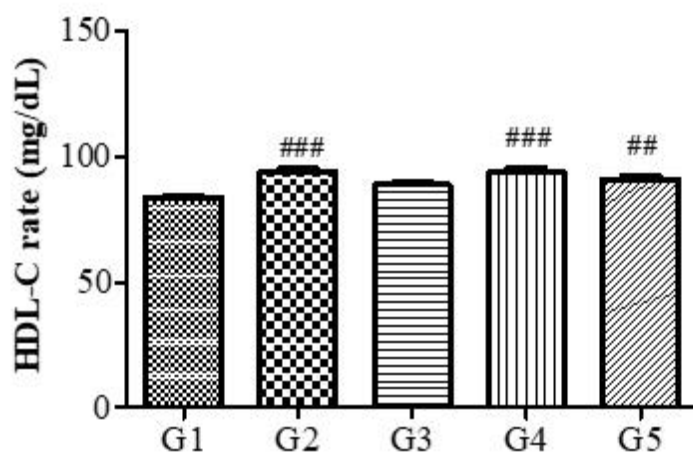
<Figure 30> Change in the TG rates in the blood of C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts.

G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. TG, Triglycerides. The data represent typical result and are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. Significant difference from G1 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: ns.



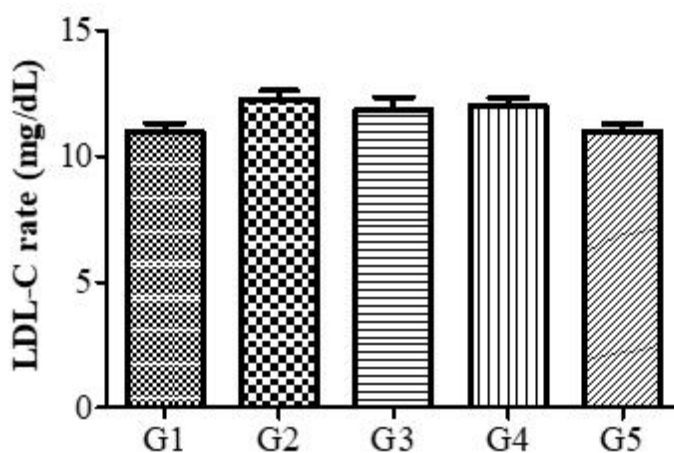
<Figure 31> Change in the T-Chol rates in the blood of C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts.

G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. T-Chol, Total cholesterol. The data represent typical result and are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. Significant difference from G1 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: # p <0.05, ### p <0.001.



<Figure 32> Change in the HDL-C rates in the blood of C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts.

G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. HDL-C, HDL-cholesterol. The data represent typical result and are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. Significant difference from G1 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: ## p <0.01, ### p <0.001.



<Figure 33> Change in the LDL-C rates in the blood of C57BL/6 mice upon the oral administration with different extracts.

G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. LDL-C, LDL-cholesterol. The data represent typical result and are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. Significant difference from G1 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: ns.

7. 혈액내의 T 세포의 변화

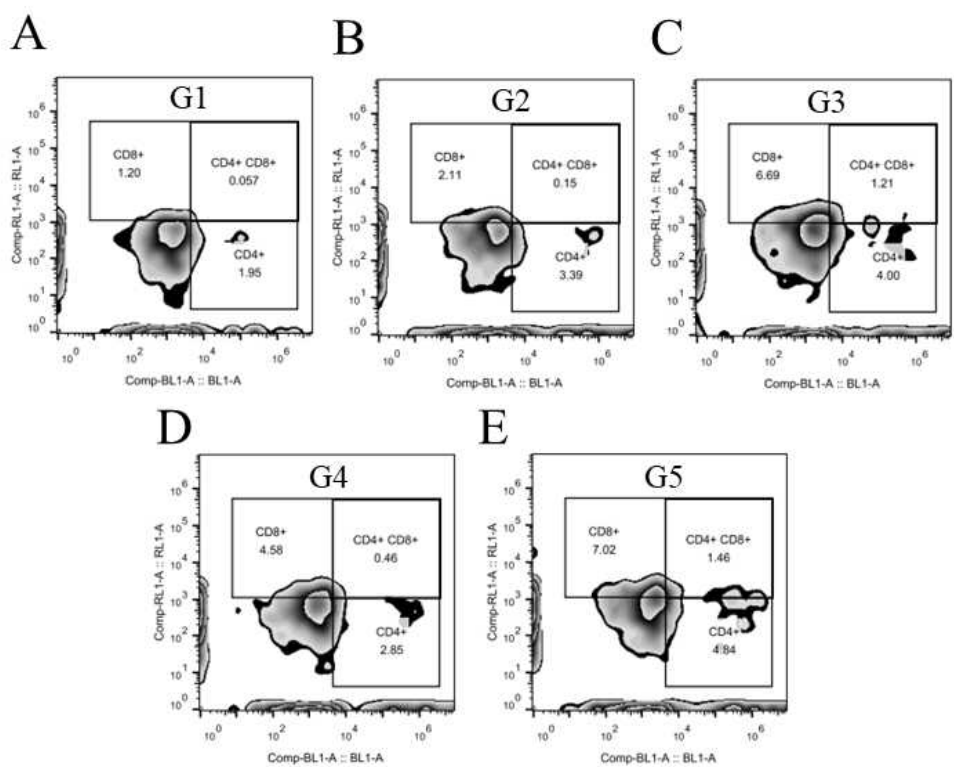
FACS 기기 분석을 통해 T 세포의 분포도를 확인했다. CD8+ T 세포에 allophycocyanin (APC) 형광이 conjugation 되어 있어 분포도가 넓어지면 red-laser (RL)1-A 부분의 CD8+ 의 부분에 RL1-A 수치와 형광 면적이 넓어진다. CD4+ T 세포의 FITC 형광을 conjugation 시켜 BL1-A 부분의 CD4+ 의 부분의 BL1-A 수치가 올라가면서 형광 면적이 넓어진다. CD4+CD8+ T 세포가 동시에 conjugation 되면 CD4+CD8+ 부분에 형광 면적이 넓혀지고 수치가 상승한다. 수치값은 CD45 와 CD3ε 대비 %로 나타냈다. G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군과 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군에서 CD4+CD8+ (double positive) T 세포가 각 $1.21 \pm 0.91\%$, $1.46 \pm 0.81\%$ 로 높게 나왔으며, CD4+ T 세포가 각 $4.00 \pm 1.00\%$, $4.84 \pm 1.33\%$, CD8+ T 세포는 $6.69 \pm 2.68\%$, $7.02 \pm 2.26\%$ 로 G2 HFD vehicle control 군에 비해 전부 높게 측정 되었다(Figure 34).

G1 normal vehicle control 군부터 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군까지 마우스 혈액에서 T 세포의 분포를 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포의 분포를 확인한 결과, CD4+ T 세포는 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군과 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군에서 유의성 있는 차이($p < 0.01$)를 확인할 수 있었다(Figure 35). CD8+ T 세포는 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군과 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군에서 유의성 있는 차이($p < 0.01$ & $p < 0.001$)를 발견할 수 있었다(Figure 36). CD4+CD8+ T 세포도 G3 HFD GC 400 mg/kg 투여 군과 G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군에서 유의성 있게 증가되는 것을 확인했다($p < 0.01$, Figure 37).

CD4+ T 세포는 특정 면역 반응을 하향 조절하는 것으로 알려져 있다. 만성염증 및 알레르기 질환, 자가 면역 및 종양 질환에서 T 세포의 역할은 이미 다양한 연구를 통해 발표되었다(Janssens *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2016). CD4+ T 세포는 T cell antigen receptor (TCR) 인식에 의해 활성화되고 분화 및 생존을 위해 cytokine interleukin (IL)-2을 조절한다. 주로

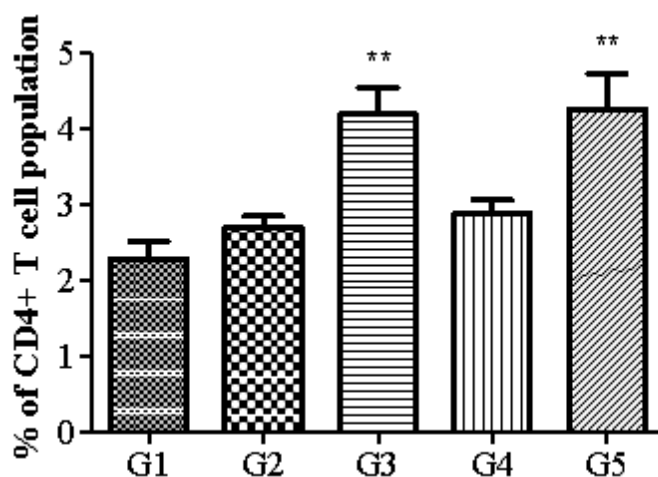
IL-10을 생산함으로써 생체 내에서 작용하는 T helper type 1 (Th1) 세포는 미성숙 수지상 세포 (dendritic cell, DC) 또는 IL-10 및 interferon (IFN)- α 의 존재하에 비장 세포에서 생성된다(Chauvat *et al.*, 2014). Th3 세포는 T 세포 면역 반응을 하향 조절하고 주로 transforming growth factor β (TGF- β)의 생산에 의해 작동한다. 또한, transcription factor forkhead homeobox type protein O1 (FoxO1)은 지방구세포를 사멸시키고, 영양을 제한시키며 지질 이화 작용을 통해 전사를 제어한다(Kandror, 2017; Tan *et al.*, 2014). 특히, 기억 T 세포의 발달에서 FoxO1의 발현은 매우 중요하며, FoxO1 인자가 지방 분해를 촉진하면서 T 세포의 발달을 촉진 한다고 알려져 있다(Fabre *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2012).

감국 배양액(G5 HFD CILL 300 mg/kg 투여 군)에서 FoxO1의 증가는 확인하진 못했으나, CD4+, CD8+, CD4+ CD8+ T 세포의 증가는 지방분해를 촉진하는 역할을 했을 것으로 판단되며, 추후 감국 배양액이 이와 관련이 있는지 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.



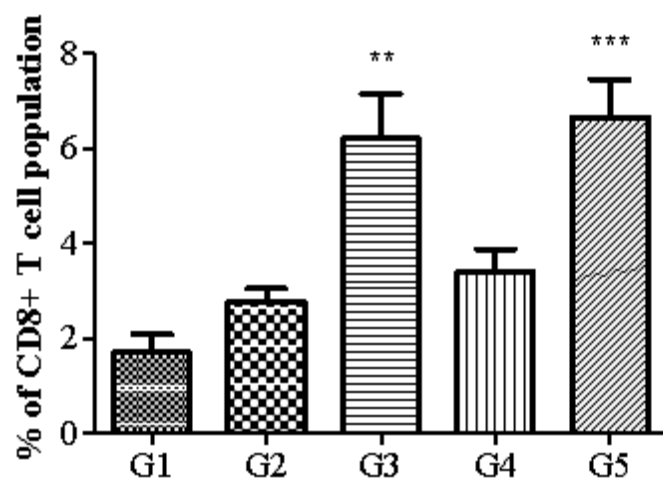
<Figure 34> Change in the T cell population in mice blood with oral administration of different extracts.

A. G1 Normal vehicle control; B. G2 HFD Vehicle control; C. G3 HFD GC 400 mg/kg; D. G4 HFD CI 300 mg/kg; E. G5 HFD CILL 300 mg/kg.



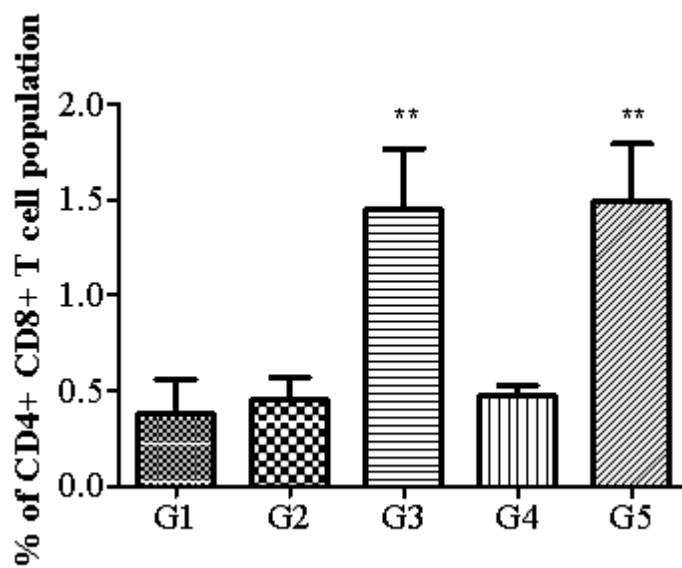
<Figure 35> Change in the CD+ 4 T cell population in mice blood upon the oral administration of extracts.

G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. The data represent typical result and are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. Significant difference from G2 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: ** $p<0.01$.



<Figure 36> Change in the CD8+ T cell population in mice blood upon oral administration of extracts.

G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. The data represent typical result and are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. Significant difference from G2 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test: ** p <0.01, *** p <0.001.



<Figure 37> Change in the CD4+CD8+ T cell population in mice blood upon the oral administration of extracts.

G1, Normal vehicle control; G2, HFD vehicle control; G3, HFD GC 400 mg/kg; G4, HFD CI 300 mg/kg; G5, HFD CILL 300 mg/kg. The data represent typical result and are presented as the mean±SD of three independent experiments. Significant difference from G2 HFD vehicle control group by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test:: ** $p < 0.01$.

제4장 결론

Camphor은 *Cinnamomum camphora*, *Dryobalanops aromatica*, *Ocotea ambarensis*, *Ocimum kilimandscharicum*에서 증류하여 얻을 수 있는 monoterpene류의 휘발성 물질로서 오래전부터 식품첨가물, 화장품 향료 등으로 사용되어져 왔다. 3T3-L1 세포주에 대한 camphor의 세포독성을 확인하였다. qRT-PCR 수행으로 Hedgehog 신호의 *Smo*, *Gli1*, lipogenesis 신호의 *Ppar γ* , *C/ebpa*, *Fas*, *Adipoq*를 mRNA 수준을 비교했다. 또한, ORO염색을 통해 지방구세포의 분화를 확인하였다.

Camphor를 함유하는 대표적인 천연작물로 감국을 실험에 사용하였고, 감국 내의 물질들의 생리활성의 변화를 주기 위해 유산균을 활용해 발효를 진행했다. 감국의 꽃 부분을 80% ethanol에서 추출하여 감국 추출물을 제조한 후 감국 추출물을 11종의 유산균으로 발효시켜 감국 배양액을 만들었으며, pH, OD₆₀₀값과 3T3-L1 세포주에서의 세포독성을 확인하였다. 감국 배양액과 감국 추출물에서의 세포분화를 ORO 염색과 510nm 흡광도를 측정하여 확인하였다. 또한, 세포분화 시 증가되는 Hedgehog, lipogenesis 신호 관련 단백질 발현과 FACS 기기분석을 통해 세포분화와 GLI1의 단백질 발현 수준을 측정하였다. siRNA를 활용하여 *Ptch-Smo*로 이어지는 유전자의 발현을 확인하였다. 고지방식이를 통해 비만 유도된 C57BL/6 mice에 8주간 *G. cambogia*, 감국 추출물, 감국 배양액을 섭취시켜 매주 체중, 사료 섭취량을 측정, 마지막 8주에 body fat mass, 혈청학적 검사, T 세포의 분포도를 확인하였다. 결과를 다음과 같이 정리했다.

첫째, Camphor에 대한 3T3-L1 세포주에 대한 독성 분석으로 500 mM까지 처리해도 세포에서의 독성을 찾을 수 없었다. 분화 10일까지의 세포독성을 살펴본 바 250 mM이 적정 농도로 결론을 내렸다.

둘째, qRT-PCR로 lipogenesis 신호의 일종인 *Ppar γ* , *C/ebpa*, *Fas*,

*Adipoq*의 유전자 발현 수준은 camphor 처리 시 발현이 낮아졌으며, Hedgehog 신호 계열인 *Smo*, *Gli1* 유전자 발현 수준은 증가했으며, *C/ebpa*, *Smo*, *Gli1*에서 두 군과의 유의성을 확인하였다. ORO염색에서 camphor 처리 시 지방구세포의 분화가 억제되는 것을 육안으로 확인할 수 있었다.

셋째, 총 11종의 군주 중에서 감국 추출물에서의 pH, 세포독성, 유산균 수의 증식을 고려해 KCTC 3115 및 KCTC 3237, KCTC 3074, KCTC 3109가 선별되었다. 선별된 4종의 감국 배양액은 FACS 분석의 Q8의 분포도를 통해 지방구세포 분화의 감소를 확인했으며, 감국 추출물의 Akt 신호 활성을 확인했다. 이를 근거로 ORO 염색으로 지방구세포의 분화 억제를 확인하고 수치화 시켰으며, 감국 추출물, KCTC 3115, KCTC 3109, KCTC 3074, KCTC 3237에서 유의성을 확인했다.

넷째, Hedgehog 신호인 *GLI2*의 단백질 발현을 확인하고 수치화했다. 특히 KCTC 3115와 KCTC 3237에서 유의성을 확인했고, 감국 추출물과 KCTC 3115 및 KCTC 3237, KCTC 3074에서 분화가 억제되는 것을 확인하였다. 또한, KCTC 3074, KCTC 3109, KCTC 3115가 lipogenesis 신호와 관련 있는 단백질 발현에서 AMPK, FAS, C/EBPα는 감소, pACC가 강하게 발현되는 것을 확인하였다. 따라서 Hedgehog 신호와 lipogenesis 신호를 동시에 조절하는 감국 배양액은 KCTC 3115 인 것을 확인하였다. Camphor를 포함한 FACS 기기 분석을 통해 *GLI1*의 단백질 발현을 확인, 감국 배양액 중 KCTC 3237의 *GLI1*의 단백질 발현 수준이 camphor 만큼 높다는 것을 확인했다.

다섯째, siRNA를 통해서 Hedgehog 신호인 *Ptch-Smo*의 메커니즘을 확립하였다. 상대적으로 Hedgehog 신호를 KCTC 3115 보다 강하게 단백질 발현을 유도한 KCTC 3237에 대해서 추가적으로 PTCH, SMO, *GLI1*에 대해 확인하였고, 이는 camphor와 비슷하게 *GLI1*의 단백질을 발현시킨다는 것을 확인하였다. Hedgehog 신호에서 KCTC 3115, KCTC 3237는 *GLI1*, 2를 다른 감국 배양액에 비해 강하게 활성화시킨다. 그리고 Hedgehog 신호

와 lipogenesis 신호를 동시에 효과적으로 조절하는 유산균 감국 배양액은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 3115로 확인했다.

여섯째, 고지방식이를 통해 비만 유도된 C57BL/6 mice의 변화를 보기 위해 *L. lactis*를 활용해 감국 배양액을 제조해 섭취시켰다. 측정결과 *G. cambogia*과 비교해서 체중은 감소를 보였으며, body fat mass 중량에서도 동일한 또는 감소를 보였다. 혈액내의 T세포의 분포도에서 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, CD4+CD8+ T세포 측정에서 감국 *L. lactis* 배양액이 *G. cambogia*보다 유의성 있게 증가되었다.

본 연구에서 감국 추출물과 감국 배양액의 *in vitro*로 Hedgehog 신호를 통해서 지방구세포의 감소와 *in vivo*를 통해서 체중의 변화와 T 세포의 분포도를 확인하였다. 결론적으로 camphor, 감국 배양액이 감국 추출물보다 Hedgehog 신호를 잘 조절했으며, 감국 배양액 중 감국 *L. lactis* 배양액이 Hedgehog 신호와 lipogenesis 신호를 효과적으로 조절했다. 또한, 비만 유도된 C57BL/6 mice의 식이섭취를 통해서 체중의 감소를 확인했다. 기존의 비만억제 연구와는 다른 세포신호를 통해 camphor, 감국 추출물, 감국 배양액의 비만억제의 효과를 확인했다. 또한, 감국 추출물보다 유산균을 활용해 발효를 진행했을 경우 그 효과가 더욱 높게 나타났으며, camphor의 활용을 더욱 넓힐 수 있는 계기를 마련하였다.

그러나 적정 복용량과 8주 이상의 장기간 복용 및 단시간의 과복용 시 뇌, 간, 신장 등 신체 장기 일부분에 미치는 영향에 대한 후속연구가 필요하며, 이런 이유로 camphor를 비롯한 감국 추출물과 감국 배양액에 대한 임상 실험이 요구된다. 또한, 감국 배양액의 경우 4일 이상의 장기간 발효를 진행했을 때 나타났을 수 있는 반응과 암세포와 지방구세포와의 Hedgehog 신호의 상호 연관성에 대한 검증이 필요할 것이다.

GC-MS 분석과 HPLC 등의 기기분석 등을 통해서 감국에 함유된 camphor를 포함한 여러 물질들에 대한 유산균 발효 후 분자의 구조변화, 생리 활성변화, 함량변화 확인과 감국 배양액에서 비만억제 관련 특정물질의

선별에 대한 추가 연구가 필요하며, 임상 또는 8주 이상의 복용 및 이미 비만으로 판정된 실험동물을 대상으로 지방의 분해와 투여량에 따른 비만억제 효과를 검증해 본다면 비만억제 식품시장에서 기존에 출시되지 않았던 Hedgehog 신호를 주 타겟으로 한 상품으로서 시장 확보가 가능할 것으로 판단된다. 더불어 감국 추출물 및 감국 *L. lactis* 배양액의 동결건조 과정과 순간적인 열로 건조가 가능한 spray dry (SD)과정과의 물질 변화와 양의 차이가 없다면, 공정과정 단순화를 통해 비용 절감이 가능하다고 여겨지며, 감국을 재배하는 국내농가에 새로운 시장을 제공해 줄 것이라 추측된다.

이외에 위에서 열거한 추가연구를 통해서 현재의 문제점을 개선한다면, 감국 추출물과 감국 배양액을 활용한 비만억제 의약품으로서 응용이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 31(6):877-902.
- Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5):2001-2005.
- Bang BH, Paik JK, Choi JY, Jeong EJ, Rhee MS, Yi DH. 2015. Study on quality characteristics of Korean traditional Kukhwaju by addition of dried *Chrysanthemum indicum* L. extract into mash. *Journal of the Korean Society of Food Science & Nutrition*. 44(9):1333-1338.
- Bhathena J, Martoni C, Kulamarva A, Urbanska AM, Malhotra M, Prakash S. 2009. Orally delivered microencapsulated live probiotic formulation lowers serum lipids in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Medicinal Food*. 12(2):310-319.
- Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V, Steele JL. 2010. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *Journal of Bacteriology*. 192(9):2445-2458.
- Cao Z, Umek RM, McKnight SL. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & Development*. 5(9):1538-1552.
- Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr T. 2018. A highlight on Sonic Hedgehog pathway. *Cell Communication and Signaling*. 16(1):11.

- Carpenter RL, Ray H. 2019. Safety and tolerability of Sonic Hedgehog pathway inhibitors in cancer. *Drug Safety*. 42(2):263-279.
- Caruso G, Distefano DA, Parlascino P, Fresta CG, Lazzarino G, Lunte SM, Nicoletti VG. 2017. Receptor-mediated toxicity of human amylin fragment aggregated by short- and long-term incubations with copper ions. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 425(1-2):85-93.
- Cha JY, Nepali S, Lee HY, Hwang SW, Choi SY, Yeon JM, Song BJ, Kim DK, Lee YM. 2018. *Chrysanthemum indicum* L. ethanol extract reduces high-fat diet-induced obesity in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 15(6):5070-5076.
- Chamchoy K, Pakotiprapha D, Pumirat P, Leartsakulpanich U, Boonyuen U. 2019. Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochemistry*. 20(1):4.
- Chauvat A, Benhamouda N, Gey A, Lemoine FM, Paulie S, Carrat F, Gougeon ML, Rozenberg F, Krivine A, Cherai M, Lehmann Pth, Quintin-Colonna F, Launay O, Tartour E. 2014. Clinical validation of INF γ /IL-10 and INF γ /IL-2 FluoroSpot assays for the detection of Tr1 T cells and influenza vaccine monitoring in humans. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 10(1):104-113.
- Chen J, Bao C, Kim JT, Cho JS, Qiu S, Lee HJ. 2018a. Sulforaphene inhibition of adipogenesis via Hedgehog signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66(45):11926-11934.
- Chen LH, Chen YH, Cheng KC, Chien TY, Chan CH, Tsao SP, Huang HY. 2018b. Antiobesity effect of *Lactobacillus reuteri* 263

- associated with energy metabolism remodeling of white adipose tissue in high-energy-diet-fed rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 54:87–94.
- Chen R, Chen W, Chen H, Zhang G, Chen W. 2018c. Comparative evaluation of the antioxidant capacities, organic acids, and volatiles of papaya juices fermented by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Quality*. 2018:1–12.
- Chen W, Vermaak I, Viljoen A. 2013. Camphor—a fumigant during the black death and a coveted fragrant wood in ancient Egypt and Babylon—a review. *Molecules*. 18(5):5434–5454.
- Chen Y, Sasai N, Ma G, Yue T, Jia J, Briscoe J, Jiang J. 2011. Sonic Hedgehog dependent phosphorylation by CK1 α and GRK2 is required for ciliary accumulation and activation of smoothened. *PLoS Biology*. 9(6):e1001083.
- Chooi YC, Ding C, Magkos F. 2019. The epidemiology of obesity. *Metabolism Clinical and Experimental*. 92:6–10.
- Chou ST, Hsiang CY, Lo HY, Huang HF, Lai MT, Hsieh CL, Chiang SY, Ho TY. 2017. Exploration of anti-cancer effects and mechanisms of Zuo-Jin-Wan and its alkaloid components in vitro and in orthotopic HepG2 xenograft immunocompetent mice. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. 17(1):121.
- Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF. 2005. Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature*. 437(7061):1018–1021.
- Cui S, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2016. High-density culture of *Lactobacillus plantarum* coupled with a lactic acid removal system

- with anion-exchange resins. *Biochemical Engineering Journal*. 115:80-84.
- Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS letters*. 436(1):71-75.
- de la Garza AL, Milagro FI, Boque N, Campion J, Martinez JA. 2011. Natural inhibitors of Pancreatic Lipase as new players in obesity treatment. *Planta Medica*. 77(8):773-785.
- De Pasquale I, Pontonio E, Gobbetti M, Rizzello CG. 2020. Nutritional and functional effects of the lactic acid bacteria fermentation on gelatinized legume flours. *International Journal of Food Microbiology*. 316:108426.
- De Vuyst L, Leroy F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 13(4):194-199.
- DesMarais TL, Costa M. 2019. Mechanisms of chromium-induced toxicity. *Current Opinion in Toxicology*. 14:1-7.
- Devi A, Konerira Aiyappaa AA, Waterhouse AL. 2020. Adsorption and biotransformation of anthocyanin glucosides and quercetin glycosides by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* in model wine solution. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 100(5):2110-2120.
- Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, Wang YY, Meulle A, Salles B, Le Gonidec S, Garrido I, Escourrou G, Valet P, Muller C. 2011. Cancer-associated adipocytes exhibit an

- activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Research*. 71(7):2455-2465.
- Fabre S, Lang V, Harriague J, Jobart A, Unterman TG, Trautmann A, Bismuth G. 2005. Stable activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the T cell immunological synapse stimulates Akt signaling to FoxO1 nuclear exclusion and cell growth control. *The Journal of Immunology*. 174(7):4161-4171.
- Grzelak CA, Siggelkow ND, McCaughan GW. 2015. GLI2 as a marker of Hedgehog-responsive cells. *Hepatology*. 61(5):1770.
- Gu Y, Becker V, Zhao Y, Menger MD, Laschke MW. 2019. miR-370 inhibits the angiogenic activity of endothelial cells by targeting smoothened (SMO) and bone morphogenetic protein (BMP)-2. *The FASEB Journal*. 33(6):7213-7224.
- Guo LX, Chen G, Yin ZY, Zhang YH, Zheng XX. 2019. p-Syneprine exhibits anti-adipogenic activity by activating the Akt/GSK3 β signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Food Biochemistry*. 43(11):e13033.
- Gupta R, Jeevaratnam K, Fatima A. 2018. Lactic acid bacteria: Probiotic characteristic, selection criteria, and its role in human health (a review). *International Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*. 5(10):411-424.
- Gustafson B, Nerstedt A, Smith U. 2019. Reduced subcutaneous adipogenesis in human hypertrophic obesity is linked to senescent precursor cells. *Nature Communications*. 10(1):2757.
- Hildreth K, Overby H, Kodani S, Morisseau C, Hammock B, Bettaieb A, Zhao L. 2019. Soluble epoxide hydrolase inhibitor t-AUCB promotes murine brown adipogenesis: Role of PPAR Gamma and

- PPAR Alpha (p21-069-19). *Current Developments in Nutrition*. 3(Supplement_1):nzz041.P021-069-019.
- Hirsinger E, Duprez D, Jouve C, Malapert P, Cooke J, Pourquie O. 1997. Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning. *Development*. 124(22):4605-4614.
- Holmes AM, Mackenzie L, Roberts MS. 2020. Disposition and measured toxicity of zinc oxide nanoparticles and zinc ions against keratinocytes in cell culture and viable human epidermis. *Nanotoxicology*. 14(2):263-274.
- Holtz AM, Peterson KA, Nishi Y, Morin S, Song JY, Charron F, McMahon AP, Allen BL. 2013. Essential role for ligand-dependent feedback antagonism of vertebrate Hedgehog signaling by PTCH1, PTCH2 and HHIP1 during neural patterning. *Development*. 140(16):3423-3434.
- Hong CU. 2002. Essential oil composition of *Chrysanthemum boreale* and *Chrysanthemum indicum*. *Applied Biological Chemistry*. 45(2):108-113.
- Hong SM, Chung EC, Kim CH. 2015. Anti-obesity effect of fermented whey beverage using lactic acid bacteria in diet-induced obese rats. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 35(5):653-659.
- Hoyos Cadavid AM, Kaminagakura E, Rodrigues M, Pinto CAL, Teshima THN, Alves FA. 2019. Immunohistochemical evaluation of Sonic Hedgehog signaling pathway proteins (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, and Gli3) in sporadic and syndromic odontogenic keratocysts. *Clinical Oral Investigations*. 23(1):153-159.

- Hu C, Kitts DD. 2004. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 265(1-2):107-113.
- Hujanen M, Linko S, Linko YY, Leisola M. 2001. Optimisation of media and cultivation conditions for l(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. *Applied Microbiology Biotechnology*. 56(1-2):126-130.
- Hwang DI, Choi IH, Kim DY, Park SM, Kim HB, Li Y, Lee HM. 2019. Inhibitory effects of *Chrysanthemum boreale* Makino on 3T3-L1 preadipocyte differentiation and down-regulation of adipogenesis and lipogenesis. *Journal of Life Science*. 29(3):332-336.
- Hwang SW, Lee HY, Cha JY, Kim BR, Park M, Lee BR, Moon KH, Lee JH, Kim DG, Kim W, Jeong KO, Lee YM. 2017. Antioxidant activity and inhibition activity against α -glucosidase and PTP1B of *Chrysanthemum indicum* L. extract and fractions. *Journal of the East Asian Society of Dietary Life*. 27(2):235-242.
- Hwang YI. 2019. Effect of *Chrysanthemum indicum* Linné extract on melanogenesis through regulation of TGF- β /JNK signaling pathway. *Food science and biotechnology*. 28(5):1577-1582.
- Ingham PW, Nakano Y, Seger C. 2011. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nature Reviews Genetics*. 12(6):393-406.
- Jamal S, Sheppard AJ, Cotterchio M, Gallinger S. 2020. Association between known risk factors and colorectal cancer risk in Indigenous people participating in the Ontario Familial Colon Cancer Registry. *Current Oncology*. 27(4):e395-e398.

- Janssens W, Carlier V, Wu B, VanderElst L, Jacquemin MG, Saint-Remy JM. 2003. CD4⁺ CD25⁺ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *The Journal of Immunology*. 171(9):4604-4612.
- Jemai R, Drira R, Makni M, Fetoui H, Sakamoto K. 2020. Colocynth (*Citrullus colocynthis*) seed extracts attenuate adipogenesis by down-regulating PPAR γ / SREBP-1c and C/EBP α in 3T3-L1 cells. *Food Bioscience*. 33:100491.
- Jeong JH, Mok H, Oh YK, Park TG. 2009. siRNA conjugate delivery systems. *Bioconjugate Chemistry*. 20(1):5-14.
- Jeong SY, Nguyen PH, Zhao BT, Ali MY, Choi JS, Min BS, Woo MH. 2015. Chemical constituents of *Euonymus alatus* (Thunb.) sieb. and their PTP1B and α -glucosidase inhibitory activities. *Phytotherapy Research*. 29(10):1540-1548.
- Jiang T, Shi X, Yan Z, Wang X, Gun S. 2019a. Isoimperatorin enhances 3T3-L1 preadipocyte differentiation by regulating PPAR γ and C/EBP α through the Akt signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 18(3):2160-2166.
- Jiang Y, Ji X, Duan L, Ye P, Yang J, Zhan R, Chen W, Ma D. 2019b. Gene mining and identification of a flavone synthase II involved in flavones biosynthesis by transcriptomic analysis and targeted flavonoid profiling in *Chrysanthemum indicum* L.. *Industrial Crops & Products*. 134:244-256.
- Jiang ZL, Jin H, Liu ZS, Liu MY, Cao XF, Jiang YY, Bai HD, Zhang B, Li Y. 2019c. Lentiviral-mediated Shh reverses the adverse effects of high glucose on osteoblast function and promotes bone

- formation via Sonic Hedgehog signaling. *Molecular Medicine Reports*. 20(4):3265-3275.
- Jung CH, Han AR, Chung HJ, Ha IH, Um HD. 2019. Linarin inhibits radiation-induced cancer invasion by downregulating MMP-9 expression via the suppression of NF- κ B activation in human non-small-cell lung cancer A549. *Natural Product Research*. 33(24):3582-3586.
- Jung HA, Jin SE, Min BS, Kim BW, Choi JS. 2012. Anti-inflammatory activity of Korean thistle *Cirsium maackii* and its major flavonoid, luteolin 5-*O*-glucoside. *Food and Chemical Toxicology*. 50(6):2171-2179.
- Kahan S, Manson JE. 2019. Obesity treatment, beyond the guidelines: Practical suggestions for clinical practice. *JAMA*. 321(14):1349-1350.
- Kandror KV. 2017. Mammalian target of rapamycin complex 1 and FoxO1 in the transcriptional control of lipolysis and *de novo* lipogenesis. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*. 24(5):326-331.
- Karri S, Sharma S, Hatware K, Patil K. 2019. Natural anti-obesity agents and their therapeutic role in management of obesity: A future trend perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 110:224-238.
- Katoh Y, Katoh M. 2009. Hedgehog target genes: Mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant Hedgehog signaling activation. *Current Molecular Medicine*. 9(7):873-886.

- Kim DG, Kim BK, Kim MH. 1994. Effect of reducing sugar content in Chinese cabbage on *Kimchi* fermentation. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 23(1):73-77.
- Kim DS, Goo YM, Cho J, Lee J, Lee DY, Sin SM, Kil YS, Jeong WM, Ko KH, Yang KJ, Kim YG, Kim SG, Kim K, Kim YJ, Kim JK, Shin EC. 2018a. Effect of volatile organic chemicals in *Chrysanthemum indicum* Linné on blood pressure and electroencephalogram. *Molecules*. 23(8):2063.
- Kim JY, Sung KW, Bae HW, Yi YH. 2007. pH, acidity, color, reducing sugar, total sugar, alcohol and organoleptic characteristics of puffed rice powder added *Takju* during fermentation. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 39(3):266-271.
- Kim RH, Song JH, Shon MS, Chun KS, Choi SU, Kim GN. 2016. Evaluation of water extract prepared from *Chrysanthemum indicum* Linne as nutri-cosmetic and cosmetic material *in vitro* model. *Asian Journal of Beauty & Cosmetology*. 14(1):78-88.
- Kim S, Lim SD. 2017. Physiological characteristics and anti-obesity effect of *Lactobacillus plantarum* K6 isolated from *Kimchi*. *Journal of Milk Science and Biotechnology*. 35(4):221-231.
- Kim SJ, Park YM, Jung ST. 2005. Anticariogenic effects and inhibition of glucosyltransferase activity of *Chrysanthemum indicum* L. extracts. *Journal of the Korean Society of Food Culture*. 20(3):341-345.
- Kim SR, Nam SH. 2020. Association between periodontal disease and levels of triglyceride and total cholesterol among Korean adults. *Healthcare (Basel)*. 8(3):337.
- Kim Y, Kim MO, Shin JS, Park SH, Kim SB, Kim J, Park SC, Han CJ, Ryu JK, Yoon YB, Kim YT. 2014. Hedgehog signaling between

- cancer cells and hepatic stellate cells in promoting cholangiocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*. 21(8):2684–2698.
- Kim YA, Keogh JB, Clifton PM. 2018b. Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity. *Nutrition Research Reviews*. 31(1):35–51.
- Kimura H, Ng JM, Curran T. 2008. Transient inhibition of the Hedgehog pathway in young mice causes permanent defects in bone structure. *Cancer Cell*. 13(3):249–260.
- Kumar M, Ando Y. 2003. Single-wall and multi-wall carbon nanotubes from camphor—a botanical hydrocarbon. *Diamond and Related Materials*. 12(10–11):1845–1850.
- Kwak SH, Kim YH. 2018. Anti-adipogenic effect of 1-*O*-feruloyl- β -D-glucose on 3T3-L1 preadipocytes. *The Journal of Korean Society of Food Preservation*. 25(6):689–695.
- Kwon JY, Chegh HS, Song YO. 2004. Weight reduction and lipid lowering effects of *Kimchi* lactic acid powder in rats fed high fat diets. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 36(6):1014–1019.
- Lee HY, Kang RH, Cho SH, Kim SS, Kim YS. 2009. Effects of platycodin D on gene expressions of pro-adipogenic and anti-adipogenic regulators in 3T3-L1 cells. *Journal of Life Science*. 19(12):1802–1807.
- Lee JH, Moon JM, Kim YH, Lee B, Choi SY, Song BJ, Kim DK, Lee YM. 2019a. Effect of enzymatic treatment of *Chrysanthemum indicum* Linné extracts on lipid accumulation and adipogenesis in high-fat-diet-induced obese male mice. *Nutrients*. 11(2):269.
- Lee MR, Kim JE, Choi JY, Park JJ, Kim HR, Song BR, Choi YW, Kim KM, Song H, Hwang DY. 2019b. Anti-obesity effect in

- high-fat-diet-induced obese C57BL/6 mice: Study of a novel extract from mulberry (*Morus alba*) leaves fermented with *Cordyceps militaris*. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 17(3):2185–2193.
- Lee MS, Kim Y. 2020. *Chrysanthemum morifolium* flower extract inhibits adipogenesis of 3T3-L1 cells via AMPK/SIRT1 pathway activation. *Nutrients*. 12(9):2726.
- Lee OH, Seo HC. 2010. Inhibitory effect of antioxidant on brain diseases related reactive oxygen species (ROS) in adipocytes. *Journal of Brain Education*. 6:1–18.
- Levanat S, Musani V, Komar A, Oreskovic S. 2004. Role of the hedgehog/patched signaling pathway in oncogenesis: A new polymorphism in the PTCH gene in ovarian fibroma. *Annals of the New York Academy Sciences*. 1030(1):134–143.
- Lew LC, Choi SB, Khoo BY, Sreenivasan S, Ong KL, Liong MT. 2018. *Lactobacillus plantarum* DR7 reduces cholesterol via phosphorylation of AMPK that down-regulated the mRNA expression of HMG-CoA reductase. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 38(2):350–361.
- Li B, Webster TJ. 2018. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. *Journal of Orthopaedic Research*. 36(1):22–32.
- Li S, Bouzar C, Cottet-Rousselle C, Zagotta I, Lamarche F, Wabitsch M, Tokarska-Schlattner M, Fischer-Posovszky P, Schlattner U, Rousseau D. 2016. Resveratrol inhibits lipogenesis of 3T3-L1 and SGBS cells by inhibition of insulin signaling and mitochondrial

- mass increase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1857(6):643-652.
- Liang Y, Vetrano DL, Qiu C. 2017. Serum total cholesterol and risk of cardiovascular and non-cardiovascular mortality in old age: A population-based study. *BMC Geriatrics*. 17(1):294.
- Lii CK, Lei YP, Yao HT, Hsieh YS, Tsai CW, Liu KL, Chen HW. 2010. *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Reduces the oxidized LDL-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 128(1):213-220.
- Lim H, Seo J, Chang YH, Han BK, Jeong JK, Park SB, Choi HJ, Hwang J. 2014. Anti-obesity effects of Jeju Hallabong tangor (*Citrus kiyomi*×*ponkan*) peel extracts in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 43(11):1688-1694.
- Lim HJ, Cho KH, Choue R. 2005. The effects of functional tea (*Mori folium*, *Lycii fructus*, *Chrysanthemi flos*, *Zizyphi fructus*, *Sesamum semen*, *Raphani semen*) supplement with medical nutrition therapy on the blood lipid levels and antioxidant status with hyperlipidemia. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 34(1):42-56.
- Lin L, Mao X, Sun Y, Rajivgandhi G, Cui H. 2019. Antibacterial properties of nanofibers containing chrysanthemum essential oil and their application as beef packaging. *International Journal of Food Microbiology*. 292:21-30.
- Lin SKC, Du C, Koutinas A, Wang R, Webb C. 2008. Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by

- Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal*. 41(2):128-135.
- Lipinski RJ, Gipp JJ, Zhang J, Doles JD, Bushman W. 2006. Unique and complimentary activities of the Gli transcription factors in Hedgehog signaling. *Experimental Cell Research*. 312(11):1925-1938.
- Liu B, Yang M, Qi B, Chen X, Su Z, Wan Y. 2010. Optimizing l-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. *Biochemical Engineering Journal*. 52(2-3):212-219.
- Lye HS, Kuan CY, Ewe JA, Fung WY, Liong MT. 2009. The improvement of hypertension by probiotics: Effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *International Journal of Molecular Sciences*. 10(9):3755-3775.
- Ma J, Ding Y, Fang X, Wang R, Sun Z. 2012. Protein kinase C- θ inhibits inducible regulatory T cell differentiation via an AKT-Foxo1/3a-dependent pathway. *The Journal of Immunology*. 188(11):5337-5347.
- Matejčková Z, Liptáková D, Valík Ľ. 2017. Functional probiotic products based on fermented buckwheat with *Lactobacillus rhamnosus*. *LWT-Food Science & Technology*. 81:35-41.
- Matz-Soja M. 2019. The molecular nutrition of fats: Chapter 15-Hedgehog signaling and liver lipid metabolism. Cambridge, MA, USA: Academic Press Inc. 201-212.
- McFarland LV. 2009. A review of the evidence of health claims for biotherapeutic agents. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 12(2):65-76.

- Meln I, Wolff G, Gajek T, Koddebusch J, Lerch S, Harbrecht L, Hong W, Bayindir-Buchhalter I, Krunic D, Augustin HG, Vegiopoulos A. 2019. Dietary calories and lipids synergistically shape adipose tissue cellularity during postnatal growth. *Molecular Metabolism*. 24:139-148.
- Messina A, Lan L, Incitti T, Bozza A, Andreazzoli M, Vignali R, Cremisi F, Bozzi Y, Casarosa S. 2015. Noggin-mediated retinal induction reveals a novel interplay between bone morphogenetic protein inhibition, transforming growth factor β , and Sonic Hedgehog signaling. *Stem Cells*. 33(8):2496-2508.
- Michlmayr H, Kneifel W. 2014. β -Glucosidase activities of lactic acid bacteria: Mechanisms, impact on fermented food and human health. *FEMS microbiology letters*. 352(1):1-10.
- Millet Y, Jouglard J, Steinmetz MD, Tognetti P, Joanny P, Arditti J. 1981. Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. *Clinical Toxicology*. 18(12):1485-1498.
- Nandi N. 2005. Study of chiral recognition of model peptides and odorants: Carvone and camphor. *Current Science*. 88(12):1929-1937.
- Nepali S, Cha JY, Ki HH, Lee HY, Kim YH, Kim DK, Song BJ, Lee YM. 2018. *Chrysanthemum indicum* inhibits adipogenesis and activates the AMPK pathway in high-fat-diet-induced obese mice. *The American Journal of Chinese Medicine*. 46(1):119-136.
- Oh BM, Jun HI, Oh HH, Jo SW, Jeong DY, Kim YS, Song GS. 2020. Quality characteristics and functional evaluation of *Sikhye* fermented by lactic acid bacteria. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 49(8):803-813.

- Oh KY, Goo YM, Jeong WM, Sin SM, Kil YS, Ko KH, Yang KJ, Kim JH, Lee DY. 2018. Comparative analysis of the flavor compounds in cultivated *Chrysanthemum indicum* L. *Journal of Life Science*. 28(12):1523-1528.
- Ohara T, Muroyama K, Yamamoto Y, Murosaki S. 2015. A combination of glucosyl hesperidin and caffeine exhibits an anti-obesity effect by inhibition of hepatic lipogenesis in mice. *Phytotherapy Research*. 29(2):310-316.
- Oluyemi KA, Omotuyi IO, Jimoh OR, Adesanya OA, Saalu CL, Josiah SJ. 2007. Erythropoietic and anti-obesity effects of *Garcinia cambogia* (bitter kola) in Wistar rats. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 46(Pt 1):69-72.
- Paccosi S, Cresci B, Pala L, Rotella CM, Parenti A. 2020. Obesity therapy: How and why? *Current Medicinal Chemistry*. 27(2):174-186.
- Park KS. 2015. Raspberry ketone, a naturally occurring phenolic compound, inhibits adipogenic and lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Pharmaceutical Biology*. 53(6):870-875.
- Park SJ, Kim DH, Peak NS, Kim SS. 2006. Preparation and quality characteristics of the fermentation product of ginseng by lactic acid bacteria (FGL). *Journal of Ginseng Research*. 30(2):88-94.
- Park SY, Kim S, Lim SD. 2018. The inhibitory effect of *L. Plantarum* Q180 on adipocyte differentiation in 3T3-L1 and reduction of adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 38(1):99-109.

- Park TS. 2011. Composition for preventing or treating obesity, dyslipidemia, fatty liver or insulin resistance syndrome, comprising camphor as an active ingredient. Korea Patent. KR101050429 B1.
- Pereira J, Johnson WE, O'Brien SJ, Jarvis ED, Zhang G, Gilbert MT, Vasconcelos V, Antunes A. 2014. Evolutionary genomics and adaptive evolution of the Hedgehog gene family (*Shh*, *Ihh* and *Dhh*) in vertebrates. *PLoS One*. 9(12):e74132.
- Perini W, Snijder MB, Peters RJ, Kunst AE, van Valkengoed IG. 2019. Estimation of cardiovascular risk based on total cholesterol versus total cholesterol/high-density lipoprotein within different ethnic groups: The HELIUS study. *European Journal of Preventive Cardiology*. 26(17):1888–1896.
- Pession A, Lonetti A, Bertuccio S, Locatelli F, Masetti R. 2019. Targeting Hedgehog pathway in pediatric acute myeloid leukemia: Challenges and opportunities. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 23(2):87–91.
- Qiu C, Xie Q, Zhang D, Chen Q, Hu J, Xu L. 2014. GM-CSF induces cyclin D1 expression and proliferation of endothelial progenitor cells via PI3K and MAPK signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 33(3):784–795.
- Rajanna L, Santhosh Kumar N, Suresha NS, Lavanya S. 2019. Antibacterial activity of floral petals of some angiosperms. *European Journal of Medicinal Plants*. 30(1):1–5.
- Reddy LV, Min JH, Wee YJ. 2015. Production of probiotic mango juice by fermentation of lactic acid bacteria. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 43(2):120–125.

- Regl G, Kasper M, Schnidar H, Eichberger T, Neill GW, Philpott MP, Esterbauer H, Hauser-Kronberger C, Frischauf AM, Aberger F. 2004. Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Research*. (21):7724-7731.
- Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo HW. 2016. Targeting the Sonic Hedgehog signaling pathway: Review of smoothened and GLI inhibitors. *Cancers (Basel)*. 8(2):22.
- Ringø E, Olsen RE, Mayhew TM, Myklebust R. 2003. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*. 227(1-4):395-415.
- Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7(12):885-896.
- Round JL, Mazmanian SK. 2009. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 9(5):313-323.
- Rubinstein M, Low MJ. 2017. Molecular and functional genetics of the proopiomelanocortin gene, food intake regulation and obesity. *FEBS Letters*. 591(17):2593-2606.
- Saito M, Ueno M, Ogino S, Kubo K, Nagata J, Takeuchi M. 2005. High dose of *Garcinia cambogia* is effective in suppressing fat accumulation in developing male Zucker obese rats, but highly toxic to the testis. *Food and Chemical Toxicology*. 43(3):411-419.
- Seidlova-Wuttke D, Christoffel J, Rimoldi G, Jarry H, Wuttke W. 2006. Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat

- tissue, lipids and pituitary hormones. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 214(1):1-7.
- Serrazanetti DI, Gottardi D, Montanari C, Gianotti A. 2013. Lactic acid bacteria–R&D for food, health & livestock purposes: Dynamic stresses of lactic acid bacteria associated to fermentation processes. London, UK: Intechopen Limited. 539-570.
- Shao Y, Sun Y, Li D, Chen Y. 2020. *Chrysanthemum indicum* L.: A comprehensive review of its botany, phytochemistry and pharmacology. *The American Journal of Chinese Medicine*. 48(4):871-897.
- Shewale AK, Naikwade NS, Ladda PL, Paril S. 2020. Antidepressant activity of flower extract of *Chrysanthemum indicum* L. in experimental animal. *International Journal of Pharmacy & Biomedical Research*. 7(2):37-49.
- Shi D, Lv X, Zhang Z, Yang X, Zhou Z, Zhang L, Zhao Y. 2013. Smoothed oligomerization/higher order clustering in lipid rafts is essential for high Hedgehog activity transduction. *The Journal of Biological Chemistry*. 288(18):12605-12614.
- Shu G, Shi X, Chen L, Kou J, Meng J, Chen H. 2018. Antioxidant peptides from goat milk fermented by *Lactobacillus casei* L61: Preparation, optimization, and stability evaluation in simulated gastrointestinal fluid. *Nutrients*. 10(6):797.
- Shukla S, Gupta S. 2007. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle*. 6(9):1102-1114.

- Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, Yue Y, Guolin Z. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 96(1-2):151-158.
- Shweta S, Gurumurthy BR, Ravikanth G, Ramanan US, Shivanna MB. 2013. Endophytic fungi from *Miquelia dentata* bedd., produce the anti-cancer alkaloid, camptothecine. *Phytomedicine*. 20(3-4):337-342.
- Sohn EJ, Jung DB, Lee J, Yoon SW, Won GH, Ko HS, Kim SH. 2015. CCR4-NOT2 promotes the differentiation and lipogenesis of 3T3-L1 adipocytes via upregulation of PPAR γ , C/EBP α and inhibition of P-GSK3 α/β and β -catenin. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 37(5):1881-1889.
- Steinberg GR, Carling D. 2019. AMP-activated protein kinase: The current landscape for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*. 18(7):527-551.
- Tan SH, Shui G, Zhou J, Shi Y, Huang J, Xia D, Wenk MR, Shen HM. 2014. Critical role of SCD1 in autophagy regulation via lipogenesis and lipid rafts-coupled AKT-FOXO1 signaling pathway. *Autophagy*. 10(2):226-242.
- Theis JG, Koren G. 1995. Camphorated oil: Still endangering the lives of Canadian children. *Canadian Medical Association Journal*. 152(11):1821-1824.
- Thilakarathna WPDW, Langille MGI, Rupasinghe HPV. 2018. Polyphenol-based prebiotics and synbiotics: Potential for cancer chemoprevention. *Current Opinion in Food Science*. 20:51-57.

- Tolosa EJ, Fernandez-Barrena MG, Iguchi E, McCleary-Wheeler AL, Carr RM, Almada LL, Flores LF, Vera RE, Alfonse GW, Marks DL, Hogenson TL, Vrabel AM, Horn IP, Koenig An, Safgren SL, Erkan M, Romecin-Duran PA, Gonzalez AS, Zhou B, Javelaud D, Marsaud V, Graham RP, Mauviel A, Elsaywa SF, Fernandez-Zapico ME. 2020. GLI1/GLI2 functional interplay is required to control Hedgehog/GLI targets gene expression. *Biochemical Journal*. 477(17):3131-3145.
- Uchida K, Sun W, Yamazaki J, Tominaga M. 2018. Role of thermo-sensitive transient receptor potential channels in brown adipose tissue. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 41(8):1135-1144.
- Varjosalo M, Taipale J. 2008. Hedgehog: Functions and mechanisms. *Genes & Development*. 22(18):2454-2472.
- Virca NJ, O'Donnell Jr FE. 2019. Treatment of lung cancer using Hedgehog pathway inhibitors. United States Patent. 10,328,072 B2.
- Wang LC, Pan TM, Tsai TY. 2018a. Lactic acid bacteria-fermented product of green tea and *Houttuynia cordata* leaves exerts anti-adipogenic and anti-obesity effects. *Journal of Food and Drug Analysis*. 26(3):973-984.
- Wang N, Li Y, Li Z, Ma J, Wu X, Pan R, Wang Y, Gao L, Bao X, Xue P. 2019. IRS-1 targets TAZ to inhibit adipogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through PI3K-Akt and MEK-ERK pathways. *European Journal of Pharmacology*. 849:11-21.
- Wang Y, Lin P, Wang Q, Zheng M, Pang L. 2018b. Wnt3a-regulated TCF4/ β -catenin complex directly activates the key Hedgehog

- signalling genes *Smo* and *Gli1*. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 16(3):2101–2107.
- Wee JH, Lee KY. 2006. Overview of the development of CO-tolerant anode electrocatalysts for proton-exchange membrane fuel cells. *Journal of Power Sources*. 157(1):128–135.
- Weiszenstein M, Pavlikova N, Elkalaf M, Halada P, Seda O, Trnka J, Kovar J, Polak J. 2016. The effect of pericellular oxygen levels on proteomic profile and lipogenesis in 3T3-L1 differentiated preadipocytes cultured on gas-permeable cultureware. *PLoS One*. 11(3):e0152382.
- Wu T, Jiang C, Wang L, Morris-Natschke SL, Miao H, Gu L, Xu J, Lee KH, Gu Q. 2015. 3,5-diarylpyrazole derivatives obtained by ammonolysis of the total flavonoids from *Chrysanthemum indicum* extract show potential for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Natural Products*. 78(7):1593–1599.
- Xia T, Zhang H, Zhang L, Yang X, Sun G, Chen J, Xu D, Zhao C. 2019. Comparative and evolutionary analysis of the reptilian Hedgehog gene family (*Shh*, *Dhh*, and *Ihh*). *PeerJ*. 7:e7613.
- Xiao L, Yang X, Lin Y, Li S, Jiang J, Qian S, Tang Q, He R, Li X. 2016. Large adipocytes function as antigen-presenting cells to activate CD4⁺ T cells via up-regulating MHCII in obesity. *International Journal of Obesity (Lond)*. 40(1):112–120.
- Yang WS, Kim D, Yi YS, Kim JH, Jeong HY, Hwang K, Kim JH, Park J, Cho JY. 2017. AKT-targeted anti-inflammatory activity of the methanol extract of *Chrysanthemum indicum* var. *albescens*. *Journal of Ethnopharmacology*. 201:82–90.

- Yin J, Zhang H, Ye J. 2008. Traditional chinese medicine in treatment of metabolic syndrome. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*. 8(2):99-111.
- Yun JH, Hwang ES, Kim GH. 2011. Effects of *Chrysanthemum indicum* L. Extract on the growth and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 40(10):1384-1390.
- Yun OH, Jo JS. 2007. Optimization of extraction conditions for hot water extracts from *Chrysanthemum indicum* L. By response surface methodology. *Korean Journal of Food and Cookery Science*. 23(1):1-8.
- Yuwono SD, Ghofar A, kokugan T. 2008. Effect of product inhibitions on L-lactic acid fermentation from fresh cassava (*Manihot esculenta*) roots in tofu liquid waste by *Streptococcus bovis*. *Japan Journal of Food Engineering*. 9(1):59-66.
- Zeng C, Wang Y, Lu Q, Chen J, Zhang J, Liu T, Lv N, Luo S. 2014. SPOP suppresses tumorigenesis by regulating Hedgehog/Gli2 signaling pathway in gastric cancer. *Journal of Experiment & Clinical Cancer Research*. 33:75.
- Zhong FL, Ma R, Jiang M, Dong WW, Jiang J, Wu S, Li D, Quan LH. 2016. Cloning and characterization of ginsenoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus brevis* that transforms ginsenosides Rb1 and F2 into ginsenoside Rd and compound K. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26(10):1661-1667.
- Zhong L, Yuan Z, Rong L, Zhang Y, Xiong G, Liu Y, Li C. 2019. An optimized method for extraction and characterization of phenolic

- compounds in *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* flower. *Scientific Reports*. 9(1):7745.
- Zhou J, Zhu G, Huang J, Li L, Du Y, Gao Y, Wu D, Wang X, Hsieh JT, He D, Wu K. 2016. Non-canonical GLI1/2 activation by PI3K/AKT signaling in renal cell carcinoma: A novel potential therapeutic target. *Cancer Letters*. 370(2):313-323.
- Zwickl H, Hackner K, Kofeler H, Krzizek EC, Muqaku B, Pils D, Scharnagl H, Solheim TS, Zwickl-Traxler E, Pecherstorfer M. 2020. Reduced LDL-cholesterol and reduced total cholesterol as potential indicators of early cancer in male treatment-naïve cancer patients with pre-cachexia and cachexia. *Frontiers in Oncology*. 10:1262.

감국 *Lactococcus lactis* 배양액을 활용한 smoothened 조절기반 비만억제 연구

Camphor는 식품첨가물, 화장품 향료, 방부제 등 오래전부터 사용되어져 왔던 휘발성 물질이다. Camphor는 소량으로 사용했을 경우 신체의 안전을 위협하지 않지만, 독성으로 인해 다량의 섭취 및 장기적인 복용, 고농도의 흡입은 중독 및 특정 부위의 세포손상을 일으킨다. 의약품으로서 항염, 항균, 항암, 항바이러스 소재로 사용되지만 비만에 관해서는 그 연구가 다양하지 않다. 특히, 지방전구세포의 분화신호인 Hedgehog 신호를 기반으로 한 camphor의 연구는 전무하다. 하지만, 독성으로 인해 그 사용이 쉽지 않아 camphor를 함유하는 천연작물 중 그 함량이 비교적 많은 감국을 선택했다. 함유물질의 생리활성 향상을 위해 유산균 발효를 진행해 감국 배양액을 제작, Hedgehog 신호를 기반으로 한 비만억제 연구를 진행했다. 250 mM의 camphor를 3T3-L1 세포주에 처리 시 독성을 확인할 수 없었으며, qRT-PCR로 camphor를 처리한 세포에서 *Smo*, *Gli1* 유전자 발현의 증가와 *C/ebpa*의 감소를 확인했다. 감국 추출물과 감국 배양액을 제작한 11개의 유산균 중에서 pH, 균수, 세포독성을 바탕으로 KCTC 3115, KCTC 3237, KCTC 3109, KCTC 3074를 선별해 Hedgehog 신호에 따른 지방구세포 분화억제를 확인했다. FACS 분석의 Q8의 분포도를 통해 지방구세포 분화의 감소를 확인했으며, 감국 추출물, KCTC 3115, KCTC 3237은 GLI2의 단백질 발현을 유의성 있게 증가시켰다. 감국 추출물, KCTC 3115, KCTC 3109는 단백질 발현에서 C/EBP α , FAS를 감소, pACC를 증가시켰으며, FACS를 활용한 GLI1의 단백질 발현 수준은 KCTC 3237은 $62.7 \pm 1.5\%$, KCTC 3115은 $32.1 \pm 2.8\%$ 로 분화된 세포 $24.9 \pm 3.1\%$ 보다 높게 확인되었다.

Ptch siRNA를 처리했을 때 지방구세포 분화가 억제되었지만, *Smo* siRNA를 처리했을 경우 지방구세포가 분화되었다. 단백질 발현 수준에서 *Ptch* siRNA에서 C/EBP α 의 감소와 smoothened (SMO), GLI1의 증대를 확인할 수 있었다. KCTC 3115 (*Lactococcus lactis*)가 lipogenesis 신호와 Hedgehog 신호를 동시에 조절해 지방전구세포의 분화를 억제하는 것을 알 수 있었다. High fat diet (HFD) C57BL/6 mice에 섭취 시 *Garcinia cambogia*보다 감국 *L. lactis* 배양액에서 유의성 있게 체중 감소 효과를 보였다. CD4+, CD8+, CD4+CD8+ T 세포 분포에서 *G. cambogia*와 감국 *L. lactis* 배양액은 HFD군 대비 각 $4.00\pm1.00\%$, $4.84\pm1.33\%$, $6.69\pm2.68\%$, $7.02\pm2.26\%$, $1.21\pm0.91\%$, $1.46\pm0.81\%$ 유의성 있게 증가했다. 기존에 보고된 비만억제 기전과 다른 Hedgehog 신호를 이용한 비만억제에 대한 연구로서 camphor, 감국 추출물이 Hedgehog 신호를 통해 *in vitro*에서 지방구세포의 분화를 억제시켰으며, 감국 배양액의 지방구세포 분화억제와 비만억제에 대한 추가 증대를 확인했다. 따라서 본 연구에서는 감국 추출물, 감국 배양액의 Hedgehog 신호 조절에 따른 지방구세포분화 억제효과가 비만치료제로 개발될 수 있음을 제시하고자 한다.

주제어 : 감국, *Lactococcus lactis*, 지방구세포, Hedgehog, SMO, camphor