

보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개( ), 발간등록번호(O)

11-1543000-002213-01

# 천연소재 보리지 외 1종을 이용한 비만개선용 식의약소재 개발 최종보고서

---

2018. 3.

주관연구기관 / 한림대학교  
협동연구기관 / 강원대학교

농림축산식품부

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업’(연구개발 기간 : 2016. 12 ~ 2017.12)  
과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2018. 03. .

주관연구기관명 : 한림대학교 산학협력단 (대표자) 산학협력단장 (인)  
공동연구기관명 : 강원대학교 산학협력단 (대표자) 산학협력단장 (인)  
참여기관명 : (주)엔에스웰니스 (대표자) 이 지 원 (인)

주관연구책임자 : 강 일 준  
공동연구책임자 : 조 준 희  
참여기관책임자 : 임 병 재

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에  
동의합니다.

보고서 요약서

**보고서 요약서**

과제 고유 번호	116158-1	해당 단계 연구 기간	2016.12 -2017.12	단계구분	1/1
연구사업명	중사업명	농식품기술개발사업			
	세부사업명	농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	천연소재 보리지 외 1종을 이용한 비만개선용 식의약소재 개발			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 5명 내부: 2명 외부: 3명	해당단계 연구개발비	정부: 70,000천원 민간: 23,340천원 계: 93,340천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 5명 내부: 2명 외부: 3명	총 연구개발비	정부: 70,000천원 민간: 23,340천원 계: 93,340천원	
연구기관명 및 소속 부서명	한림대학교 산학협력단		참여기업명 (주)엔에스웰니스		
국제공동연구	상대국명:		상대국 연구기관명:		
위탁연구	연구기관명:		연구책임자:		

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수  
64

## 요약문

연구의 목적 및 내용	<p>○ 보리지 외 1종을 활용하여 비만개선용 천연물 식의약소재 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 보리지 외 1종 추출물을 통한 체지방 감소 전임상 효능 평가</li> <li>- 보리지 외 1종 추출에 의한 체지방 감소 작용기전 연구</li> <li>- 보리지 외 1종 추출물의 간이 인체 적용시험을 위한 안전성평가</li> </ul>				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 일년봉과 보리지 추출 혼합물 투여 군의 체중 증가량이 유의하게 감소하였으며, 이는 부고환 지방조직과 내장지방조직의 무게 감소 때문으로 확인됨.</li> <li>- 일년봉과 보리지 추출 혼합물은 LDL-콜레스테롤의 상승을 억제시키고 혈당을 감소시키는 효과가 높다는 것을 확인함.</li> <li>- 기전 연구결과, 일년봉과 보리지 추출 혼합물은 지방세포 분화에 관여하는 전사 인자들을 억제하며 지방산 <math>\beta</math>산화를 증가시켜 항비만 효과가 있는 것으로 나타남.</li> <li>- 보리지외 1종 소재(일년봉) 추출물을 농도별로 단회/반복독성실험을 수행한 결과, 일반 증상, 체중/사료/음수 섭취량, 치사량에 이상이 없고, 장기의 조직학적 병리소견이 관찰되지 않았음. 이를 통해 두 소재 모두 안전성을 입증하였음.</li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내산 천연물을 대상으로 분자생물학적 기법 및 생화학적 기법을 이용하여 항비만 실험을 수행하며 국제적 수준의 기술축적을 유발하여 전문 인력 양성에 기여함.</li> <li>- 비만관련 시장크기는 조단위 이상의 가치를 평가하는 보고도 발표되고 있어서 향후 비만개선 천연물 식의약 소재 연구개발에 바탕이 됨.</li> <li>- 비만개선 관련하여 확고한 기전확립과 더불어 향후 건강기능식품 건강식품으로 제품화에 활용</li> <li>- 본연구 과제를 통해 기술개발과 소재개발이 시작되고 완성되면 내수 연간 30억 원 이상, 수출효과 20억 원 이상이 예상되며, 국가사회가 비만으로 인해 지불되는 연간 직간접비용이 약 10억 원 이상이 감소될 것으로 기대됨. 수입대체 효과에 있어서도 약 15억 원 이상으로 판단되어 전체적으로 연간 950억 원 이상의 경제적 가치 창출 가능함.</li> </ul>				
국문핵심어 (5개 이내)	비만	천연물	안전성	기전	전임상
영문핵심어 (5개 이내)					

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	5
2. 국내외 기술개발 현황 .....	7
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	11
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	55
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	57
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	59
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	60
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	60
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	60
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	61
11. 기타사항 .....	61
12. 참고문헌 .....	61

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 가. 연구개발 목적

○ 보리지 외 1종의 천연물 추출물의 전임상 효능 평가 등을 통해 체지방감소 관련 생리학적 효과 또는 기전의 명확한 규명으로 비만개선에 도움을 줄 수 있는 천연소재의 개발

## 나. 연구개발의 필요성

### ○ 기술적 측면에서의 기술 개발 중요성 및 필요성

- 지금까지의 비만이나 그로 인한 당뇨, 고지혈증 등의 치료는 질환이 발병하고 중증상태에서는 약물 치료적으로 접근하거나, 예방적 차원에서 칼로리 제한이나 영양성분 흡수 억제 방식으로 연구되어왔음. 하지만 이 과정에서 개발된 대부분의 소재들은 심각한 부작용이 동반하거나 단기간의 요요 현상으로 실제적 효과를 거두지 못하고 있음. 따라서 안전하고 실질적 효능을 갖는 새로운 천연소재의 개발과 이의 기능식품을 통한 시장친화형 3세대 항비만 제품의 산업화가 절실히 요구됨.

### ○ 경제산업적 측면에서의 기술 개발 중요성 및 필요성

- 천연물과 농업소재를 의과학과 융복합 연구를 통해 고부가가치 건강기능식품이나 천연물신약으로 연구개발 하는 것은 국가적으로 농업과 산업발전에 기여하는 중요한 기술임.  
- 국제적으로 천연물을 통하여 건강기능식품 또는 Health functional food로 산업화하는 영역은 연간 7% 이상의 지속적인 성장을 유지하고 있으며, 중국의 소비가 증가함에 따라 더욱 큰 시장임.

### ○ 사회문화적 측면에서의 기술 개발 중요성 및 필요성

- 비만은 다양한 질병의 원인이기도 하며, 미용을 중시하는 여성들의 최대 관심사이기 때문에 다양한 질병의 원인인 비만을 관리하고 예방하는 것이 사회적으로 매우 중요함.  
- 국내 농업소재를 중심으로 효과적인 건강기능식품이나 천연물신약을 개발하여 국내외 산업화를 수행할 수 있도록 하는 것은 정부가 지원해야할 매우 중요한 기술 내용임. 또한 이를 통해 새로운 농업의 선진화 우수사례로서 고부가가치 농업의 나아가야할 방향을 제시할 수 있음.

### ○ 과학 학술적 측면에서의 기술 개발 중요성 및 필요성

- 비만은 만성질환으로 분류되며, 약보다는 사전에 꾸준히 관리할 수 있는 안전하고 장복할 수 있는 천연물 기반 소재를 활용하는 것이 적합함.  
- 본 과제의 연구팀은 이미 사전연구를 통해서 보리지 외 1종의 등의 체지방감소 및 체중조절 천연물에 대한 연구를 진행하는 과정에서 기존의 체지방감소 소재들과는 차별화 될 수 있는 기능 개선 소재를 연구개발하고 관련 생리학적 기능성을 규명하는 것을 목표로 하는

만큼 다른 과제들과는 달리 과제 성공가능성이 매우 높으며 성과를 기반으로 비만식품 시장의 확대와 세계화 진출을 가능하게 할 수 있는 기술임.

다. 연구개발 범위

- 보리지 외 1종의 추출물의 체지방감소 전임상 기전과 효능 평가
  - 전임상 평가를 통한 보리지 외 1종 추출물의 안전성 분석
  - 보리지 외 1종 추출물을 통한 체지방 감소 전임상 효능 평가
  - 보리지 외 1종 추출에 의한 체지방 감소 작용기전 연구
- 보리지 외 1종의 추출물의 체지방감소 IRB 승인 및 인체적용시험을 위한 안전성평가
  - 보리지 외 1종 추출물의 간이 인체 적용시험을 위한 안전성평가

## 2. 국내외 기술개발 현황

### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

- 신약 발굴 R&D 벤처인 크리스탈지노믹스는 계놈 연구를 통해 밝혀진 유전자 연구를 기반으로 비만치료제의 신약 후보물질 개발에 적극적으로 나서고 있음. 이 회사는 구조유전체학을 응용한 비만·당뇨 등 삶의 질을 개선하는 치료제 분야의 신약 물질 발굴에 핵심역량을 집중하고 있음.
- LGCI는 일본 제약회사와 제휴를 맺고 물질발굴에 나섰다. 일본 3위 제약회사인 야마노우찌사와 제휴를 맺고 뇌에서 식욕과 에너지 소비를 조절하는 특정 수용체에 작용하여 음식물 섭취를 억제하는 경구용 후보물질을 개발 중임.
- 동아제약과 바이오벤처 TG바이오텍은 공동으로 비만치료제 개발을 추진하고 있음. 경북대 실험실 벤처인 TG바이오텍은 비만관련 유전자를 발굴하여 지방축적을 막는 비만치료제 후보물질을 발굴해 동아제약에 특허 실시권을 이전했다. 동아제약은 TG 바이오텍이 찾아낸 유전자 정보를 이용해 신약선도물질을 탐색중임.
- 영남대 출신 교수들이 설립한 바이오비서티는 나뭇잎과 열매 등 천연물에서 추출한 성분으로 비만 치료효과를 보이는 물질 개발에 성공하고 진양제약을 통해 대량생산 및 판매에 나서기로 함.
- 최근 들어 비만이 성인병으로 분류되는 고지혈증, 당뇨, 고혈압, 심혈관계질환 및 암을 일으키는 가장 큰 원인이 밝혀지고 있으며 이의 피해는 최고의 사망원인인 암이나 심혈관계질환 보다 훨씬 더 심각한 것으로 알려지고 있음. 따라서 비만의 원인적 대처는 다양한 성인병의 주요 원인에 대한 근본적 대처를 하는 효과적 방법임.
- 비만, 당뇨, 고지혈증, 고혈압 등은 이전에는 각각의 서로 다른 질환으로 분류되어 왔으나 최근에는 대사증후군 (Metabolic Syndrome)이라는 복합질환의 서로 다른 표현형으로 생각되고 있음. 대사증후군의 원인에 대하여서는 복부지방의 축적이 주된 원인으로 지목되고 있으며, 지방조직에서 발현되는 유전자의 역할이 규명됨에 따라 복부지방과 혈당, 혈중지질 등을 연결하는 메카니즘이 활발히 연구되고 있음
- 지금까지의 비만이나 그로인한 당뇨, 고지혈증 등의 치료는 심각한 질환상대에서는 약물 치료적으로 접근 하거나, 예방적 차원에서는 칼로리 제한이나 영양성분 흡수 억제 방식으로 다양한 연구가 수행되어왔으나 대부분의 경우 심각한 부작용이 있거나 요요 현상으로 실제적 효과를 거두지 못하고 있어서, 운동과 함께 실제 효능을 갖는 장복해도 무해한 천연소재의 개발과 이의 기능성 식품으로의 산업화가 절실 하게 요구되고 있는 현실임.
- 비만자체와 비만으로 인한 성인질환은 만성적으로 진행되어 보통 약의 형태로는 장복이 불가능하거나 부작용이 심하다. 따라서 우리농가로부터 생산되는 천연물에서 안전하고



부작용이 없으면서도 효과가 확실한 천연소재를 개발 산업화 한다면 그 상업적, 농업적 가치는 실로 엄청남.

- 국내외 제약사들이 새로운 비만치료제 개발에 경쟁적으로 나서고 있다. 2000년 약 13억 달러 규모였던 세계 비만 시장이 연평균 20% 안팎의 고도성장에 힘입어 2010년이면 80억 달러규모에 이를 것으로 전망되고 있기 때문이다. 국내 비만치료제 시장도 2004년 말 기준 700억원 규모로 전년 대비 155% 이상 신장 했으며, 올해는 1000억원대를 돌파할 것으로 추정된다. 따라서 비만 자체의 시장만으로도 매우 크고 기능성 천연소재가 절실히 요구되고 있어서 커다란 경제 가치를 창출 할 것으로 판단됨.
- 과거 생활습관병의 한 위험인자로 여겨지던 비만이 이제는 독립된 질병으로 인식되는 단계로 전환되고 있음. 이 때문에 기존 약품에 반응하지 않거나 적합하지 않은 비만환자들을 치료하기 위한 천연물 신소재개발이 절실하므로 그에 다른 의학적 사회적 파급 효과 또한 크다고 할 수 있음.
- 내 당뇨의 직간접의 시장크기는 조단위 이상의 가치를 평가하는 보고도 발표되고 있어서 비만과 이와 연관된 성인 질환의 예방은 매우 절실한 상황임. 비만에 대한 예방은 무엇보다 적극적이며, 효과적인 성인질환의 대응 방식으로서 예방으로 인한 개인과 사회의 직간접 비용절감을 위해서 본 소재의 기능성 식품으로의 산업화는 절실함.
- 국내산 천연물 건강기능식품 세계화를 위한 대학-병원-기업 network 구축하고 다학제간 연구팀 구성으로 국내의 앞선 BT 연구 역량을 건강기능식품 개발에 활용하여 시너지 효과 창출하며 이를 바탕으로 미국 등 해외 시장 진출의 기반을 마련할 수 있음. 선진국에서 천연물 기능성소재를 이용한 대체의약을 활용하는 인구비율을 조사한 결과, 미국의 경우 42%, 프랑스의 경우 49%이며 캐나다는 무려 70%에 육박하는 것을 볼 수 있음. 국제적인 대체의약 산업 시장은 해마다 성장을 거듭하고 있으며 1993년 491억불, 1998년 850억불, 2002년 1,000억불, 현재 1,500억불 규모의 거대시장으로 성장하고 있는 상황임. 세계 대체의약시장의 10% 확보는 연간 150억불의 수출산업 육성 및 외화획득으로 이어질 수 있을 것으로 예상됨.
- 유효성과 안전성이 부분적으로 규명된 전통 국내산 천연물 소재로부터 기능식품 및 식품의약 소재 발굴로 연구개발의 실패확률을 감소시킬 수 있을 것임.
- 개방화시대를 맞이하여 우리 농촌이 경쟁력을 갖추고 살아남기 위해서는 고부가가치의 상품을 창출할 수 있는 기술이 무엇보다도 중요한 상황에서 우리민족 고유의 천연물 생약은 효능과 국민정서 면에서 고부가가치 상품으로 실용화되어 농민소득 증진 및 농산물 가공 산업 발전에 크게 이바지 할 수 있을 것으로 예상됨.
- 천연물 기능성 식의약품 소재는 특용작물로서 오랫동안 국민들의 생활에 밀접하게 이용되어 왔으며 농가의 소득원으로 중요한 역할을 해 왔음. 농림부 채소특작과의 자료에 의하면, 약용작물로 분류되는 생약재의 경우 연간 수요량이 9만5천톤임에 비해, 97년 생산량이 4만톤, 재배면적이 1만4천 ha이며 94년까지 지속적인 생산증가 추세를 보이다가 95년

부터 값싼 중국산 생약재가 수입되면서 생산 감소 추세를 보이고 있어 국산 한약재를 이용한 고부가가치 상품의 개발이 요구되고 있음.

- 우리 농민에 의해 재배되는 천연물 생약재를 이용한 건강식품 개발은 개방화 시대를 맞이하여 저렴한 외국산 농산물이 유입됨으로써 고부가가치 작물을 재배해야하는 우리 농민의 소득향상에 크게 기여할 것이며 농산물 가공업계와 식품업계에도 활력을 주리라 기대됨
- 천연물 생약은 민족과 역사를 같이 하면서 수천 년간 국민 건강 유지에 중요한 역할을 해 온 학문으로 아직까지 국민들 사이에 많은 호응을 얻고 있으므로 기준에 맞게 상품화될 경우 국민정서에 부합됨으로써 독자적인 기술과 저렴한 투자비용으로 고부가가치를 올릴 수 있을 것임.
- 본 연구에 참여한 연구원들은 분자생물학적 기법 및 생화학적 기법을 이용하여 실험을 수행하며 선진국에 뒤지지 않은 연구를 수행한 경험을 바탕으로 자신감 있게 앞으로 성인성 질환예방용 기능성 소재를 연구하는 훌륭한 연구그룹이 되어 우리나라의 농업생명과학의 진보에 일조하게 될 것임.

#### 나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

- 현재 비만치료제 시장은 로슈사의 Orlistat (Xenical)이 세계 시장의 70% 정도를 차지하고 있으나 소비자들의 구매요구는 대단히 높는데 비하여 현재 시장에 나와 있는 제품이 이에 미치지 못하기 때문에 화이자, 암젠, 아밀린, 안센, 듀폰, 시넵틱, 노바티스, 파마코피아 등의 대규모 제약회사들이 확장되고 있는 시장공략을 위하여 비만치료제 개발에 막대한 자본과 기술력을 투입하고 있다. 현재 국외에서 개발중인 비만치료제는 임상시험과정에 있는 것만 십여 종에 달하고 전임상 단계까지 포함하면 100종 가까이 됨
- 세계적으로 약 10억명이 비만이나 과체중으로 고생하고 있으며 미국에서는 성인의 64.5%, 6-19세 연령층의 15%가 과체중임. 미국에서는 2002년 한해만 6만명이 위를 절제하거나 장의 길이를 줄이는 수술을 받은 바 있음. 통계자료에 의하면 국내 15세 이상 인구중 과체중 및 비만이 전국평균 25 %에 이르고 있으며 연령대 별로는 40대 후반이 33.4 %, 50대 전반이 32.4 %로 가장 비만경향이 높음. 2001년 보건복지부의 조사에 따르면 우리나라에서 비만의 간접비용을 포함한 사회경제적 비용은 1조 17억원으로 집계되었음.
- 영국의 시장조사기관 데이터모니터사에 따르면 2006년도에 유럽의 소비자들은 비만관련 제품을 구입하는데 960억 유로달러 (901억 달러)를 지출할 것이라는 전망이 나왔음. 2001년 유럽 7개국의 비만관련 제품 시장규모는 925억 유로에 달했으며 국가별로는 독일이 193억 유로로 가장 많았고 영국이 152억 유로, 프랑스가 132억 유로의 순서로 나타났음. 미국의 97년 비만관련 제품 시장규모는 300억불에 달하여 고지혈증 (100억불), 소화기질환 (100억불), 스트레스 (48억불) 등을 크게 앞지르고 있는 상황임.

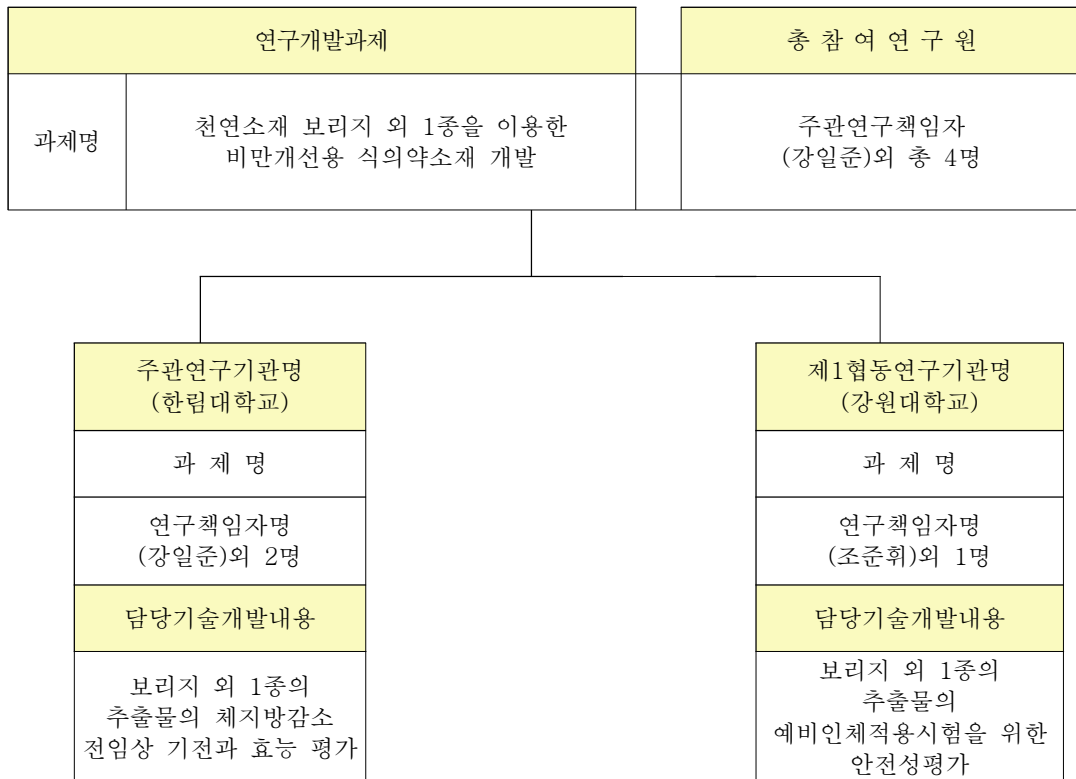
- 현재 국외에서 임상시험 단계에 있는 비만치료제들은 다음과 같음

품목	업체명	개발단계
에코피팜 (Ecopipam)	쉐링프라우	임상2상
글루카곤류 펩타이드 1	아밀린	임상2상
p57	리코팜, 화이자	임상2상
악소킨 (Axokine)	레게네론	임상2상
렙틴	암젠	임상2상
휴먼성장호르몬	메타볼릭	임상2상
GW427353	글락소스미스클라인	임상2상
휴먼스테로이드성호르몬	슈퍼젠	임상2상
RF-1051	슈퍼젠	임상2상
SB418790	글락소스미스클라인	임상1/2상
2세대 렙틴	암젠	임상1상
리파아제 저해제	알리자임	임상1상
G1 181771	글락소스미스클라인	임상1상
1426	아벤티스	임상1상
코르티코트로핀 방출요소	릴리, 뉴로크린, 얀센, 듀폰	전임상
갈라닌 길항제	뉴로젠, 시냅틱	전임상
MC-4	트레가, 노바티스 등	전임상
뉴로펩타이드 Y 억제제	아구론, 시냅틱, 노바티스 등	전임상

### 3. 연구수행 내용 및 결과

#### 가. 연구개발 추진전략 및 추진체계

- 보리지 외 1종의 추출물의 안전성 분석을 위해 농도별 세포 독성 평가와 효능평가 시 동물 안전성 확인을 추진함.
- 3T3-L1 세포의 Oil Red O staining을 통한 TG accumulation 측정 등 보리지 외 1종의 추출물에 의한 지방세포 생성 억제 또는 지방 분해 효능 평가를 추진함.
- 고지방식이 비만실험동물의 body weigh 변화 측정, serum biochemistry analysis, adipocytes 크기 측정 등을 통한 지방축적 억제 및 체지방감소 효능 평가를 추진함.
- 고지방식 비만동물모델을 활용한 보리지 외 1종의 추출물의 체지방감소 작용기전 규명을 위해 실험동물에서 아디포넥틴, AMPK, PPARs, SREBP, C/EBP, FABPs 영향 분석을 추진함.
- 보리지 외 1종 추출물의 간이 인체 적용시험을 위한 안전성평가를 추진함.



- 한림대학교의 식품영양학과는 체지방 감소에 대한전임상 효능 평가 시스템을 갖추고

신속하고 명확하게 보리지와 외 1종의 추출물의 효능을 평가할 수 있으므로 한림대학교에서 항비만 소재의 효능 평가, 기전연구를 추진임.

- 강원대학교 의과대학은 오랜 기간 인체적용시험을 수행해본 경험을 가지고 있으며, 간 이인체적용시험을 통해서 IRB 승인을 위한 유효성 평가 프로토콜 구축과 대상군 선정 등과 같은 노하우를 다수 확보하고 있으므로 강원대학교에서 간이 인체 적용시험을 위한 안전성평가를 추진함.

나. 연구개발 추진일정

일련번호	연구내용	월별 추진 일정											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	전임상 평가를 통한 보리지 외 1종의 추출물의 안전성 분석	■	■	■									
2	보리지 외 1종의 추출물에 의한 지방세포 생성 억제 또는 지방 분해 효능 평가		■	■	■	■	■						
3	보리지 외 1종의 추출물에 의한 고지방식이 비만실험동물의 지방축적 억제 및 체지방감소 효능 평가				■	■	■	■	■	■	■	■	■
4	보리지 외 1종의 에 의한 유전자 수준, 분생물학적 체지방감소 작용기전 연구						■	■	■	■	■	■	
5	고지방식 비만동물모델을 활용한 보리지 외 1종의 추출물의 체지방감소 작용기전 규명					■	■	■	■	■	■	■	■
6	보리지 외 1종의 추출물에 대한 예비인체적용시험을 위한 안전성 확인	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

## 다. 연구개발 방법

### 1) 실험재료

본 연구에 사용한 보리지(*Borago officinalis* L.) 추출물 (B)은 시료에 증류수를 1:10(w:v)의 비율로 가한 다음 충분히 침지 시킨 후, 80°C에서 3시간씩 3회 반복 추출하였으며, 일년봉(*E. rigeron annuus* L.)추출물(E)은 시료에 50% 에탄올을 1:10(w:v)의 비율로 가한 다음 완전히 침지 시킨 후, 80°C에서 환류시키면서 3시간씩 3회 반복 추출하였음. 추출액은 Whatman No. 2 여과지로 여과하며 여과액은 60°C에서 감압 농축하여 분말 시료를 제조하여 실험에 사용하였음. 일년봉과 보리지 추출물의 혼합물은 시료를 감압 농축하여 얻은 분말 상태에서 혼합하여 실험에 사용하였음.

### 2) 3T3-L1 전지방세포의 배양 및 분화

3T3-L1 전지방세포는 BS(10%) 및 P/S(1%)를 함유한 고농도 포도당 DMEM(89%)에서 100% confluence될 때까지 배양함. 이로부터 2일 후에, 지방세포 분화유도 물질(1  $\mu$ g/mL insulin, 1  $\mu$ M DEX, 0.5 mM IBMX)과 FBS(10%) 및 P/S(1%)를 함유한 DMEM으로 전지방세포를 지방세포로 분화 유도하였음. 지방세포 분화(day 0)시 각각의 시료를 처리하여 지방세포의 분화 억제 효과를 관찰하였음. 지방세포의 분화는 분화유도 물질을 처리한 후, 2일마다 지속적으로 1  $\mu$ g/mL insulin, 1% P/S, 10% FBS가 함유된 배지에 각각의 시료를 처리한 후, 6일 동안 분화시키면서 지방축적량을 관찰하였음.

### 3) Oil red O staining을 이용한 지방축적 조사

ORO staining은 각각의 시료를 처리한 세포의 배양액을 제거한 후, 10% formalin 용액을 첨가하여 5분간 실온에서 방치하였음. Formalin을 제거하고 동량의 formalin을 첨가하여 1시간 실온에서 incubation한 후 60% isopropyl alcohol 용액으로 세척하여 세포를 완전히 건조시킨 후 미리 제조해 둔 ORO solution으로 세포 내 축적된 지방성분들을 충분히 염색 한 후, 증류수를 이용하여 세척하고 건조시켰음. 세포내 축적된 지방성분과 결합한 ORO는 100% isopropyl alcohol을 이용하여 모두 용출 시킨 후, spectrophotometer를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였음.

### 4) 실험동물 및 비만 유도

5주령의 C57BL/6J 계열 mice를 (주)중앙실험동물(Central Lab-Animal Inc., Seoul, Korea)에서 구입하여 1주일간 사육실에서 적응시킨 후 실험에 사용하였음. 동물 사육실의 온도 및 습도는  $24 \pm 5^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 5\%$ 로 설정하였으며 lighting cycle은 12시간 주기로 하였음. 실험 군으로는 정상식이군(normal fat diet)에게 총 칼로리의 10%가 지방인 일반 식이(NFD; 10% kcal fat; Research Diet, Inc., No. D12450B)를 공급하였고 고지방식이군(high fat diet)에는 비만 유도를 위하여 총 칼로리의 60%가 지방인 고지방식이(HFD; 60% kcal fat; Research Diet, In

c., No. D12492)를 공급하여 비만 유도를 2주간 진행하였음. 비만 유도 후 실험동물은 난괴 법으로 정상식이군(NFD; n=6), 고지방식이군(HFD; n=6), 양성대조군, 즉 고지방식에 가르시니아(*Garcinia cambogia*) 추출물 100 mg/kg/day 투여한 군(HFD+G100; n=6), 고지방식에 일년봉추출물(E) 100 mg/kg/day 투여한 군(HFD+E100; n=6), 고지방식에 E 200 mg/kg/day 투여한 군(HFD+E200; n=6), 고지방식에 보리지(B) 추출물 100 mg/kg/day 투여한 군(HFD+B100; n=6), 고지방식에 B 200 mg/kg/day 투여한 군(HFD+B200; n=6), 고지방식에 일년봉추출물과 보리지추출물의 혼합물(EB) 100 mg/kg/day 투여한 군(HFD+EB100; n=6), 고지방식에 EB 200 mg/kg/day 투여한 군(HFD+EB200; n=6)으로 총 9군 분류하여 모든 추출물을 증류수에 용해하여 8주간 경구투여를 실시하였음. 실험의 전 과정은 한림대학교 실험동물 운영위원회 및 동물실험윤리 위원회의 승인을 받아 실시하였음(승인번호: Hallym2016-73).

#### 5) 체중 및 식이 급여

실험기간에 실험동물이 자유롭게 물과 식이를 섭취하도록 하였고 주 1회 체중을 측정하였으며 매주 동일한 시간에 식이를 공급하여 전주에 남은 식이량과 그날 공급한 식이량의 차이로 섭취한 식이량을 계산하였음. 식이 효율(food efficiency ratio; FER)은 매주의 동물체중 증가량을 같은 기간 동안에 섭취한 식이량으로 나누어 산출하였음. FER=body weight change (g)/food intake (g)×100.

#### 6) 혈액 생화학 지표 분석

사육이 끝난 실험동물은 희생 전 12시간 동안 절식시킨 후 2,2,2-tribromoethanol (Sigma Aldrich)와 2-methyl-2-butanol (Sigma Aldrich) 0.2 cc를 복강 주사하여 마취시켜 안와정맥 채혈을 통해 공복 혈액을 채취하였으며 12,000 g, 4°C 에서 30분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후, 분석 전까지 -70°C 에 냉동 보관하였음. 혈청 생화학 지표로서 glucose (GLU), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)는 Automated Clinical Chemistry Analyzer(FUJI DRI-CHEM NX500i)를 사용하여 분석하였음.

#### 7) Western blot analysis

부고환 지방조직에 PRO-PREP protein extraction solution을 첨가하고 균질화하여 -20°C 에 30분간 반응 시킨 후 12,000 g, 4°C 에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻어 BCA protein assay kit로 단백질을 정량하였음. 단백질은 sample buffer와 혼합하여 95°C 에 5분간 가열하고, 10~12% SDS-PAGE로 100 V, 90분간 단백질 크기대로 분리하였다. 분리 후 SDS-PAGE를 Semi-dry transfer system을 이용하여 10~12 V, 60분으로 PVDF membrane에 단백질을 전이시켜 Blocking buffer (5% Skim milk in 1 X TBST)에 1시간 이상 반응하고, primary antibody를

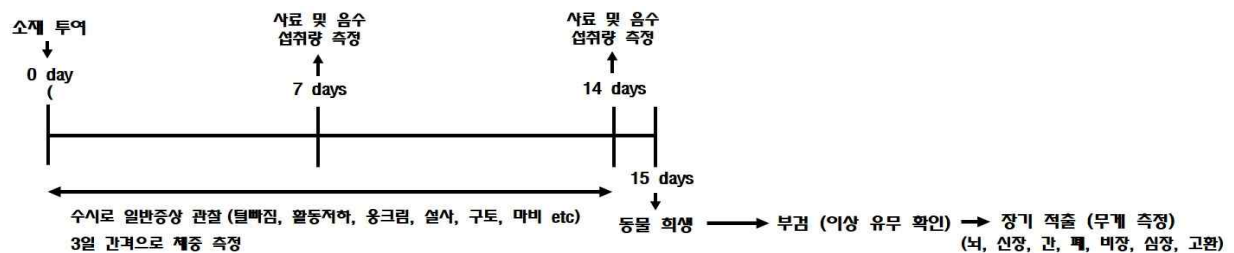
4°C에서 overnight 반응시킨 후 1 X TBST로 7분 간격으로 5번 washing 하였음. secondary antibody를 실온에서 1시간 이상 반응시킨 후 1 X TBST로 7분 간격으로 5번 washing 하였고, ECL reagent로 발색한 후 X-ray flim에 현광을 감광하였음. 밴드의 음영 면적은 Image J를 이용하여 수치화하였음.

8) 세포독성시험

시료가 세포에 미치는 독성을 알아보기 위해 MTT assay을 수행함. 3T3-L1 지방전구세포를 10% bovine calf serum(BCS)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지로 37° C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양한 후, 세포가 70-80% confluence 상태가 되면 24-well plate에 밀도가 1×10<sup>5</sup> cell/well이 되도록 seeding 하였음. 24시간 후 일년봉(E)과 보리지(B) 추출물 그리고 이들의 추출 혼합물(EB)을 100, 200 μg/mL이 되도록 처리한 후 24시간 동안 배양하고 MTT(2 mg/mL in PBS) 시약을 각 well 당 200 μl 처리하여 2-4시간 전에 배양을 종료하였음. 배양 종료 후 각 well의 배지를 제거하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 다시 용출시켜 ELISA microplate reader을 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였음.

9) 보리지 외 1종(일년봉) 추출물의 안전성 분석

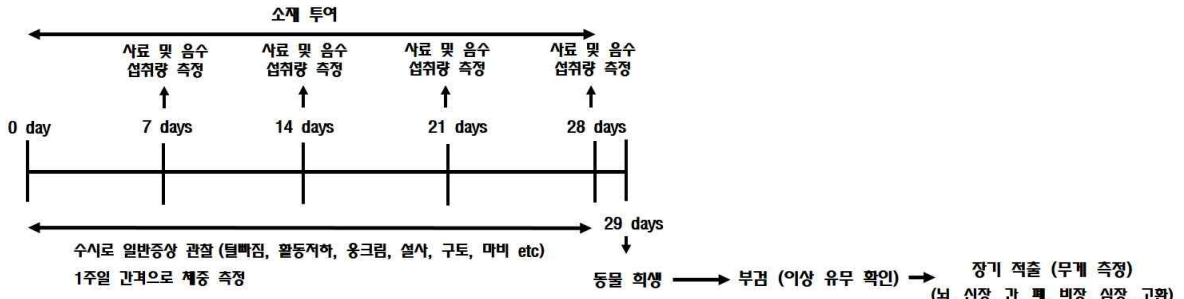
- 단회투여독성 시험: 8 주령 수컷 ICR 마우스를 7일간 순화시킨 후 미국 환경보호청(US environmental protection agency)에서 설정한 무해 물질 분류 기준인 5,000 mg/kg을 기준으로 하여 보리지 및 일년봉 추출물을 5,000 mg/kg 용량으로 단회 경구투여 한 후 14 일 간 실험동물을 매일 관찰하여 치사량, 일반 증상(털빠짐, 활동저하, 웅크림, 설사, 구토 마비 등) 및 체중변화를 기록하고, 절식 후 15일째에 동물을 부검하여 장기를 육안적·조직학적으로 분석하였음.



<단회투여독성 시험 스케줄>

- 반복투여독성 시험: 8 주령 수컷 ICR 마우스에 보리지 및 일년봉 추출물을 500, 1,000 및 2,500 mg/kg 용량으로 28일간 경구투여하고, 절식시킨 후 29일째에 동물을 부검하여 장기를 육안적·조직학적으로 분석하였음.





<반복투여독성 시험 스케줄>

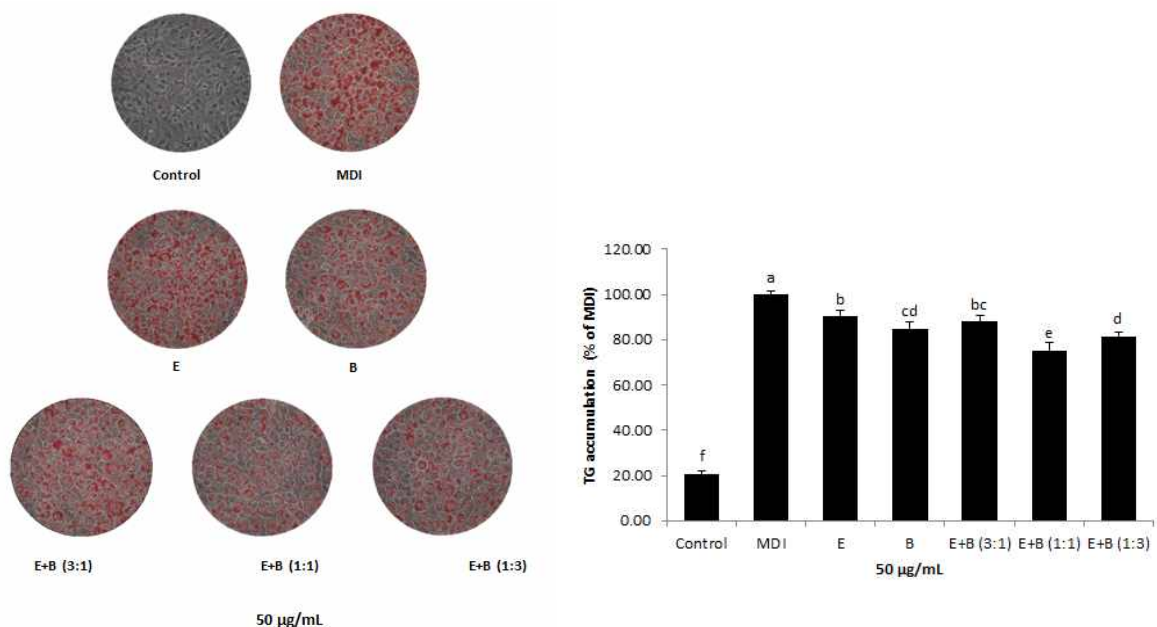
### 10) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 평균 ± 표준편차(mean ± S.D.)로 나타냈으며, 통계처리는 SPSS (17.0, Statistical Package for Social Science Inc., USA)를 이용하여 일원 변량분석(One way ANOVA)을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을  $p < 0.05$  수준에서 검증하였음.

### 라. 연구개발 결과

#### 1) Oil red O staining을 이용한 지방 축적 억제 효과

보리지와 일년봉의 혼합비율을 산출하기 위하여 일년봉 단독(E), 보리지 단독(B), 일년봉+보리지(E+B 3:1), 일년봉+보리지(E+B 1:1), 일년봉+보리지(E+B 1:3) 추출물의 지방 축적 억제 효과를 Oil red O staining을 이용하여 측정하였다. 3T3-L1 지방세포 분화를 유도한 후 각 추출물 50  $\mu\text{g/mL}$ 를 6일간 처리한 결과, 대조군(MDI)에 비하여 모든 추출물의 지방 생성이 유의적으로 감소하였으며, 그 중에서도 일년봉+보리지(E+B 1:1)의 지방세포 내 축적된 지방 함량이 가장 적었다. 따라서 3가지 혼합비율 중 그 효과가 가장 좋은 일년봉+보리지(E+B 1:1) 추출물을 선정하여 다음의 동물실험(*in vivo*)을 실시하였다.



## 2) 체중증가 및 식이효율

실험동물 각 군의 체중 변화는 Fig. 1과 Table 1과 같음. Initial body weight에는 각 군별로 유의한 차이가 없었으나, Final body weight에는 유의한 차이가 나타났고( $P < 0.05$ ), 고지방 식이군(HFD)은 일반 식이군(NFD)에 비해 체중이 1.40배 증가하였는데 이것은 Yook 등의 비만유도 실험에서 1.47배의 체중 증가량과 유사하였음. 그러나 일년봉 추출물 투여 군(HFD+E100, HFD+E200), 보리지 추출물 투여 군(HFD+B100, HFD+B200), 일년봉과 보리지 추출물의 혼합물 투여 군(HFD+EB100, HFD+EB200)의 체중 증가량은 HFD 군의 체중 증가량 보다 유의하게 감소하였음( $p < 0.05$ ).

식이 섭취량, 에너지 섭취량 및 식이 효율의 결과는 Table 2와 같음. 식이 급여 10주 동안의 식이 섭취량은 각 군별로 유의한 차이가 없었으나 에너지 섭취량에서 NFD 군은 각 군보다 유의하게 낮았고( $P < 0.05$ ), HFD 군은 추출물 투여 군과 유의한 차이가 없었음. 따라서 식이 효율의 경우 HFD 군이 NFD 군보다 유의하게 높았으나 추출물 투여 군은 HFD 군보다 유의하게 낮은 결과를 보였음( $p < 0.05$ ).

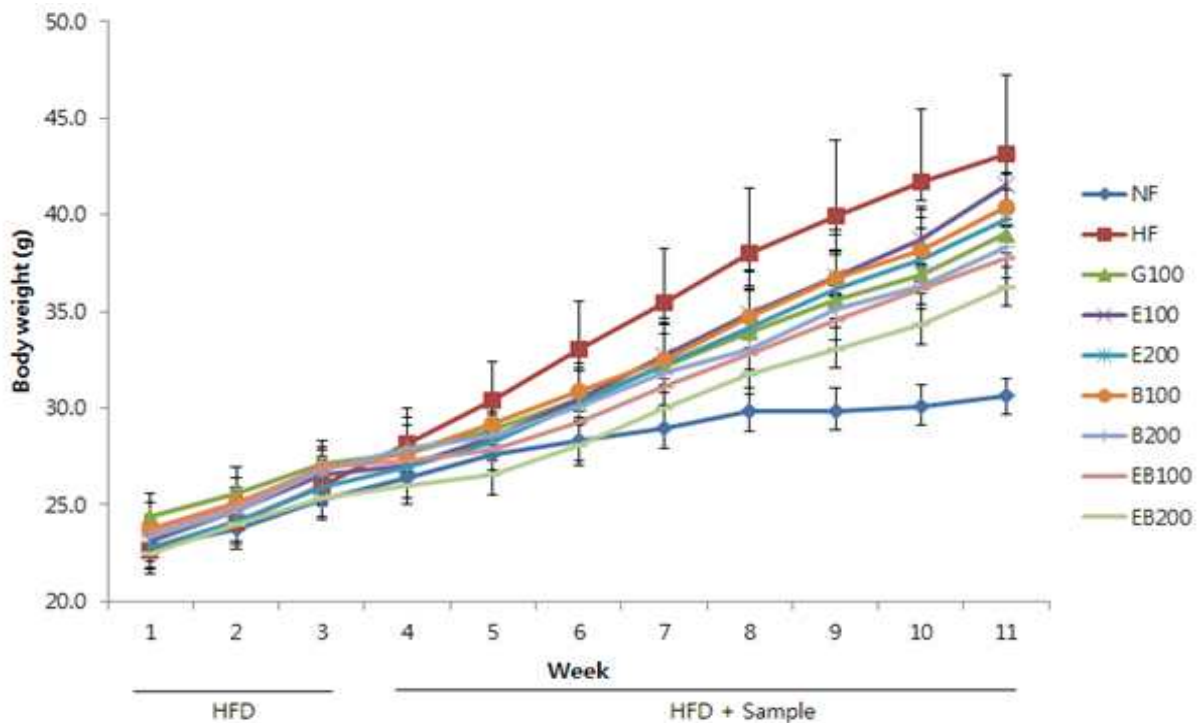


Fig. 1. Effects of *Erigeron annuus* L., *Borago officinalis* L. on body weight changes in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice

Table 1. Effects of *Erigeron annuus* L., *Borago officinalis* L. and their mixture on body weight in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice

Group	Parameters		
	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Body weight gain(g)
NFD	20.08±1.00 <sup>a</sup>	30.67±0.86 <sup>e</sup>	10.58±1.33 <sup>e</sup>
HFD	19.73±0.98 <sup>a</sup>	43.15±4.11 <sup>a</sup>	23.42±4.26 <sup>a</sup>
HFD+ G100	20.28±0.62 <sup>a</sup>	39.02±2.30 <sup>bcd</sup>	18.73±2.62 <sup>cd</sup>
HFD+ E100	19.63±0.65 <sup>a</sup>	41.53±1.71 <sup>ab</sup>	21.90±1.71 <sup>ab</sup>
HFD+ E200	19.90±0.28 <sup>a</sup>	39.75±2.34 <sup>bc</sup>	19.85±2.32 <sup>bc</sup>
HFD+ B100	19.87±0.54 <sup>a</sup>	40.40±2.69 <sup>abc</sup>	20.53±2.68 <sup>abc</sup>
HFD+ B200	20.12±0.80 <sup>a</sup>	38.33±1.05 <sup>cd</sup>	18.22±1.13 <sup>cd</sup>
HFD+ EB100	20.30±0.72 <sup>a</sup>	38.53±1.44 <sup>cd</sup>	18.23±1.59 <sup>cd</sup>
HFD+ EB200	19.92±0.79 <sup>a</sup>	36.27±3.52 <sup>d</sup>	16.35±3.02 <sup>d</sup>

Values are mean±SD of 6 mice per group.

Values not sharing a same letter within a column are significantly different among groups (p<0.05).

Table 2. Effects of *Erigeron annuus* L., *Borago officinalis* L. and their mixture on food and water intake in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice

Group	Parameters			
	Food intake (g/day)	Water intake (g/day)	Energy intake (Kcal/day)	Food efficiency ratio (%)
NFD	2.80±0.24 <sup>a</sup>	4.62±0.82 <sup>a</sup>	10.75±0.93 <sup>a</sup>	3.40±2.09 <sup>c</sup>
HFD	2.99±0.47 <sup>a</sup>	3.48±0.49 <sup>bcd</sup>	15.65±2.46 <sup>b</sup>	10.57±1.89 <sup>a</sup>
HFD+ G100	2.83±0.39 <sup>a</sup>	3.77±0.80 <sup>bc</sup>	14.82±2.04 <sup>b</sup>	7.89±2.48 <sup>ab</sup>
HFD+ E100	2.98±0.56 <sup>a</sup>	3.86±0.70 <sup>b</sup>	15.62±2.91 <sup>b</sup>	9.23±3.17 <sup>ab</sup>
HFD+ E200	2.99±0.59 <sup>a</sup>	3.24±0.39 <sup>d</sup>	15.67±3.10 <sup>b</sup>	9.09±1.96 <sup>ab</sup>
HFD+ B100	2.98±0.49 <sup>a</sup>	3.27±0.50 <sup>cd</sup>	15.64±2.58 <sup>b</sup>	8.34±1.89 <sup>ab</sup>
HFD+ B200	2.69±0.47 <sup>a</sup>	3.48±0.96 <sup>bcd</sup>	14.12±2.49 <sup>b</sup>	7.95±2.43 <sup>ab</sup>
HFD+ EB100	3.01±0.76 <sup>a</sup>	3.00±0.39 <sup>d</sup>	15.79±4.00 <sup>b</sup>	6.69±3.01 <sup>b</sup>
HFD+ EB200	3.06±0.39 <sup>a</sup>	3.34±0.55 <sup>cd</sup>	16.06±2.03 <sup>b</sup>	6.98±2.67 <sup>b</sup>

Values are mean±SD of 6 mice per group.

Values not sharing a same letter within a column are significantly different among groups (p<0.05).

### 3) 장기 및 지방 조직 무게

각 군의 장기 및 지방 조직 무게는 Table 3와 같음. 비장과 신장의 무게는 HFD 군이 NFD 군에 비해 유의하게 높았으나 추출물 투여 군은 HFD 군에 비해 현저히 감소하였음( $p < 0.05$ ). 간의 무게는 HFD( $1.44 \pm 0.16$  g) > HFD+E100( $1.16 \pm 0.07$ ), HFD+B100( $1.16 \pm 0.10$ ), HFD+G100( $1.13 \pm 0.08$ ), HFD+E200( $1.11 \pm 0.09$ ), HFD+B200( $1.10 \pm 0.05$ ) > HFD+EB100( $1.03 \pm 0.06$ ) > NFD( $0.98 \pm 0.04$ ), HFD+EB200( $0.96 \pm 0.10$ )의 순으로 나타났는데, 이 결과는 고지방식으로 인하여 간 조직에 콜레스테롤 및 중성지질이 축적되어 지방간을 유도할 수 있다는 보고와 일치하였고 일년봉 추출물과 보리지 추출 혼합물이 간지방 축적 개선 효과가 있을 것이라 사료됨. 이와 유사하게 부고환 지방조직과 내장지방조직의 무게에서도 일년봉과 보리지 추출 혼합물 투여 군은 HFD 군에 비해 유의하게 감소하였음( $p < 0.05$ ). 따라서 일년봉 추출물과 보리지 추출 혼합물(HFD+EB200)은 내부 장기에 지방이 축적되는 것을 억제하는 효과가 있다는 것이 확인됨.

Table 3. Effects of *Erigeron annuus* L., *Borago officinalis* L. and their mixture on relative weight in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice

Group	Parameters				
	Kidney(g)	Spleen(g)	Liver(g)	Epididymal fat(g)	Visceral fat(g)
NFD	$0.31 \pm 0.02^{cd}$	$0.07 \pm 0.01^{cd}$	$0.98 \pm 0.04^d$	$0.49 \pm 0.07^c$	$0.18 \pm 0.03^d$
HFD	$0.37 \pm 0.02^a$	$0.09 \pm 0.01^a$	$1.44 \pm 0.16^a$	$2.53 \pm 0.13^a$	$1.31 \pm 0.20^a$
HFD+ G100	$0.34 \pm 0.01^b$	$0.07 \pm 0.01^b$	$1.13 \pm 0.08^{bc}$	$2.37 \pm 0.38^{ab}$	$0.88 \pm 0.17^{bc}$
HFD+ E100	$0.33 \pm 0.01^c$	$0.07 \pm 0.01^b$	$1.16 \pm 0.07^b$	$2.46 \pm 0.40^{ab}$	$0.92 \pm 0.14^b$
HFD+ E200	$0.31 \pm 0.01^{de}$	$0.07 \pm 0.00^{bc}$	$1.11 \pm 0.09^{bc}$	$2.32 \pm 0.39^{ab}$	$0.85 \pm 0.26^{bc}$
HFD+ B100	$0.32 \pm 0.01^{cd}$	$0.07 \pm 0.01^{bc}$	$1.16 \pm 0.10^b$	$2.44 \pm 0.36^{ab}$	$0.95 \pm 0.27^b$
HFD+ B200	$0.31 \pm 0.01^{cd}$	$0.07 \pm 0.01^{cd}$	$1.10 \pm 0.05^{bc}$	$2.28 \pm 0.56^{ab}$	$0.88 \pm 0.23^{bc}$
HFD+ EB100	$0.29 \pm 0.01^{ef}$	$0.06 \pm 0.00^d$	$1.03 \pm 0.06^{cd}$	$2.30 \pm 0.26^{ab}$	$0.74 \pm 0.15^{bc}$
HFD+ EB200	$0.28 \pm 0.01^f$	$0.06 \pm 0.01^d$	$0.96 \pm 0.10^d$	$1.99 \pm 0.53^b$	$0.66 \pm 0.20^c$

Values are mean $\pm$ SD of 6 mice per group.

Values not sharing a same letter within a column are significantly different among groups ( $p < 0.05$ ).

4) 혈액 생화학 지표 분석

간 독성을 조사하기 위해 ALT와 AST를 측정하였으며 각 군별로 유의적인 차이가 나타나지 않아 추출물로 인한 독성이 나타나지 않음을 확인하였음( $p>0.05$ )(28).

HDL-cholesterol(HDL-C)은 HFD 군과 추출물 투여 군 간의 유의한 차이가 없었지만( $p>0.05$ ), total cholesterol(TC)은 HFD 군 추출물 투여 군보다 유의하게 높아( $p<0.05$ ), HDL-cholesterol/total cholesterol에 대한 비율은 추출물 투여 군에서 유의적으로 높았음( $p<0.05$ ). LDL-cholesterol(LDL-C)은 추출물 투여 군이 HFD 군에 비하여 감소하였고 혈당수치도 추출물 투여 군은 HFD 군보다 유의적으로 감소하였음( $p<0.05$ ). 그중 HFD+EB200 군이 가장 낮아, 이것으로 일년봉과 보리지 추출 혼합물은 LDL-콜레스테롤의 상승을 억제시키고 혈당을 감소시키는 효과가 높다는 것을 확인할 수 있었음(Table 4).

Table 4. Effects of *Erigeron annuus* L., *Borago officinalis* L. and their mixture on serum biochemical analysis in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice

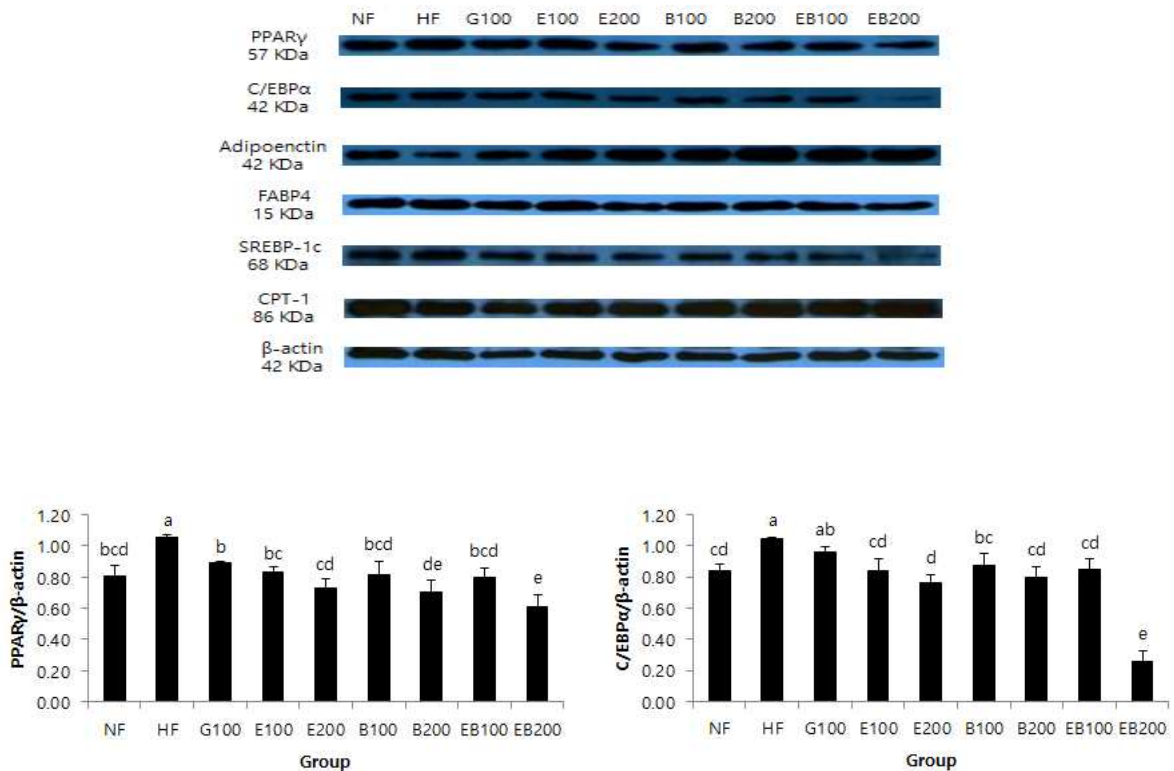
Group	Serum						
	GLU (mg/dL)	TG (mg/dL)	TC (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)
NFD	114.33± 4.18 <sup>d</sup>	63.67± 1.53 <sup>b</sup>	123.17± 7.94 <sup>e</sup>	77.83± 7.86 <sup>b</sup>	25.50± 4.23 <sup>d</sup>	46.83± 11.46 <sup>a</sup>	91.00± 11.14 <sup>a</sup>
HFD	260.33± 16.37 <sup>a</sup>	86.67± 17.67 <sup>a</sup>	193.33± 7.61 <sup>a</sup>	125.00± 9.63 <sup>a</sup>	45.33± 1.03 <sup>a</sup>	65.67± 26.55 <sup>a</sup>	105.83± 17.13 <sup>a</sup>
HFD+ G100	230.67± 28.99 <sup>abc</sup>	74.00± 4.58 <sup>ab</sup>	174.50± 11.48 <sup>cd</sup>	129.50± 5.68 <sup>a</sup>	36.57± 7.69 <sup>bc</sup>	64.00± 19.79 <sup>a</sup>	103.67± 10.50 <sup>a</sup>
HFD+ E100	243.17± 26.42 <sup>ab</sup>	75.33± 12.10 <sup>ab</sup>	181.50± 7.58 <sup>ab</sup>	124.00± 6.42 <sup>a</sup>	39.47± 5.65 <sup>b</sup>	61.17± 13.63 <sup>a</sup>	103.00± 22.22 <sup>a</sup>
HFD+ E200	219.50± 26.33 <sup>bc</sup>	74.33± 10.12 <sup>ab</sup>	173.83± 13.42 <sup>cd</sup>	131.50± 11.50 <sup>a</sup>	34.17± 4.58 <sup>bc</sup>	56.33± 17.56 <sup>a</sup>	106.83± 21.66 <sup>a</sup>
HFD+ B100	242.00± 26.83 <sup>ab</sup>	79.33± 6.11 <sup>ab</sup>	181.00± 16.92 <sup>ab</sup>	125.83± 8.33 <sup>a</sup>	39.00± 4.69 <sup>b</sup>	60.00± 22.28 <sup>a</sup>	108.50± 20.98 <sup>a</sup>
HFD+ B200	217.00± 14.97 <sup>bc</sup>	75.00± 8.72 <sup>ab</sup>	165.33± 13.60 <sup>c</sup>	128.50± 8.67 <sup>a</sup>	33.80± 2.17 <sup>bc</sup>	57.83± 14.74 <sup>a</sup>	92.17± 14.92 <sup>a</sup>
HFD+ EB100	225.00± 22.50 <sup>bc</sup>	83.67± 7.77 <sup>a</sup>	174.83± 9.66 <sup>cd</sup>	120.00± 6.57 <sup>a</sup>	36.50± 4.89 <sup>bc</sup>	57.67± 11.00 <sup>a</sup>	100.17± 12.25 <sup>a</sup>
HFD+ EB200	207.83± 34.23 <sup>c</sup>	70.33± 5.77 <sup>ab</sup>	151.50± 11.54 <sup>d</sup>	122.67± 11.04 <sup>a</sup>	30.63± 4.64 <sup>cd</sup>	58.33± 20.03 <sup>a</sup>	85.00± 22.21 <sup>a</sup>

Values are mean±SD of 6 mice per group.

Values not sharing a same letter within a column are significantly different among groups ( $p<0.05$ ).

### 5) Western blot analysis

Adipogenesis에 관여하는 후기 전사 인자인 PPAR  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)와 C/EBP  $\alpha$  (CCAAT/enhancer binding protein alpha)는 세포의 에너지 대사, 증식과 염증 반응에 참여하며 지방세포의 분화를 조절함. 또한 glucose transporter 4 (GLUT4), lipoprotein lipase (LPL), stearyl-CoA-desaturase (SCD)와 Fatty acid synthase (FAS)와 같은 지방세포 분화나 지질 합성에 관여한 여러 가지 단백질이나 효소를 활성화시킴. 부고환 지방조직에서 PPAR  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$ 의 발현은 HFD 군과 비교하였을 때 각 추출물 투여 군에 비해 유의하게 감소하였음( $p < 0.05$ ). PPAR  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$ 의 target gene인 adipogenesis와 lipolysis에 관여하는 Adiponectin은 현저히 증가하였고( $p < 0.05$ ), 지방생성의 특이성 물질인 FABP4의 발현은 HFD 군에 비해 HFD+G100 군과 HFD+EB200 군에서 가장 많이 감소하였음. lipogenesis에 관여하는 전사 인자인 SREBP-1c(sterol regulatory element binding factor 1)는 FAS와 LPL를 조절하여 지방산대사를 조절함. SREBP-1c의 발현은 HFD 군보다 추출물 투여 군이 현저히 낮았으나( $p < 0.05$ ), FAS의 발현은 군별로 유의한 차이가 나타나지 않았음( $p > 0.05$ ). CPT-1(carnitine palmitoyl transferase-1)은 lipolysis 통로에서 지방산이 미토콘드리아 막을 통과하게 하며  $\beta$  산화를 일으켜 지방산 분해에 관여하는 효소이며, 부고환 지방조직에서 CPT-1의 발현은 HFD 군과 비교시 HFD+G100 군과 HFD+E100 군을 제외한 모든 군에서 현저히 증가하였음( $p < 0.05$ ).



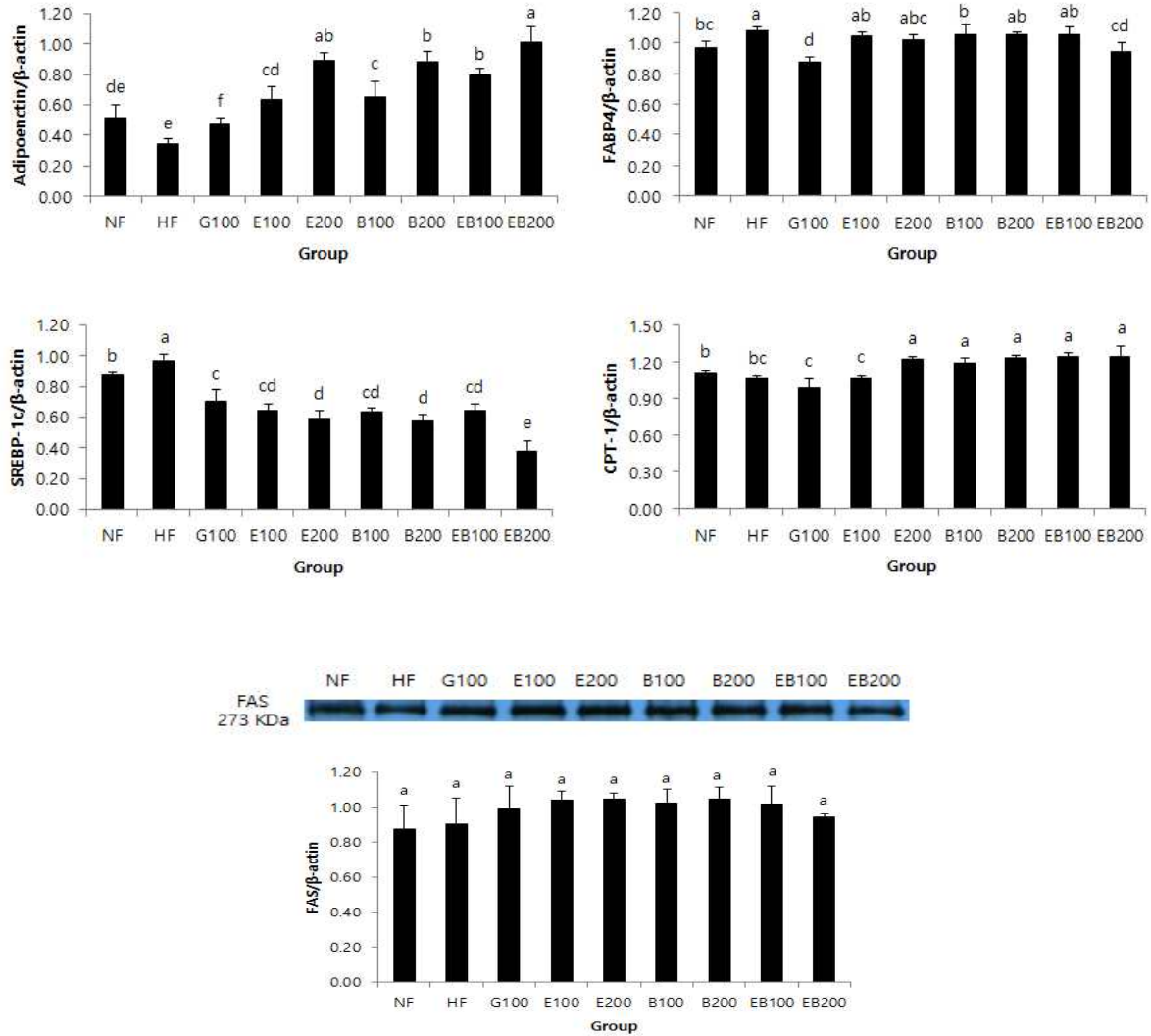


Fig. 2. Effects of *Erigeron annuus* L., *Borago officinalis* L. and their mixture on the protein expressions of adipogenesis and lipogenesis transcription factors in epididymal fat. Values not sharing a same letter within a column are significantly different among groups ( $p < 0.05$ ).

이상의 결과를 종합해 보면, 일년봉과 보리지 추출물 그리고 이들의 추출 혼합물은 지방산 합성에는 영향을 미치지 않고, 지방세포 분화에 관여하는 전사 인자들을 억제하며 지방산  $\beta$  산화를 증가시켜 항비만 효과가 있는 것으로 사료됨.

#### 6) 세포독성 평가

3T3-L1 지방전구세포에서 일년봉과 보리지 추출물 그리고 이들의 추출 혼합물을 처리에 따른 세포독성을 알아보기 위해서 MTT assay를 실시하여 세포 생존능력을 측정된 결과, 일년봉과 보리지 추출물 그리고 이들의 추출 혼합물을 100, 200  $\mu\text{g/mL}$  처리하였을 때, 모든 실험 군은 90% 이상의 높은 생존율을 나타내어 일년봉과 보리지 추출물 그리고 이들의 추

출 혼합물은 200  $\mu\text{g/mL}$ 까지 세포 독성이 없는 것으로 나타남.

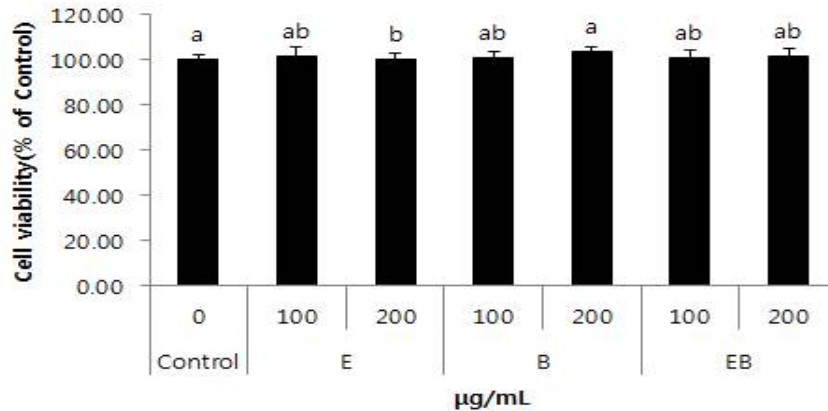


Fig. 3. Effects of *Erigeron annuus* L., *Borago officinalis* L. and their mixture on the cell viability of 3T3-L1 pre-adipocytes. Values are mean $\pm$ SD of triplicate experiments. Values not sharing a same letter within a column are significantly different among groups ( $p < 0.05$ ).

#### 7) 보리지 외 1종(일년봉) 추출물의 안전성 검증

##### - 단회투여 독성 시험

- 보리지 및 일년봉 추출물(5,000 mg/kg)을 단회 경구투여한 후 14일간의 관찰기간 동안 모든 실험동물에서 시험소재 투여로 인한 일반증상은 관찰되지 않았으며, 사망동물 또한 발생하지 않았음.
- 또한 14일 간의 체중변화, 사료 및 음수 섭취량을 측정된 결과 용매만 투여한 대조군에 비교하여 소재를 투여한 시험군에서 어떠한 통계적인 차이점이 관찰되지 않았음(Fig. 4).

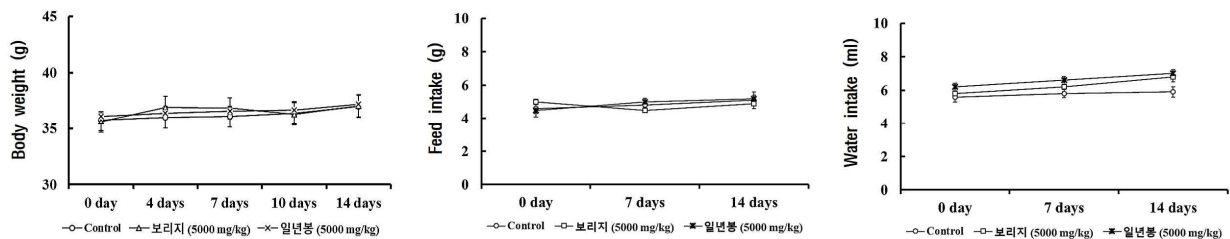


Fig. 4. 시험소재의 단회투여 후 체중, 사료 및 음수 섭취량 변화

- 소재의 단회투여 14일 후의 부검결과 대조군 및 시험군의 모든 동물에서 신체 전 장기의 육안적 이상소견이 발견되지 않았으며, 생식기 및 주요 장기를 적출하여 중량을 측정된 결과 시험군 모두에서 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았음(Fig. 5).



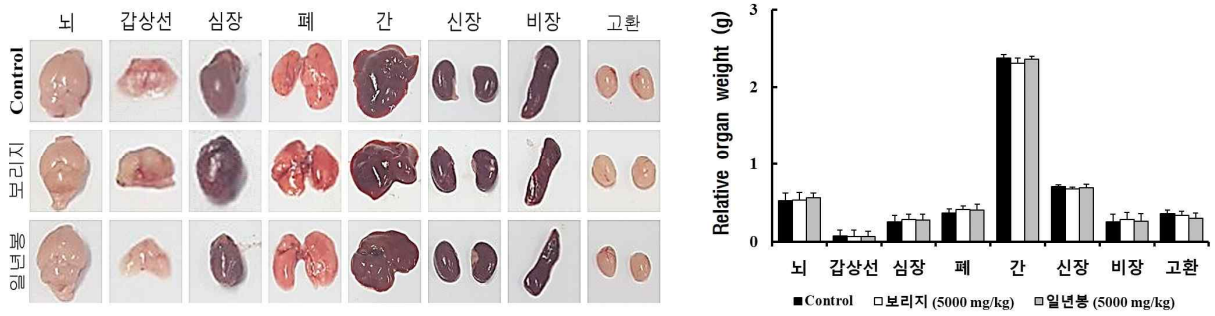


Fig. 5. 시험소재의 단회투여에 따른 생식기 및 주요 장기의 육안적 관찰 및 중량 변화

- 또한 H&E staining을 통해 적출한 생식기 및 주요 장기에 대한 조직병리학적 검사를 수행한 결과 시험군의 생식기 및 주요 장기에서 조직병리학적 양상을 보이는 조직을 관찰하지 못하였음(Fig. 6).

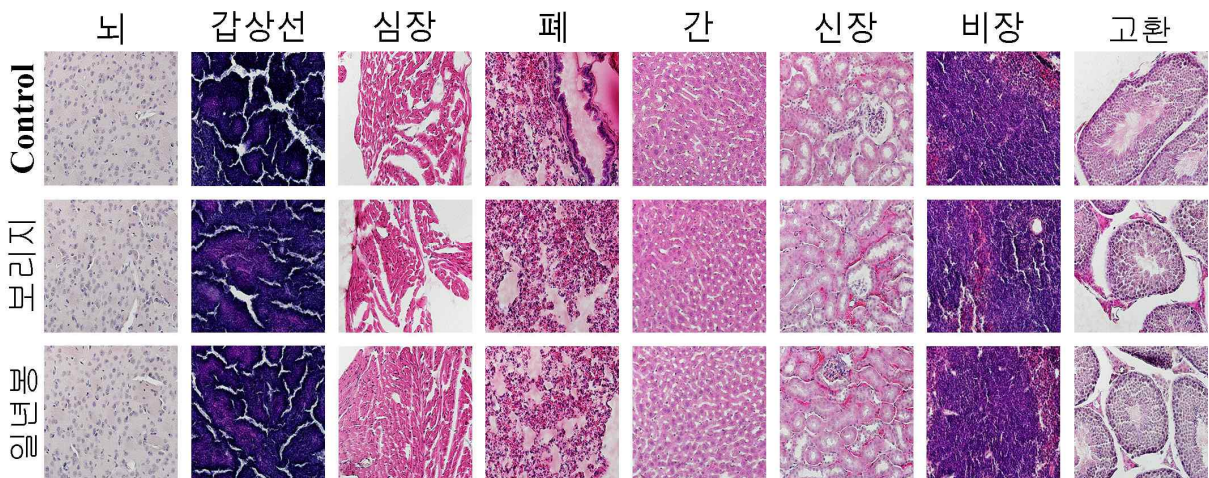


Fig. 6. 시험소재의 단회투여 후 생식기 및 주요 장기의 조직병리학적 분석

- 반복투여 독성 시험

- 보리지 및 일년봉 추출물(500, 1,000 및 2,500 mg/kg)을 28일간 경구투여 하는 동안 모든 실험동물에서 시험소재 투여로 인한 인발증상이 관찰되지 않았으며, 사망동물 또한 발생하지 않았음.
- 또한 보리지 및 일년봉 추출물을 28일간 투여하는 동안 실험동물의 체중변화, 사료 및 음수 섭취량에 있어서 대조군과 소재를 투여한 시험군간에 차이는 발생하지 않았음 (Fig. 7, 8).

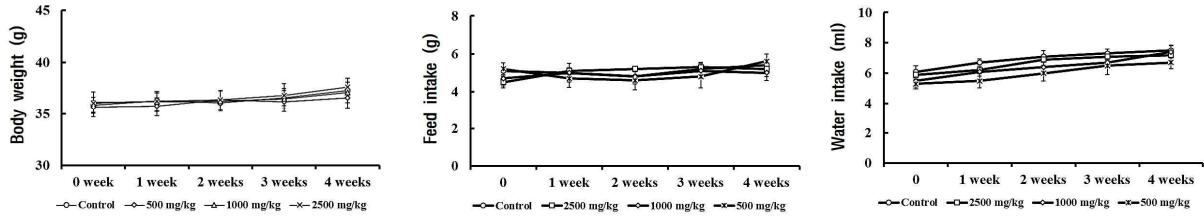


Fig. 7. 보리지 추출물 반복투여 후 체중, 사료 및 음수 섭취량 변화

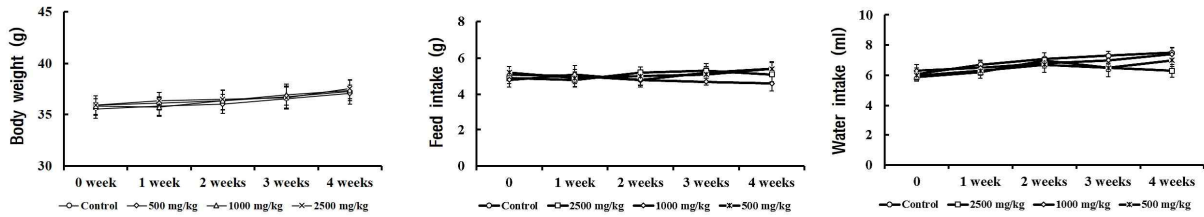


Fig. 8. 일년봉 추출물 반복투여 후 체중, 사료 및 음수 섭취량 변화

- 28일 간의 시험소재 투여 후의 부검결과 대조군 및 시험군의 모든 실험동물에서 신체 전 장기의 이상소견이 관찰되지 않았으며, 생식기 및 주요 장기의 중량 역시 대조군과 유의하게 다르지 않았음(Fig. 9).

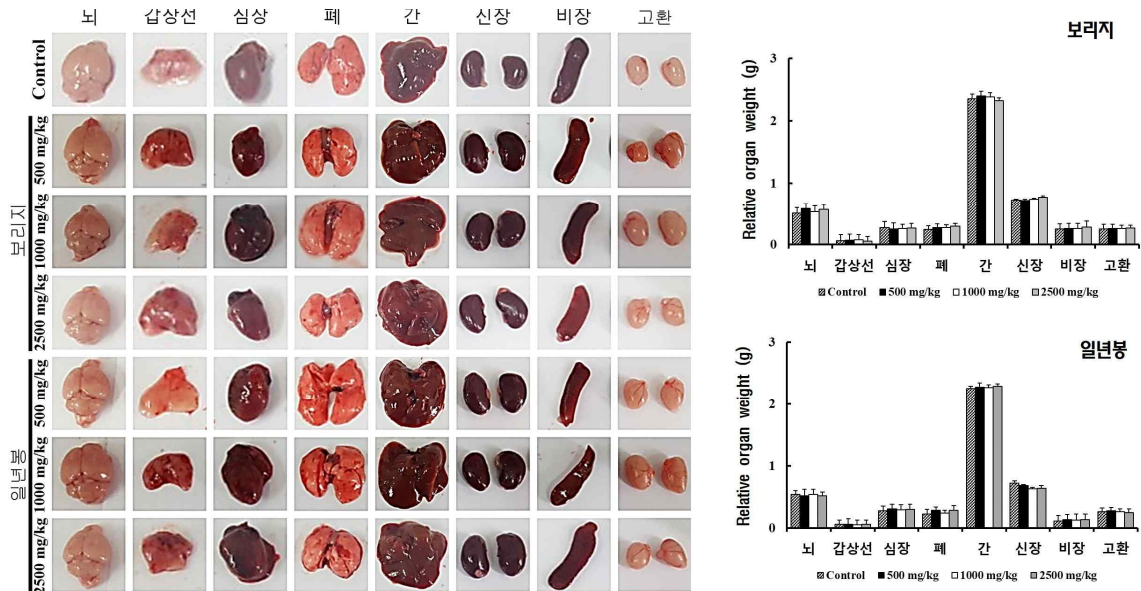


Fig. 9. 시험소재의 반복투여에 따른 생식기 및 주요 장기의 육안적 관찰 및 중량 변화

- 또한 적출한 생식기 및 주요 장기에 대한 조직병리학적 분석을 위하여 H&E staining 을 수행한 결과 모든 실험군의 생식기 및 주요 장기에서 조직병리학적 양상을 보이는 조직을 관찰하지 못하였음(Fig. 10).



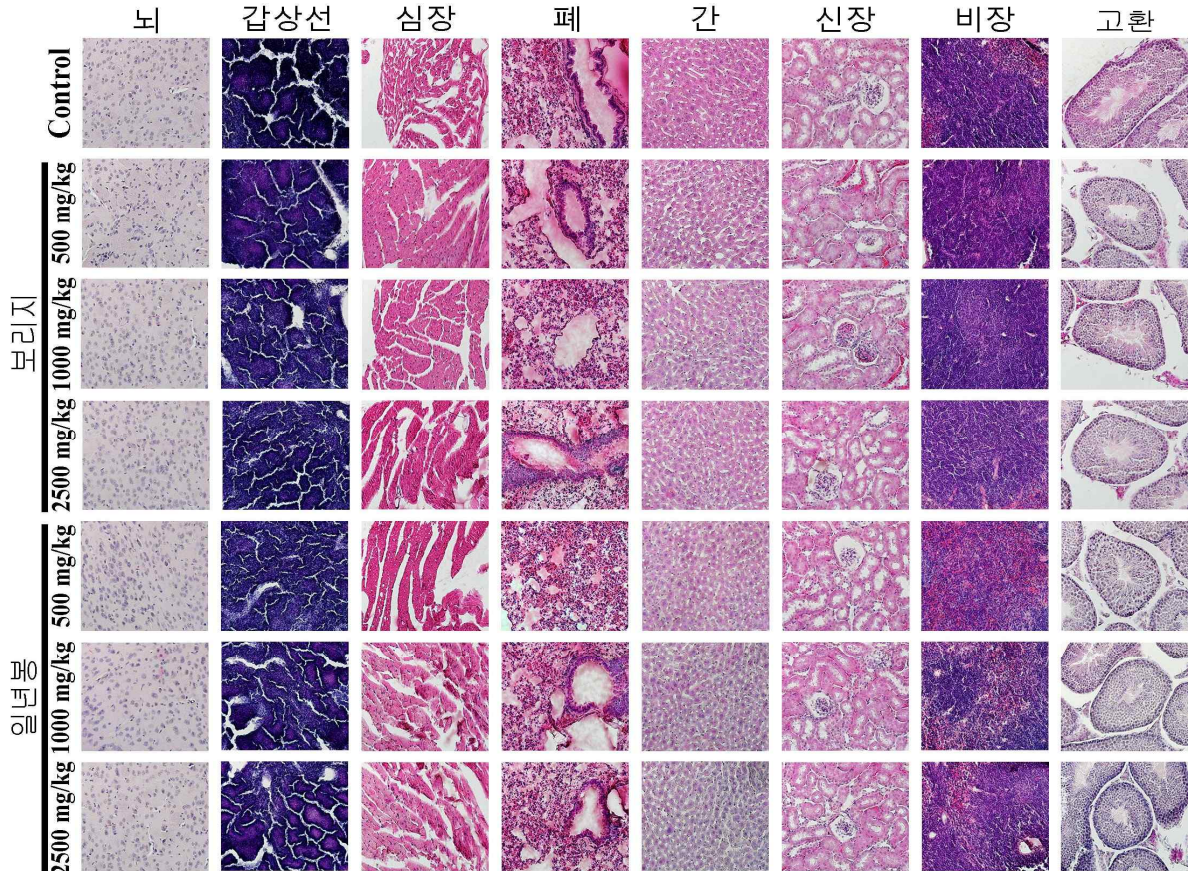


Fig. 10. 시험소재의 반복투여 후 생식기 및 주요 장기의 조직병리학적 분석

8) 원료표준화 및 예비임상진행을 위한 시제품 생산((주)엔에스웰리스 수행)

- 사전연구 성과들로 본 신청기관에서 후보군을 확보

후보군의 지표물질이나 효능물질의 분석과 정량은 고가의 정량 프로파일러를 구축하고 있는 공립분석기관과 공조하여 지표물질의 정성 정량적 설정

표 5. 보리지, 일년봉 지표물질 후보군들의 검토내용 요약표

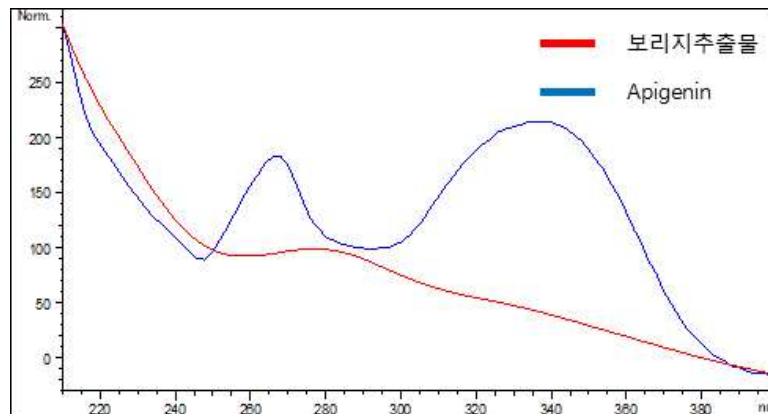
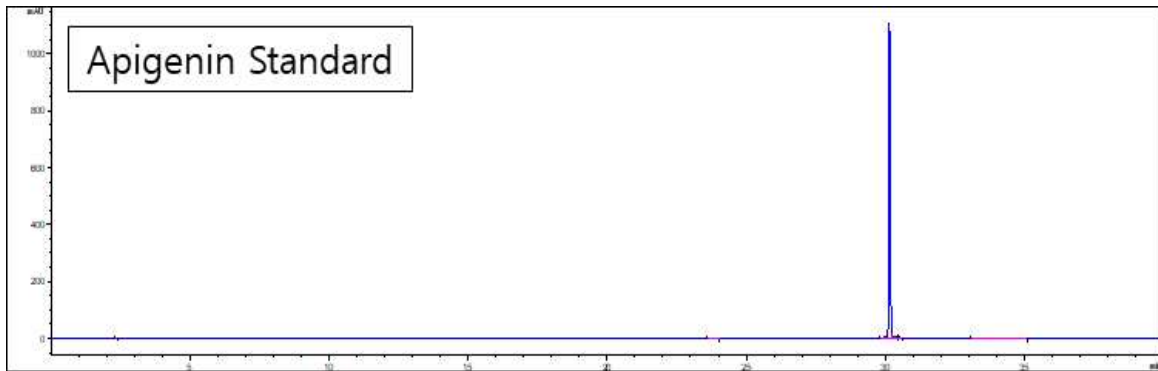
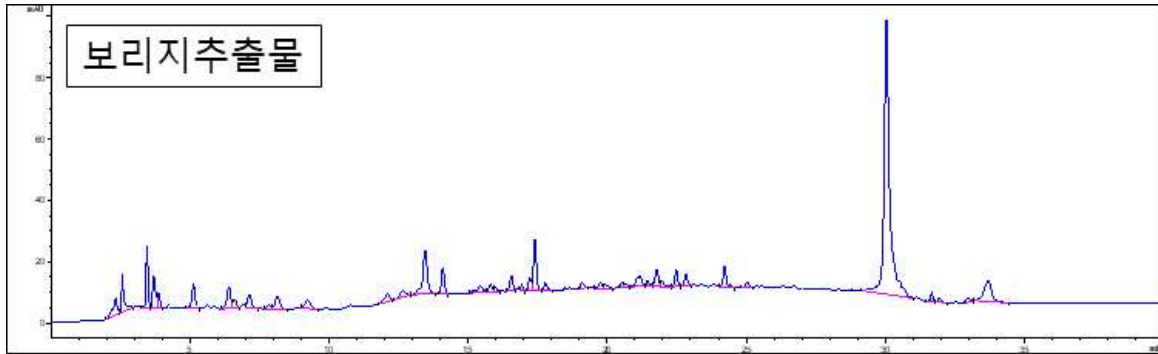
	Compound 명	검토결과		함량 (mg/g)		참고문헌		결론
		보리지	일년봉	보리지	일년봉	보리지	일년봉	
1	Apigenin	불검출	함유 (1.0 mg/g 미만의 미량으로 함유되어 지표성분으로 타당하지 않음)	-	0.4967 mg/g	-	Yoo, N. H., Jang, D. S., & Kim, J. S. (2008).	불가
2	Centauredin	불검출	불검출	-	-	-	-	불가

3	Irigenin	불검출	불검출	-	-	-	-	불가
4	P-coumaric acid	함유 (1.0 mg/g 미만의 미량으로 함유되어 지표성분으로 타당하지 않음)	불검출	0.0339 mg/g	-	-	-	불가
5	Rutin	불검출	불검출	-	-	-	-	불가
6	Luteolin	불검출	불검출	-	-	-	-	불가
7	Quercetin	불검출	불검출	-	-	-	Lee, H. J., & Seo, Y. (2006).	불가
8	Caffeic acid	불검출	불검출	-	-	-	Lee, H. J., & Seo, Y. (2006).	불가
9	Acacetin	불검출	불검출	-	-	-	-	불가
10	Vitexin	불검출	불검출	-	-	-	-	불가
11	Isoorientin	불검출	불검출	-	-	-	-	불가
12	Taxifolin	불검출	불검출	-	-	-	-	불가
13	Sinapic acid	불검출	불검출	-	-	-	-	불가
14	Chlorogenic acid	함유 (1.0 mg/g 미만의 미량으로 함유되어 지표성분으로 타당하지 않음)	검출	0.3122 mg/g	11.3007 mg/g	-	-	가능
15	Rosmarinic acid	불검출	불검출	-	-	-	-	-

○ 분석결과

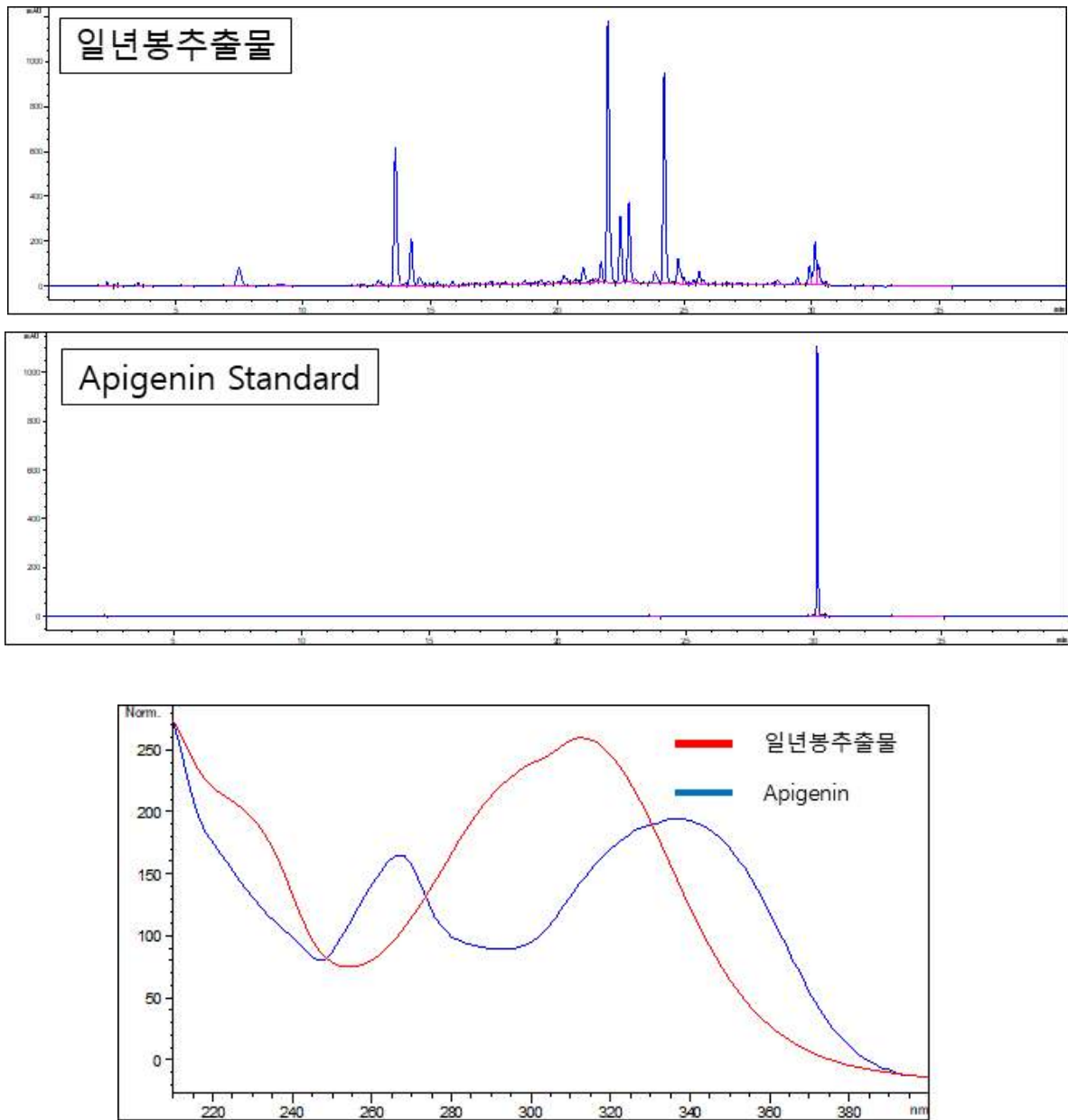
① Apigenin 분석 검토 실험결과

(ㄱ) 보리지추출물 내 Apigenin 분석 결과



위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Apigenin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 보리지추출물에 Apigenin이 존재하지 않는 것으로 판단.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 Apigenin 분석 결과

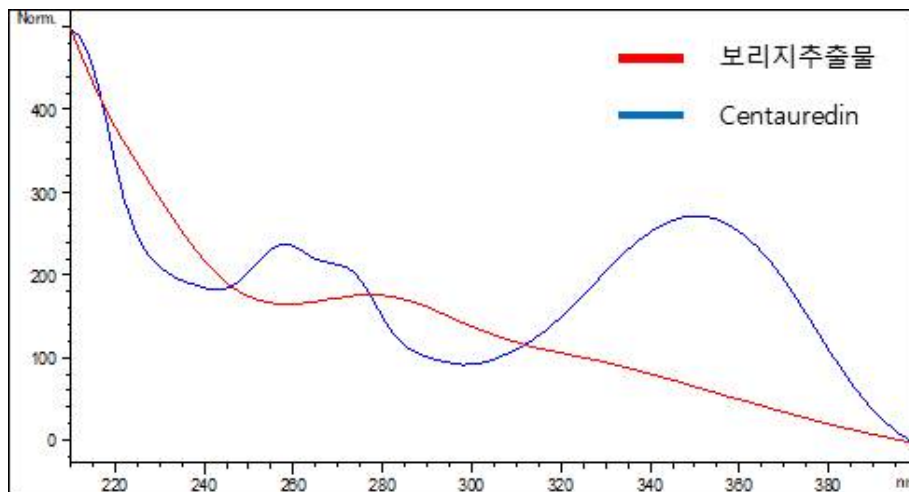
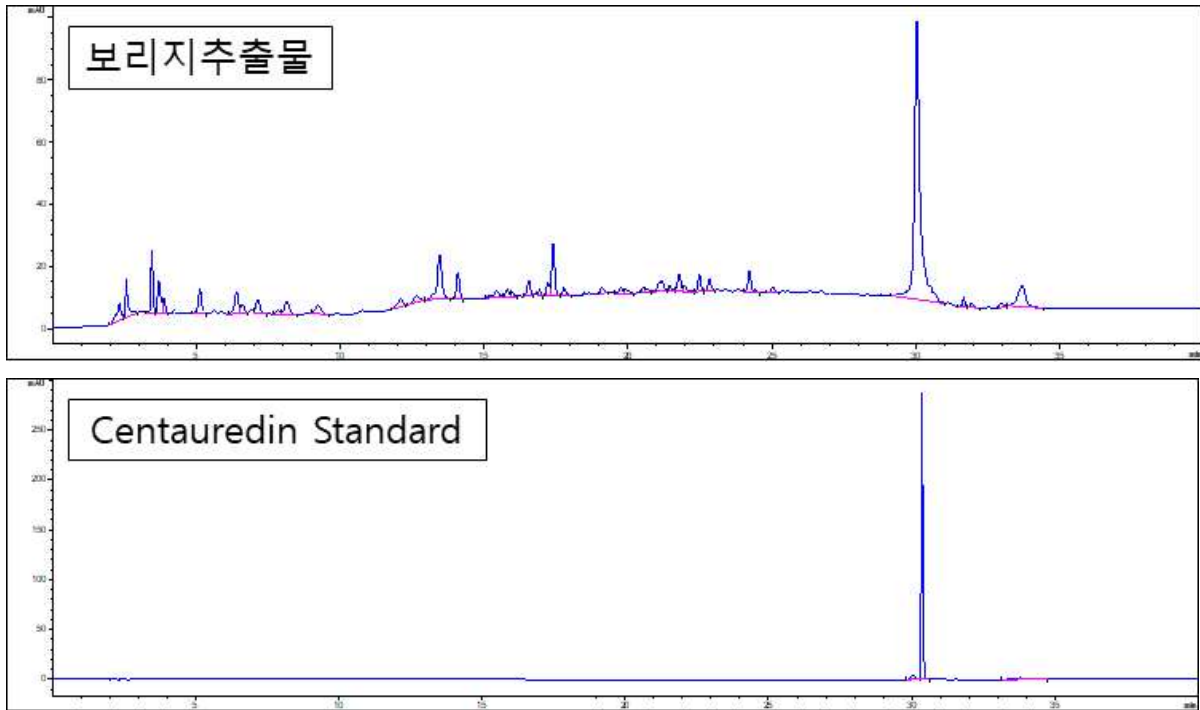


위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Apigenin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 보리지추출물에 Apigenin이 존재하지 않는 것으로 판단.

결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Apigenin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

② Centauredin 분석 검토 결과

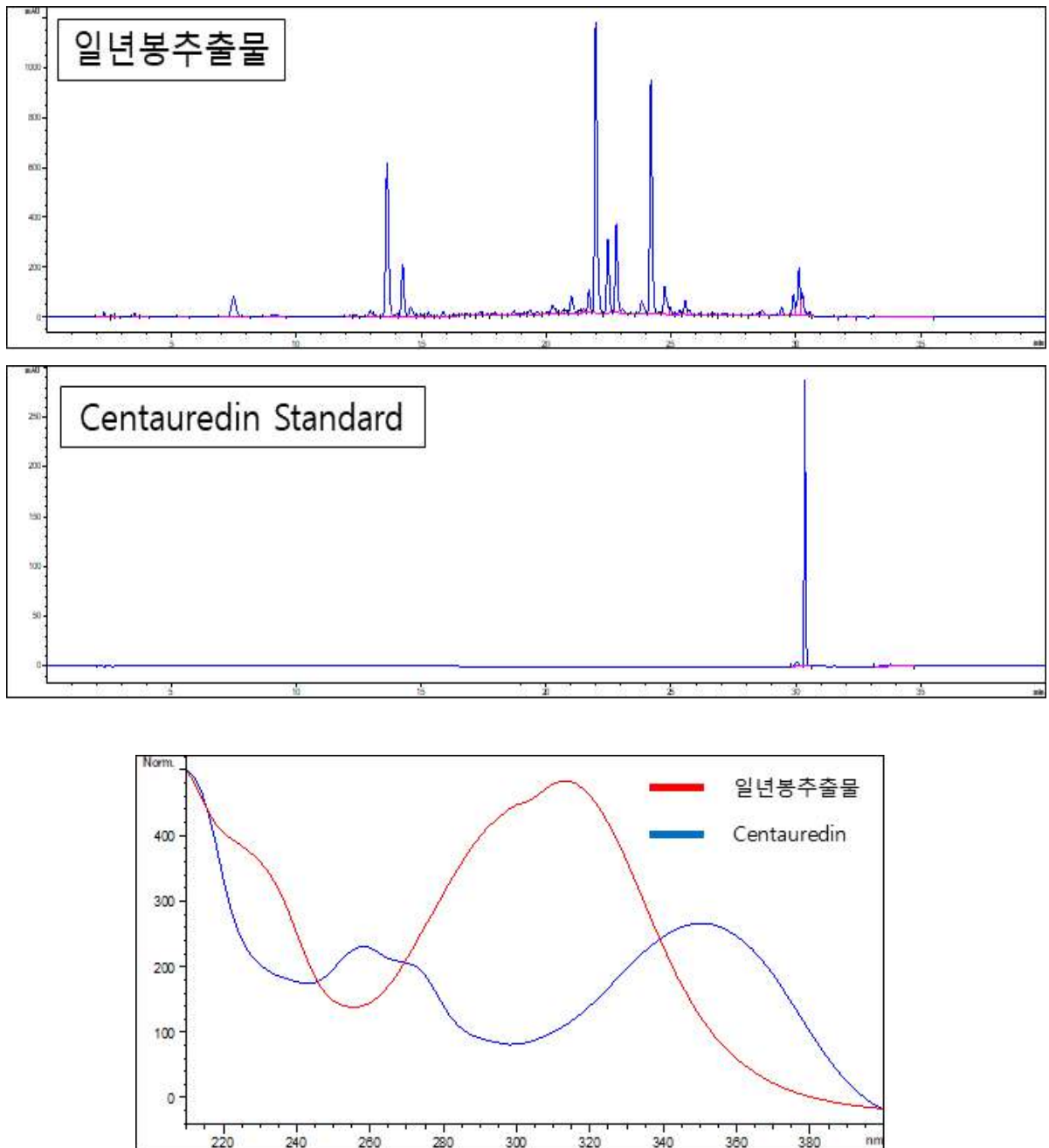
(ㄱ) 보리지추출물 내 Centauredin 분석결과



위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Centauredin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 보리지추출물에 Centauredin이 존재하지 않는 것으로 판단.



(ㄴ) 일년봉추출물 내 Centauredin 분석결과



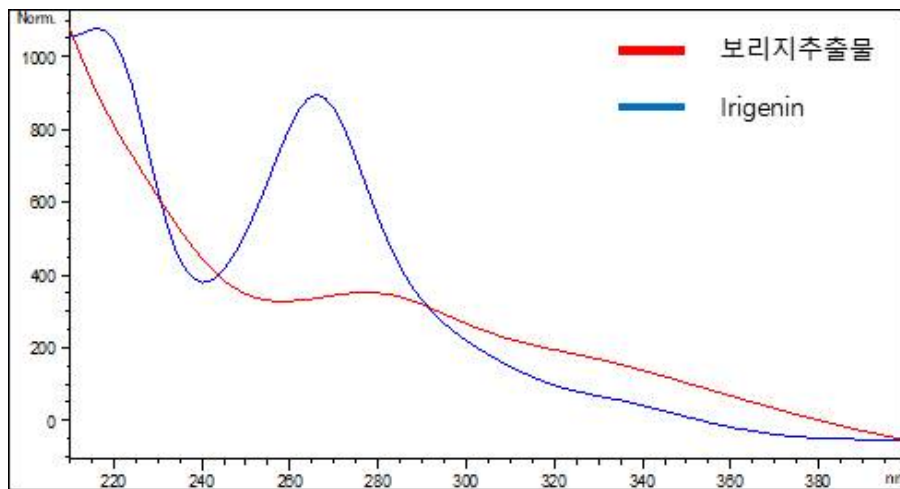
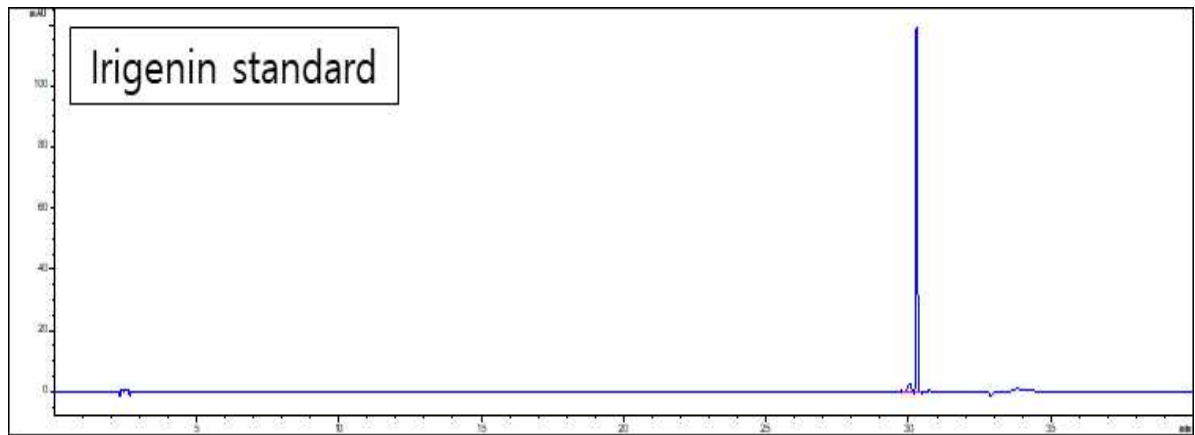
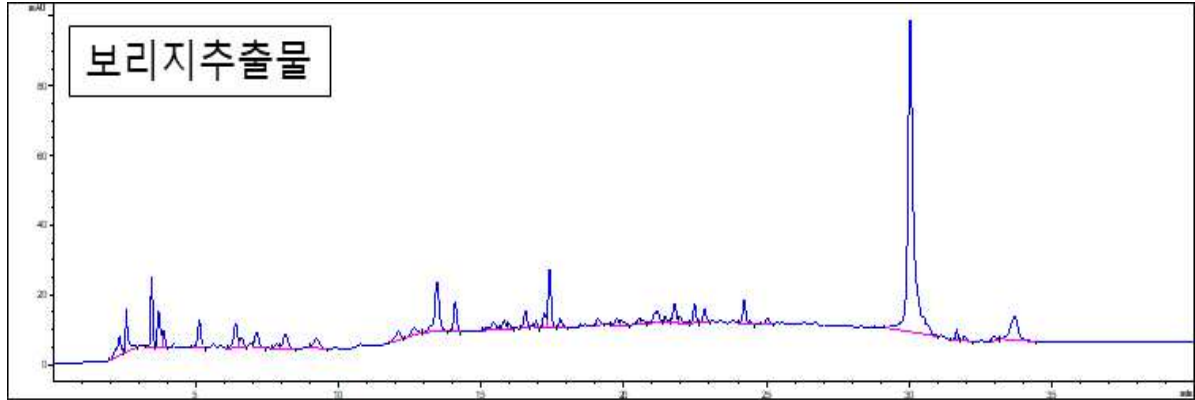
위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Centauredin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 일년봉추출물에 Centauredin이 존재하지 않는 것으로 판단.

결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Centauredin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.



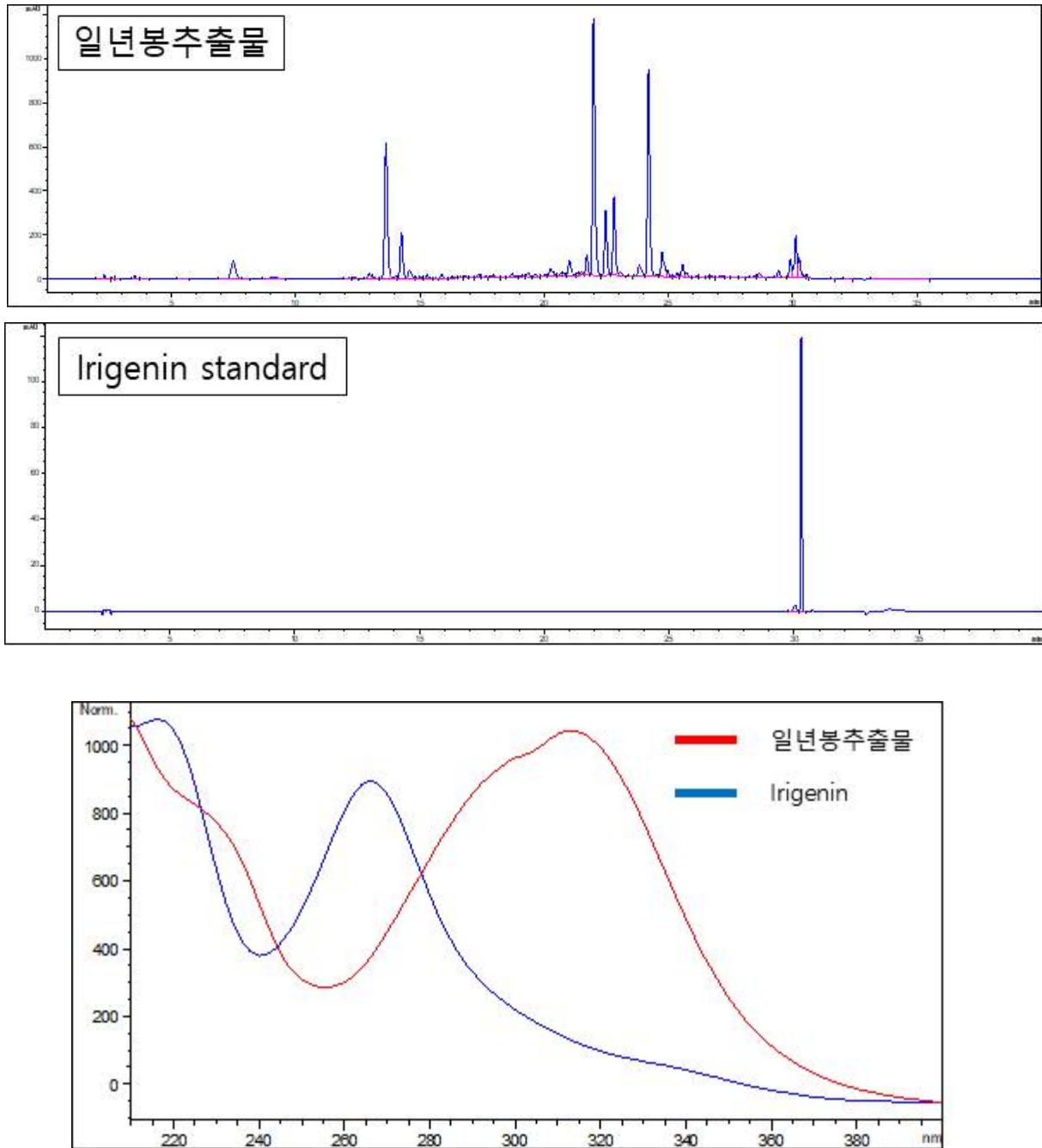
③ Iriegenin 분석 검토 실험결과

(ㄱ) 보리지추출물 내 Iriegenin 분석결과



위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Iriegenin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 보리지추출물에 Iriegenin이 존재하지 않는 것으로 판단.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 Iridenin 분석결과

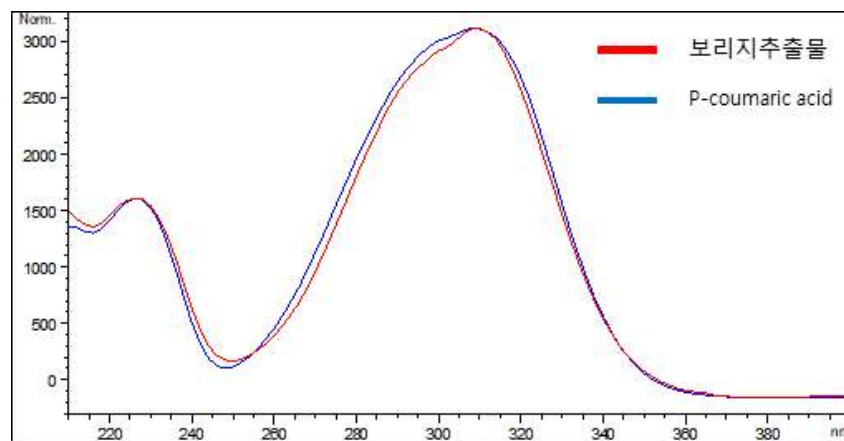
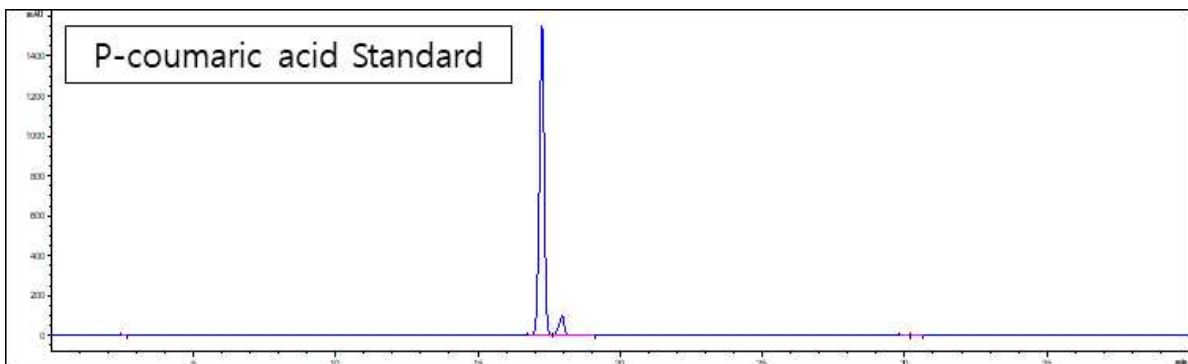
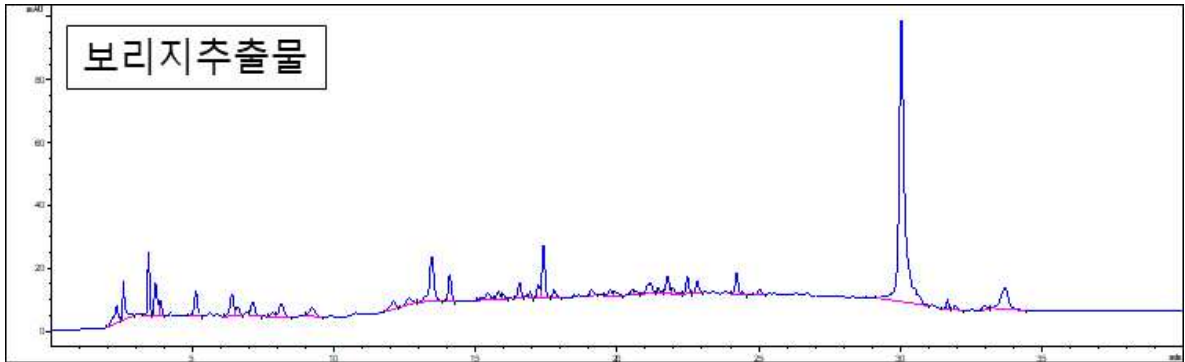


위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Iridenin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 일년봉추출물에 Iridenin이 존재하지 않는 것으로 판단.

결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Iridenin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

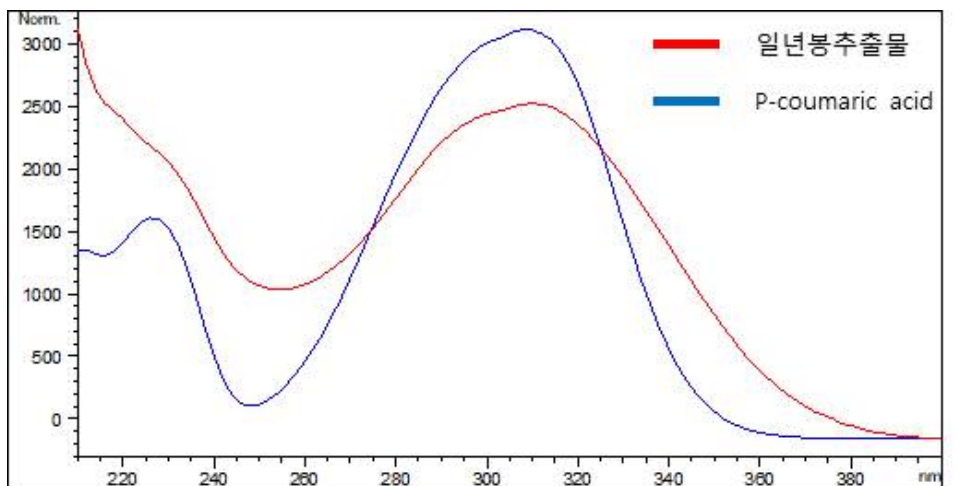
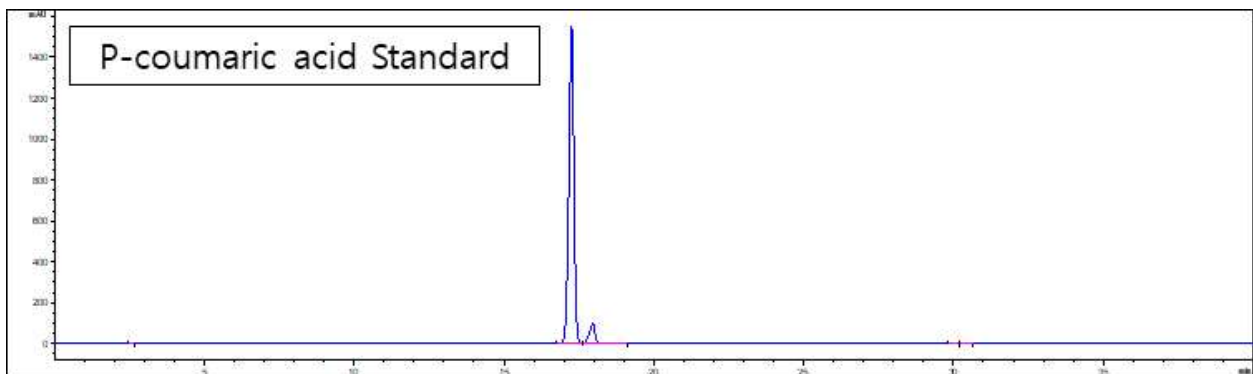
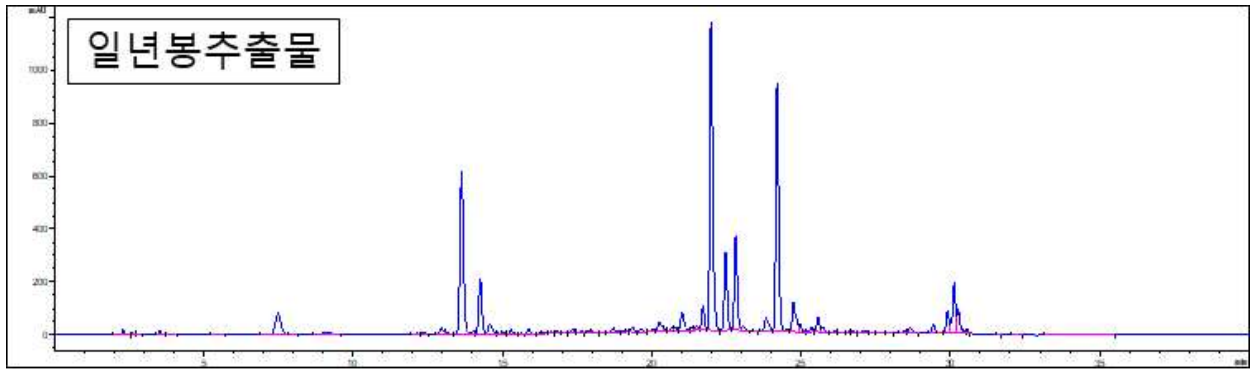
④ P-coumaric acid 분석 검토 실험결과

(ㄱ) 보리지추출물 내 P-coumaric acid 분석결과



위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 P-coumaric acid 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT와 UV Spectrum의 패턴이 일치함. 이를 정량화한 결과, 보리지추출물에서 P-coumaric acid가 0.0339mg/g 검출됨.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 P-coumaric acid 분석결과

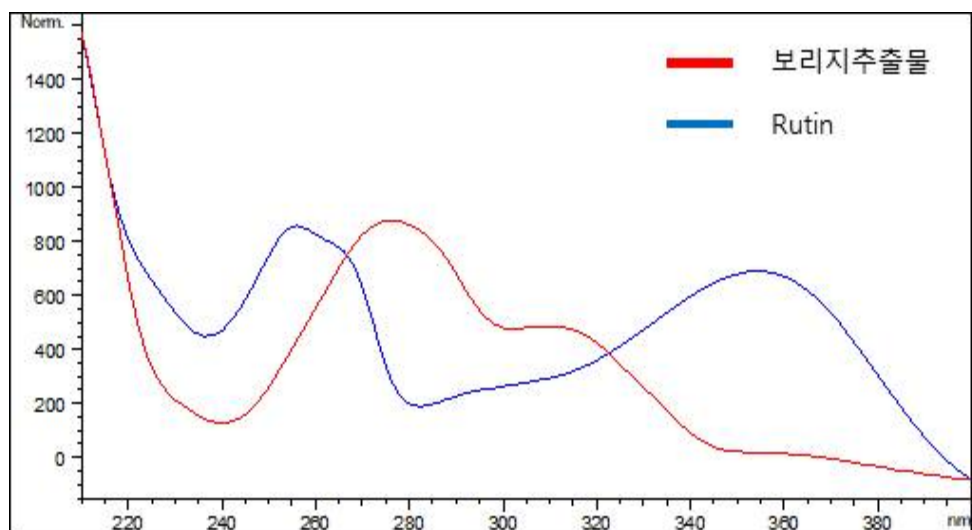
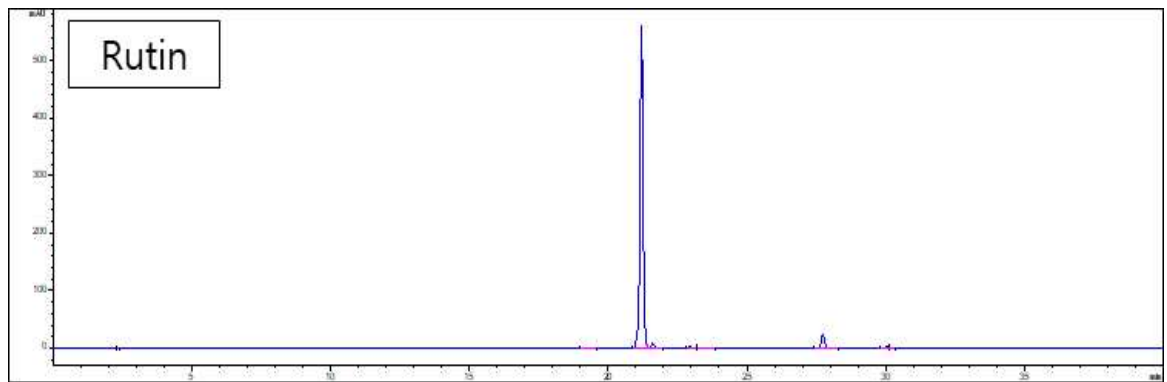
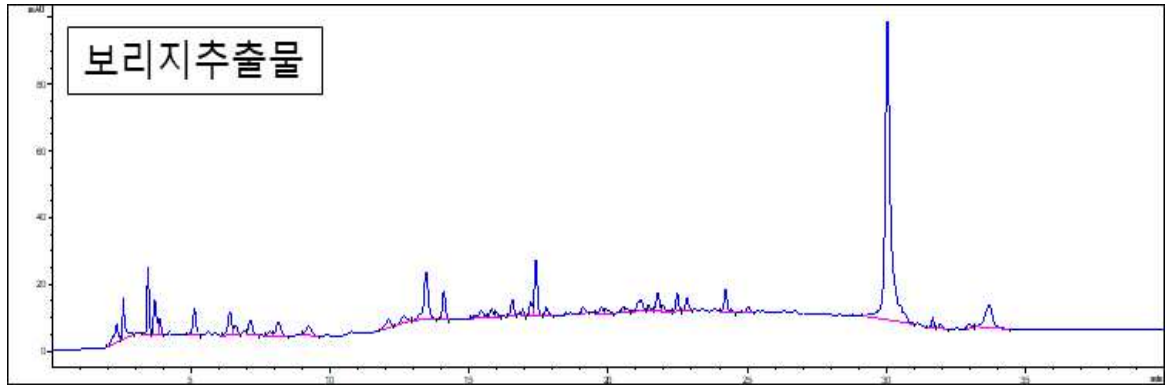


위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 P-coumaric acid 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 일년봉추출물에 P-coumaric acid가 존재하지 않는 것으로 판단.

결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 P-coumaric acid가 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

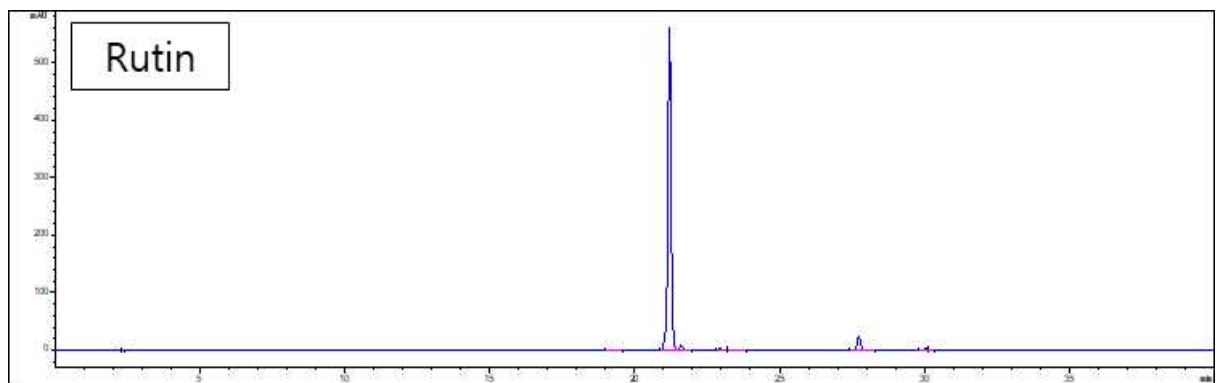
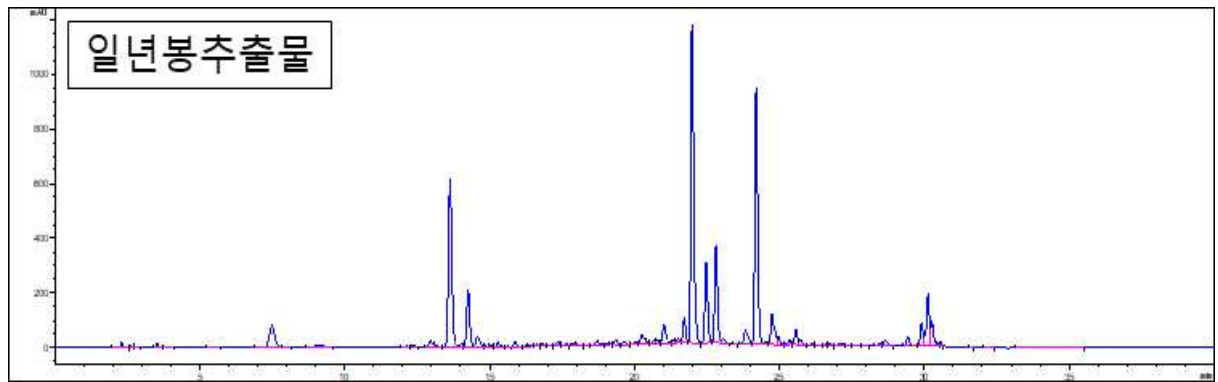
⑤ Rutin 분석 검토 실험결과

(ㄱ) 보리지추출물 내 Rutin 분석결과



위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Rutin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 보리지추출물에 Rutin이 존재하지 않는 것으로 판단.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 Rutin 분석결과

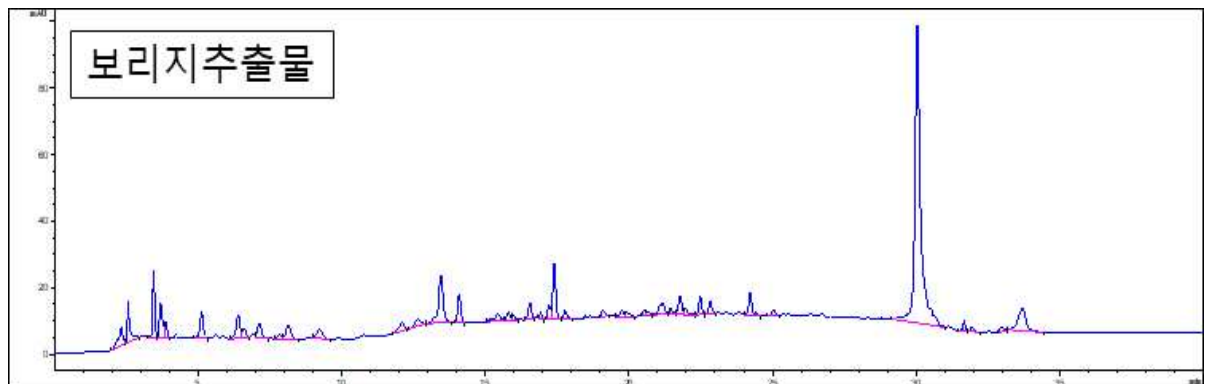


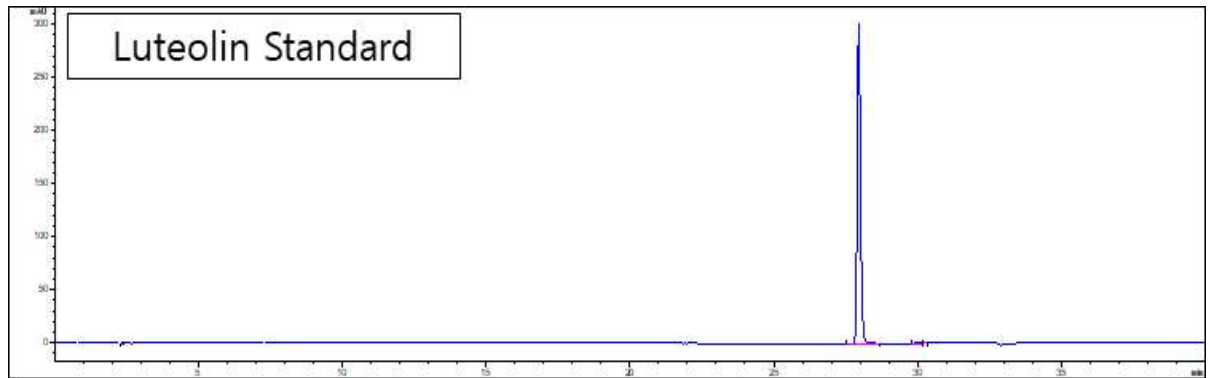
위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Rutin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 일년봉추출물에 Rutin이 존재하지 않는 것으로 판단.

결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Rutin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

⑥ Luteolin 분석 검토 실험결과

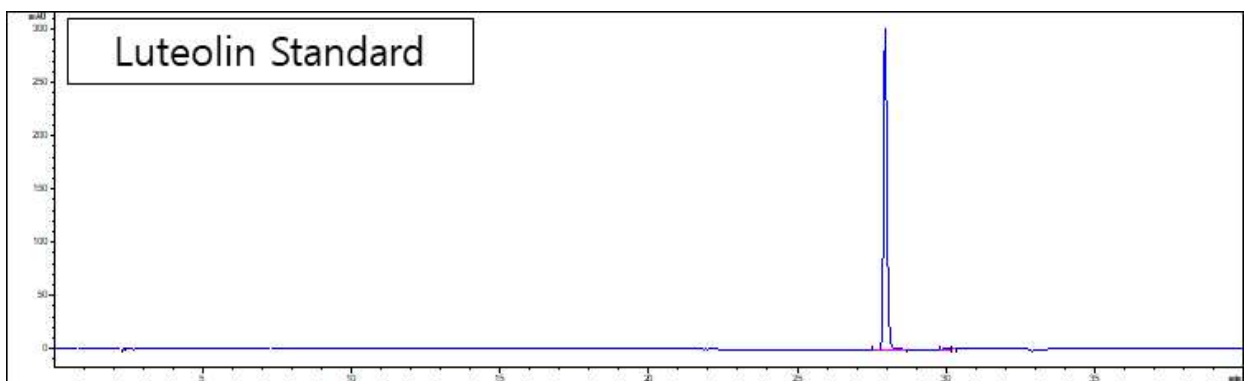
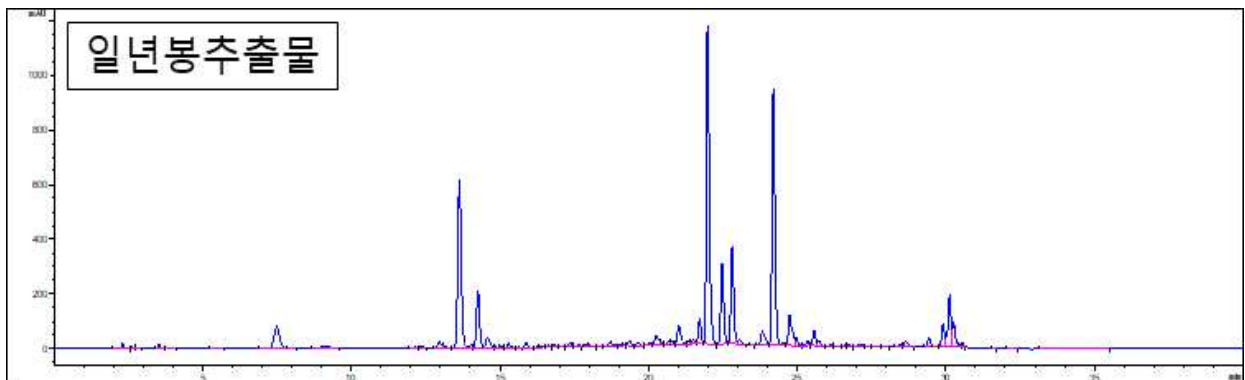
(ㄱ) 보리지추출물 내 Luteolin 분석결과





위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Luteolin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 보리지추출물에 Luteolin이 존재하지 않는 것으로 판단.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 Luteolin 분석결과

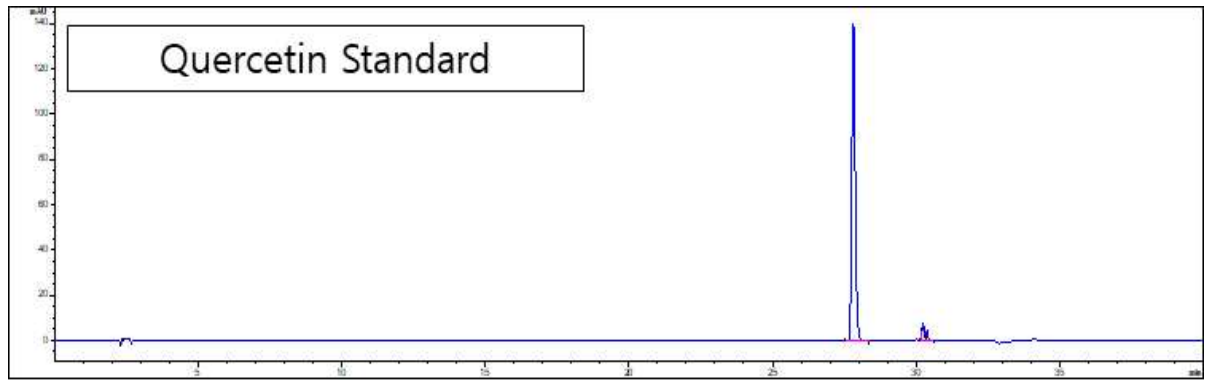
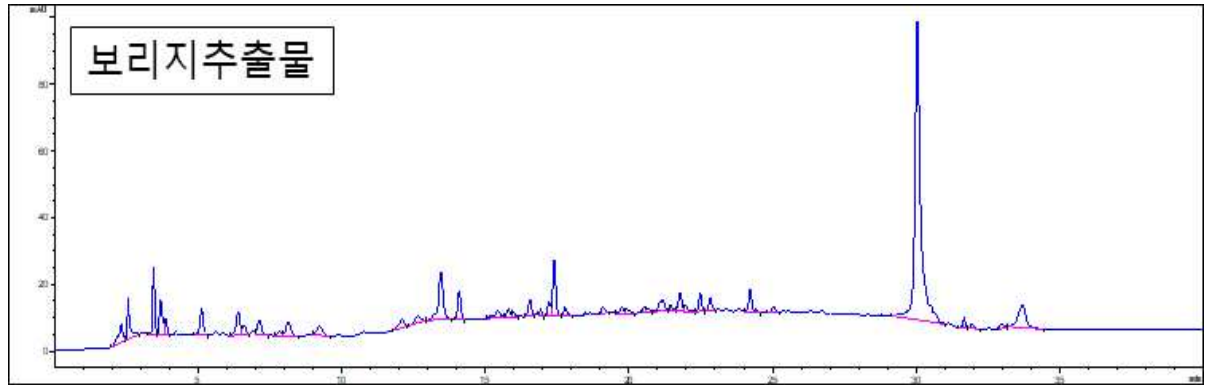


위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Luteolin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 일년봉추출물에 Luteolin이 존재하지 않는 것으로 판단.

결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Luteolin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

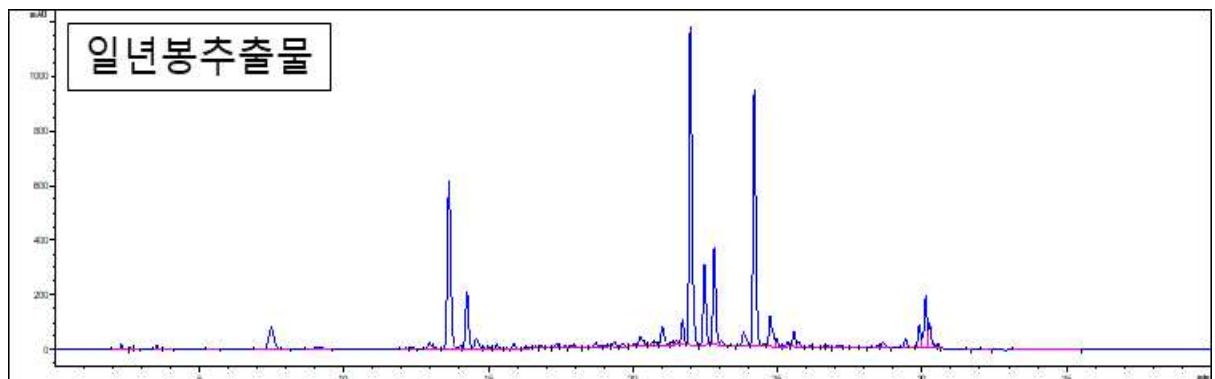
⑦ Quercetin 분석 검토 실험결과

(ㄱ) 보리지추출물 내 Quercetin 분석결과

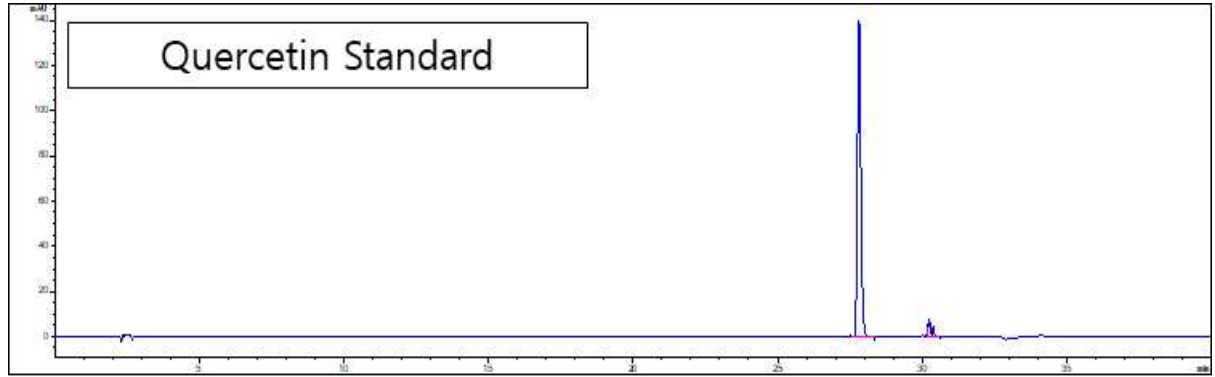


위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Quercetin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 보리지추출물에 Quercetin이 존재하지 않는 것으로 판단.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 Quercetin 분석결과



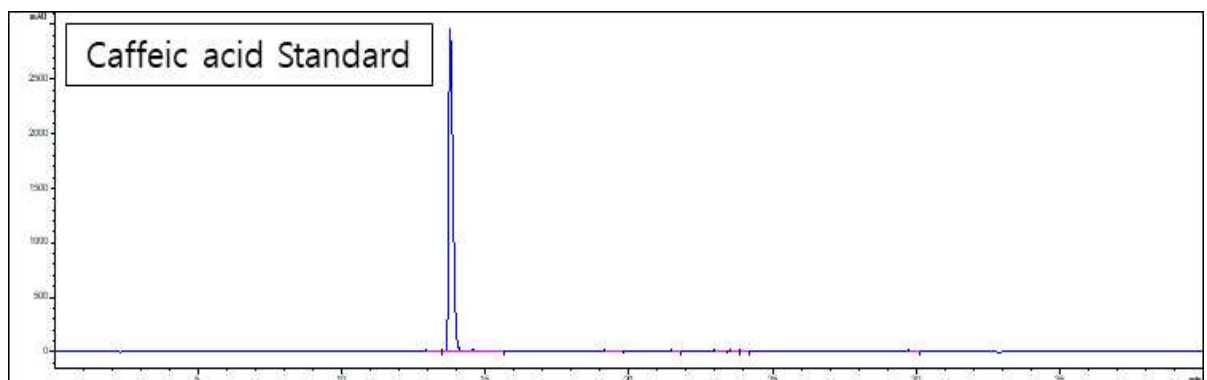
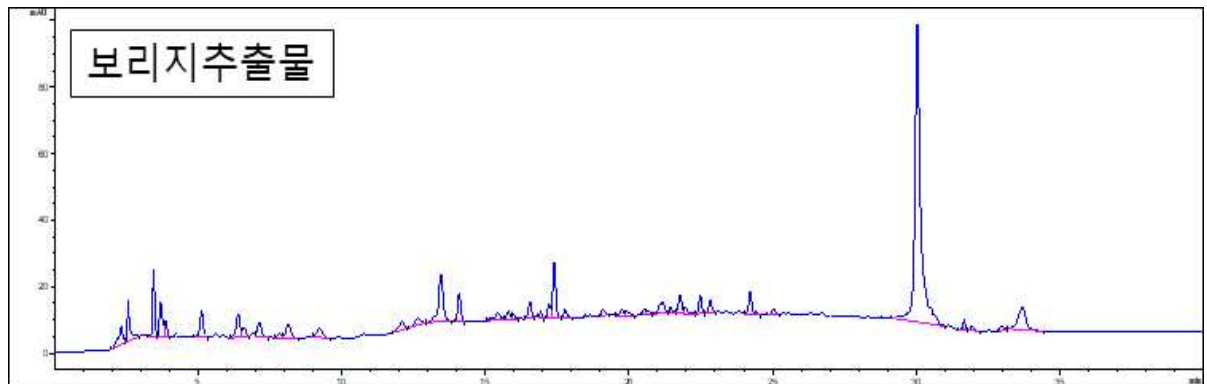




위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Quercetin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 일년봉추출물에 Quercetin이 존재하지 않는 것으로 판단. 결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Quercetin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

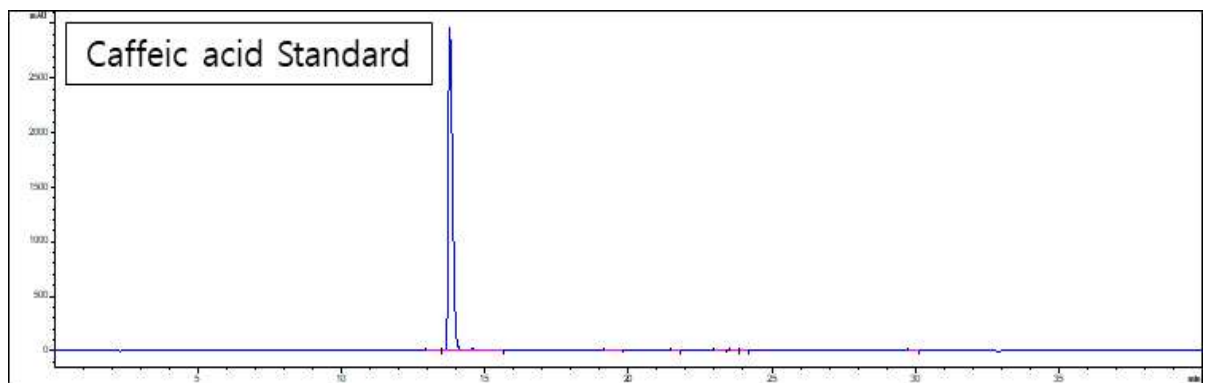
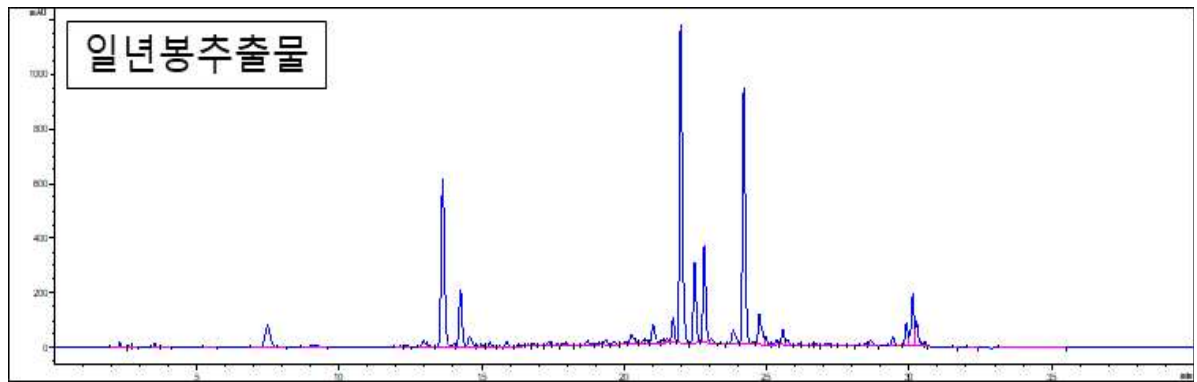
⑧ Caffeic acid 분석 검토 실험결과

(ㄱ) 보리지추출물 내 Caffeic acid 분석결과



위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Caffeic acid 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 보리지추출물에 Caffeic acid이 존재하지 않는 것으로 판단.

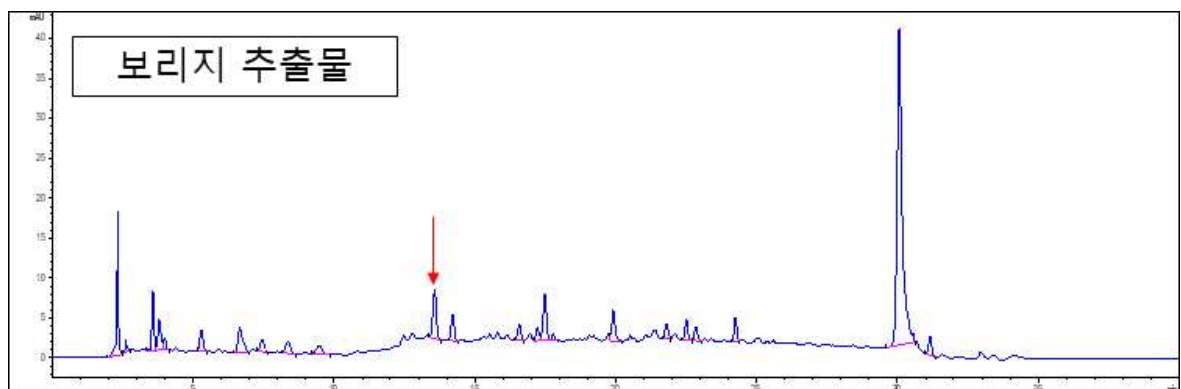
(ㄴ) 일년봉추출물 내 Caffeic acid 분석결과

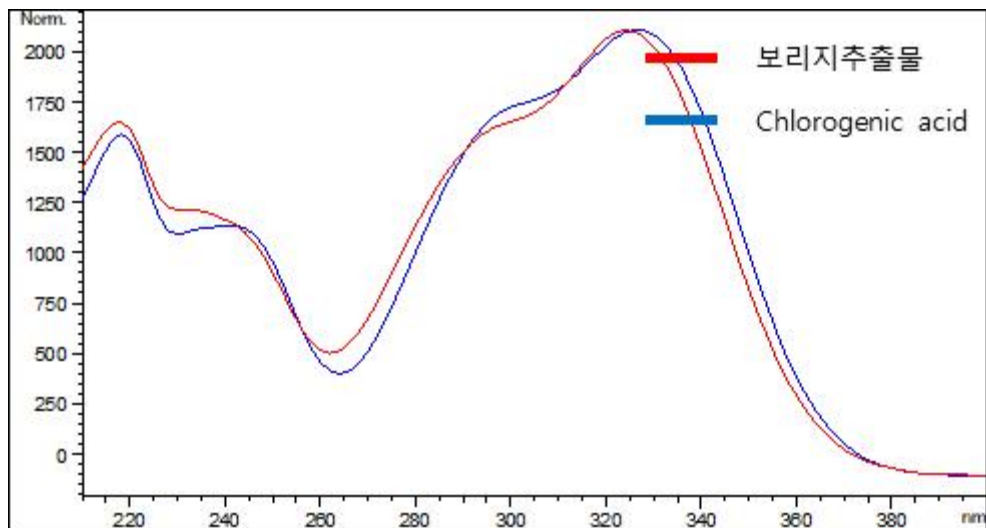
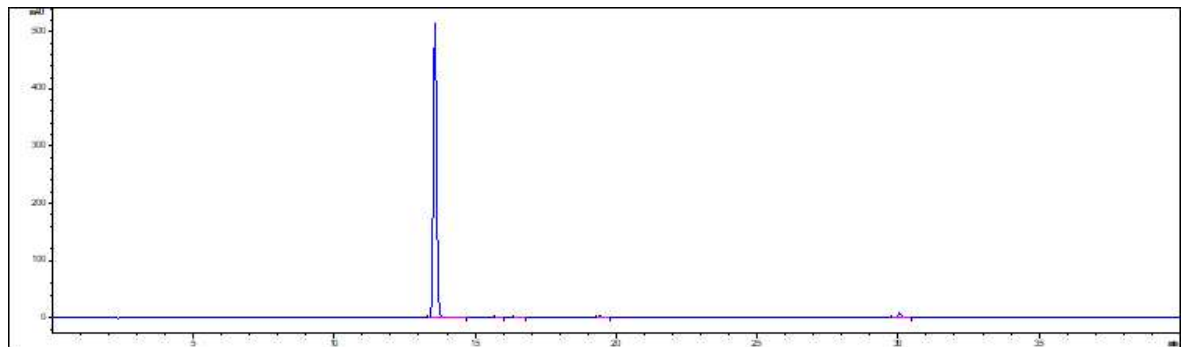
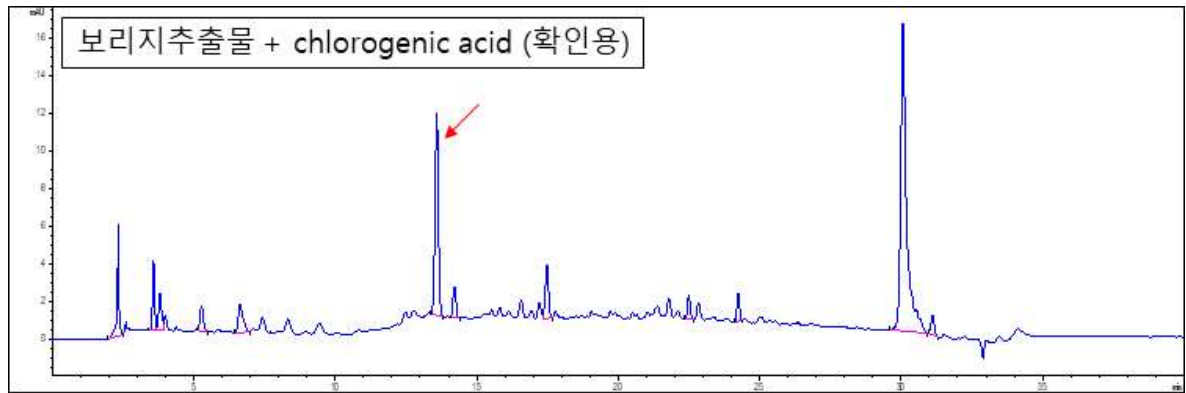


위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Caffeic acid 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 일년봉추출물에 Caffeic acid 이 존재하지 않는 것으로 판단. 결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Caffeic acid가 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

⑨ Chlorogenic acid 분석 검토 실험결과

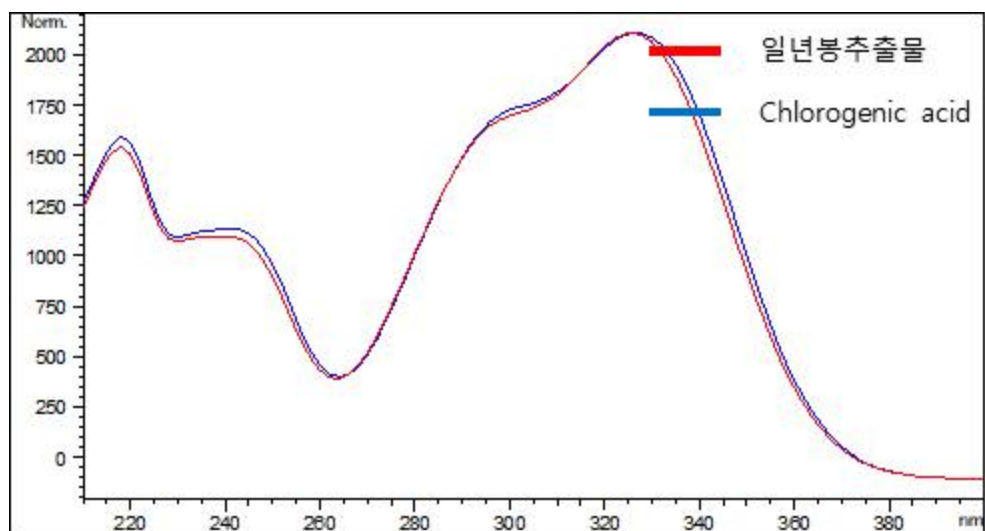
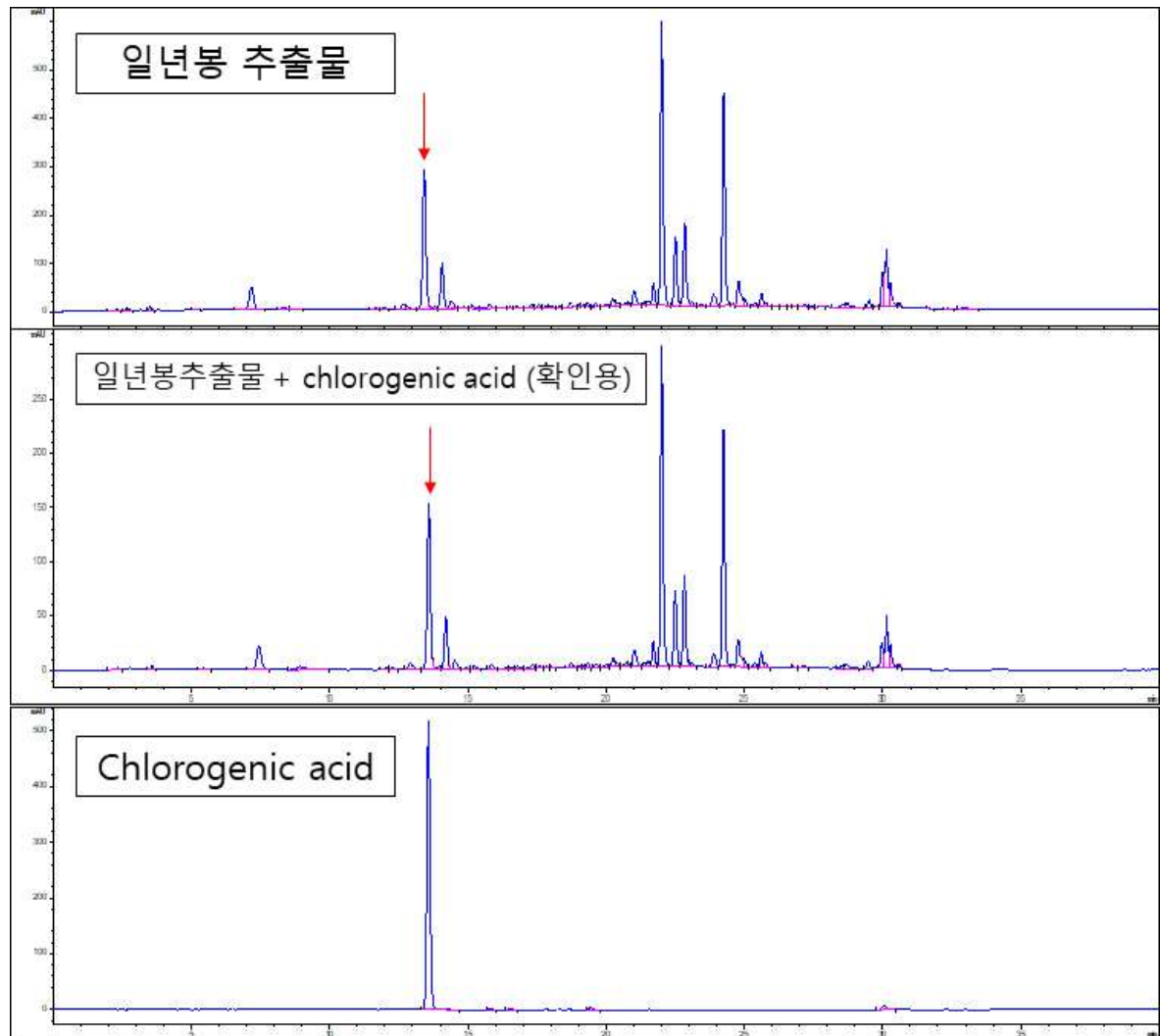
(ㄱ) 보리지추출물 내 Chlorogenic acid 분석결과





위 HPLC분석결과와 같이 보리지추출물과 Chlorogenic acid 표준품의 혼합분석그래프와 비교하여 보리지추출물 단독 분석그래프에서 Chlorogenic acid피크를 확인할 수 있었고 RT와 UV Spectru의 패턴이 일치함. 이를 정량화한 결과, 보리지추출물에서 Chlorogenic acid가 0.3122mg/g 검출됨.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 Chlorogenic acid 분석결과

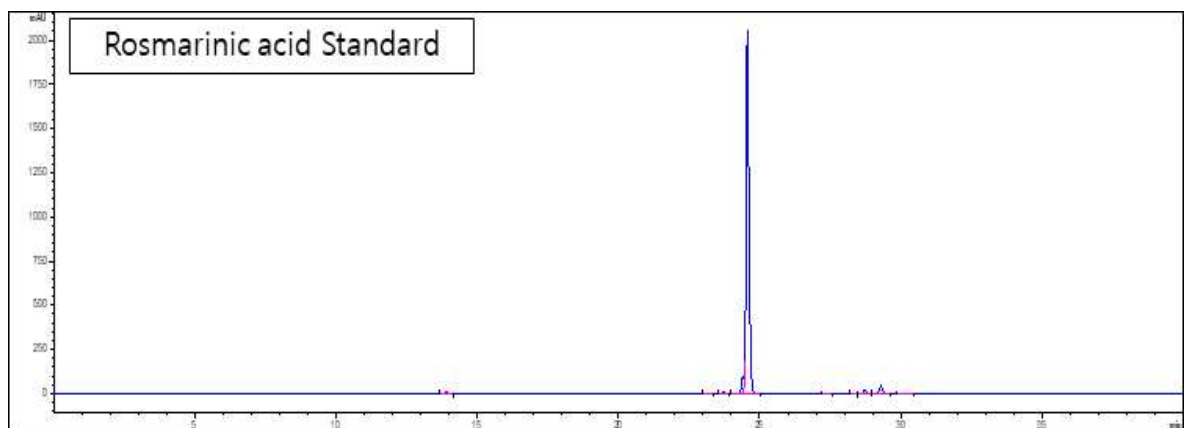
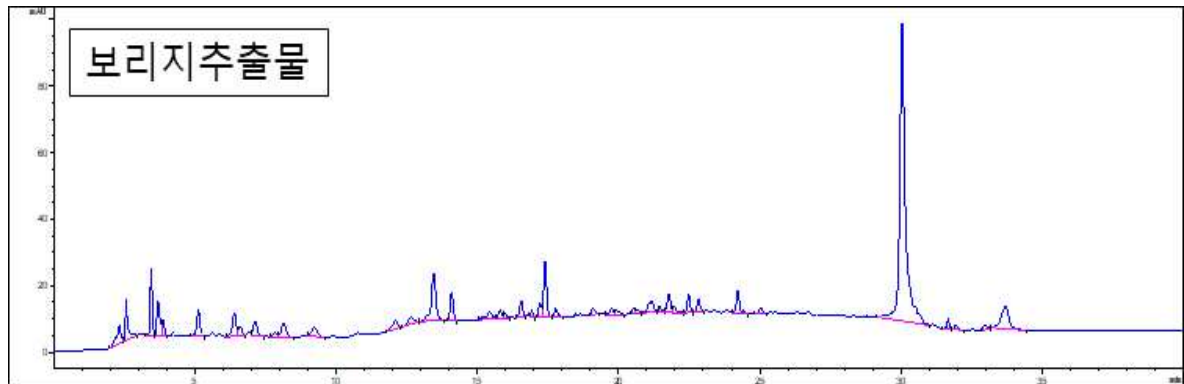


위 HPLC분석결과와 같이 일년봉추출물과 Chlorogenic acid 표준품의 혼합분석그래프와 비교하여 일년봉추출물 단독 분석그래프에서 Chlorogenic acid피크를 확인할 수 있었고 RT와 UV Spectru의 패턴이 일치함. 이를 정량화한 결과, 보리지추출물에서 Chlorogenic acid가 0.3122mg/g 검출됨. 이를 정량화한 결과, 일년봉추출물에서 Chlorogenic acid가 11.3007mg/g 검출됨.

결론적으로 보리지추출물에서 미량(1.0mg/g 이하) 검출되었고, 일년봉추출물에서는 11.3007mg/g 검출되어 일년봉추출물의 지표물질로 타당하다고 판단.

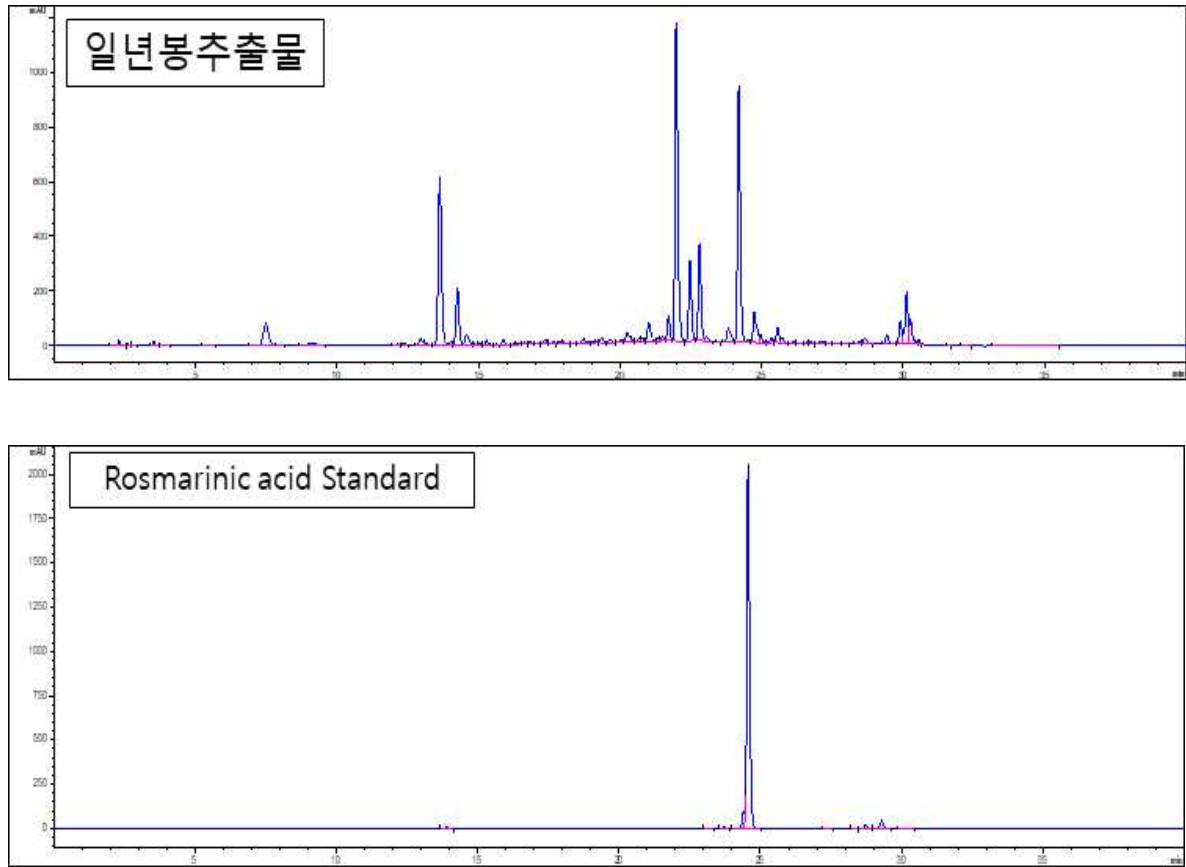
### ⑩ Rosmarinic acid 분석 검토 실험결과

#### (ㄱ) 보리지추출물 내 Rosmarinic acid 분석결과



위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Rosmarinic acid 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 보리지추출물에 Rosmarinic acid가 존재하지 않는 것으로 판단.

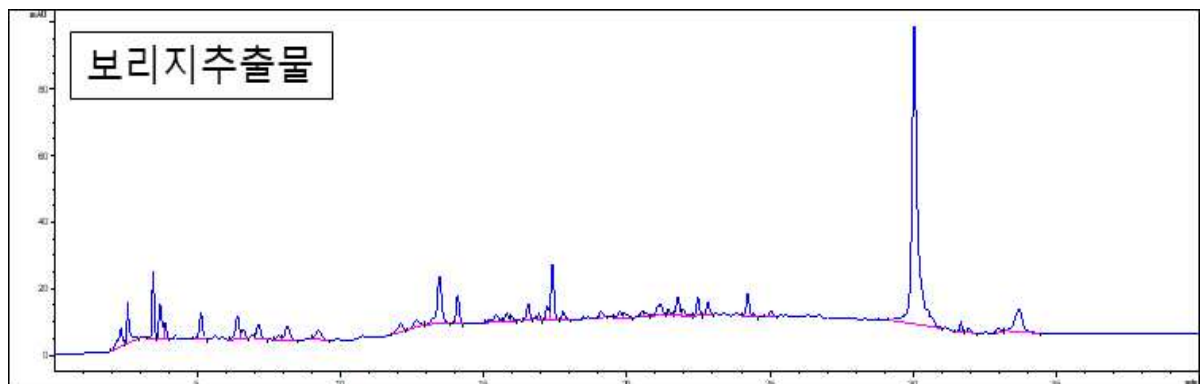
(ㄴ) 일년봉추출물 내 Rosmarinic acid 분석결과

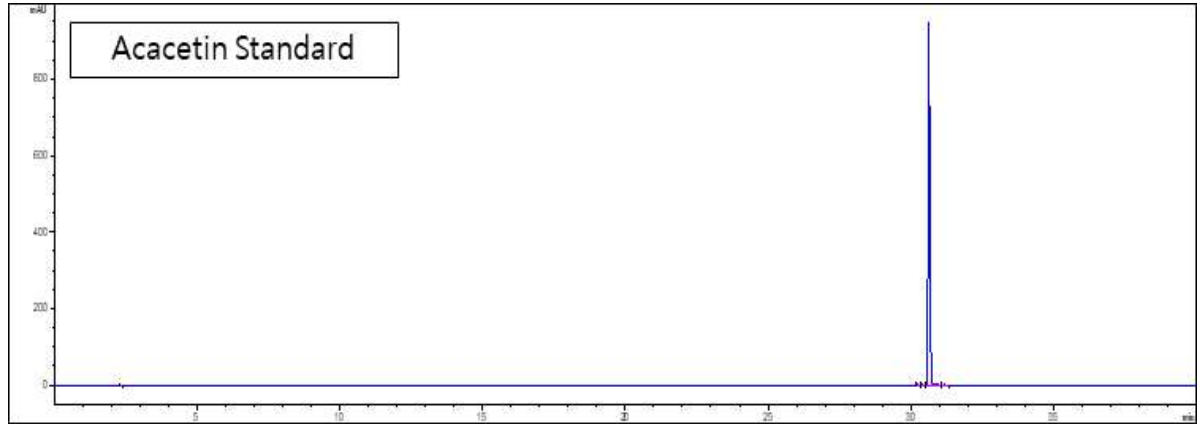


위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Rosmarinic acid 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 일년봉추출물에 Rosmarinic acid 가 존재하지 않는 것으로 판단. 결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Rosmarinic acid가 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

㉑ Acacetin 분석 검토 실험결과

(ㄱ) 보리지추출물 내 Acacetin 분석결과

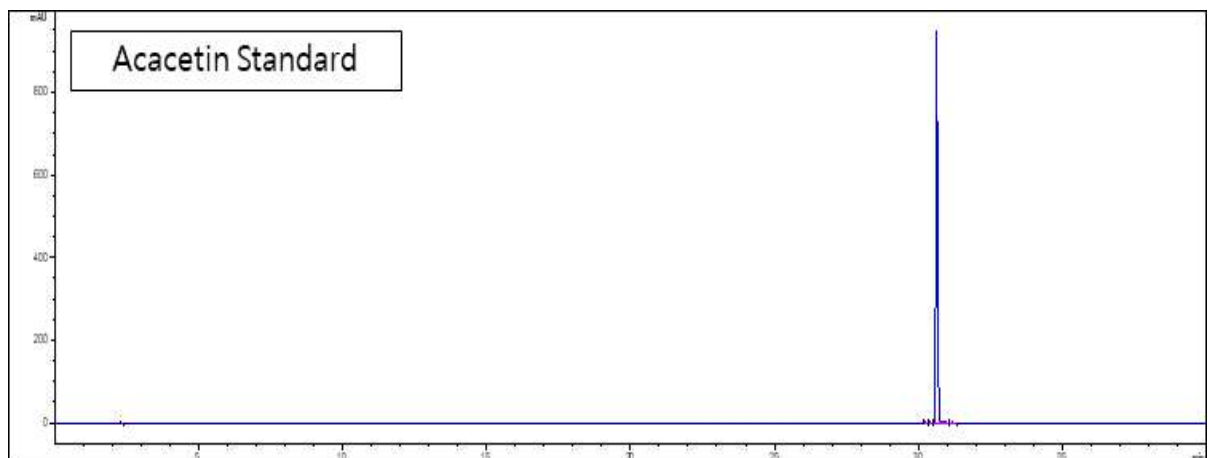
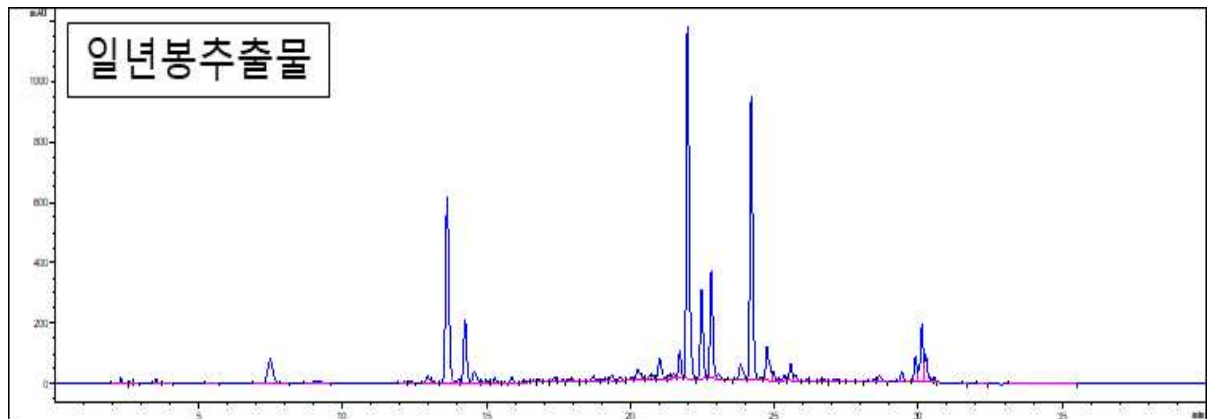


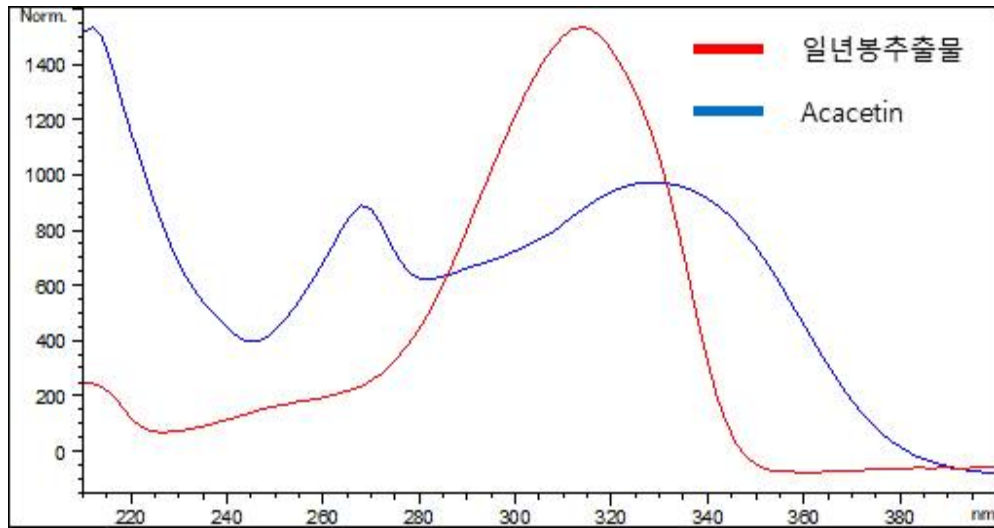


위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Acacetin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 보리지추출물에 Acacetin이 존재하지 않는 것으로 판단.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 Acacetin 분석결과

위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Acacetin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 일년봉추출물에 Acacetin이 존재하지 않는 것으로 판단.

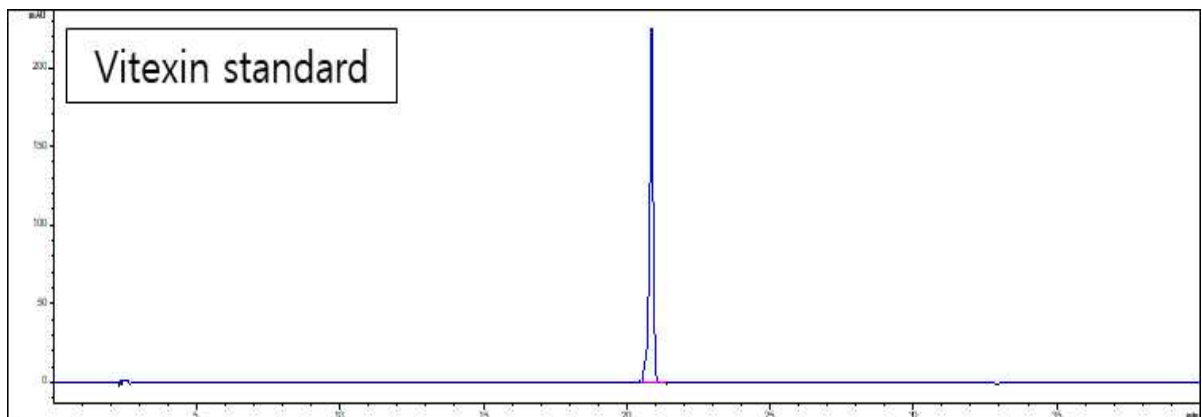
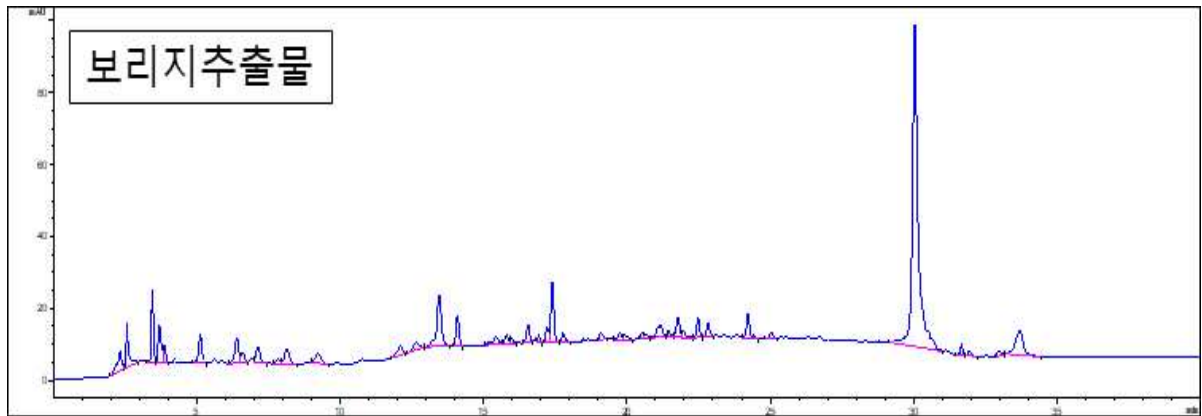




결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Acacetin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

⑫ Vitexin 분석 검토 실험결과

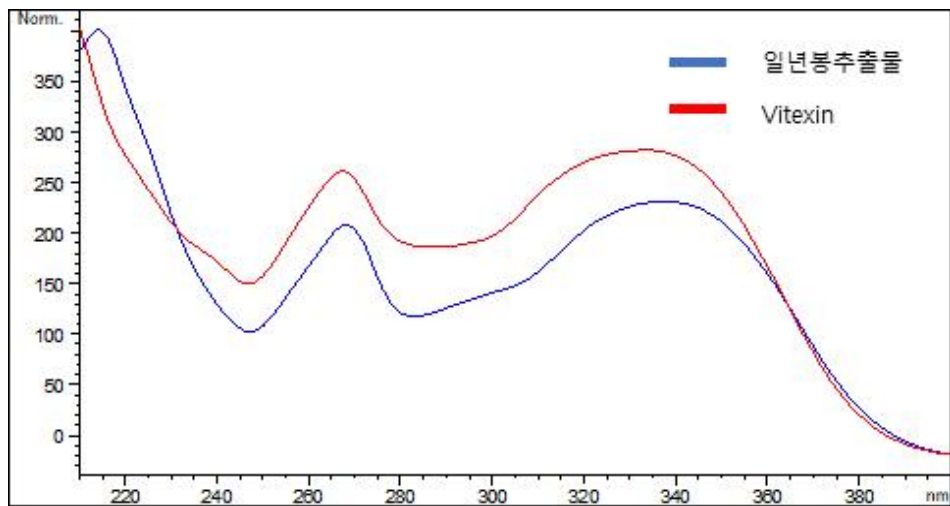
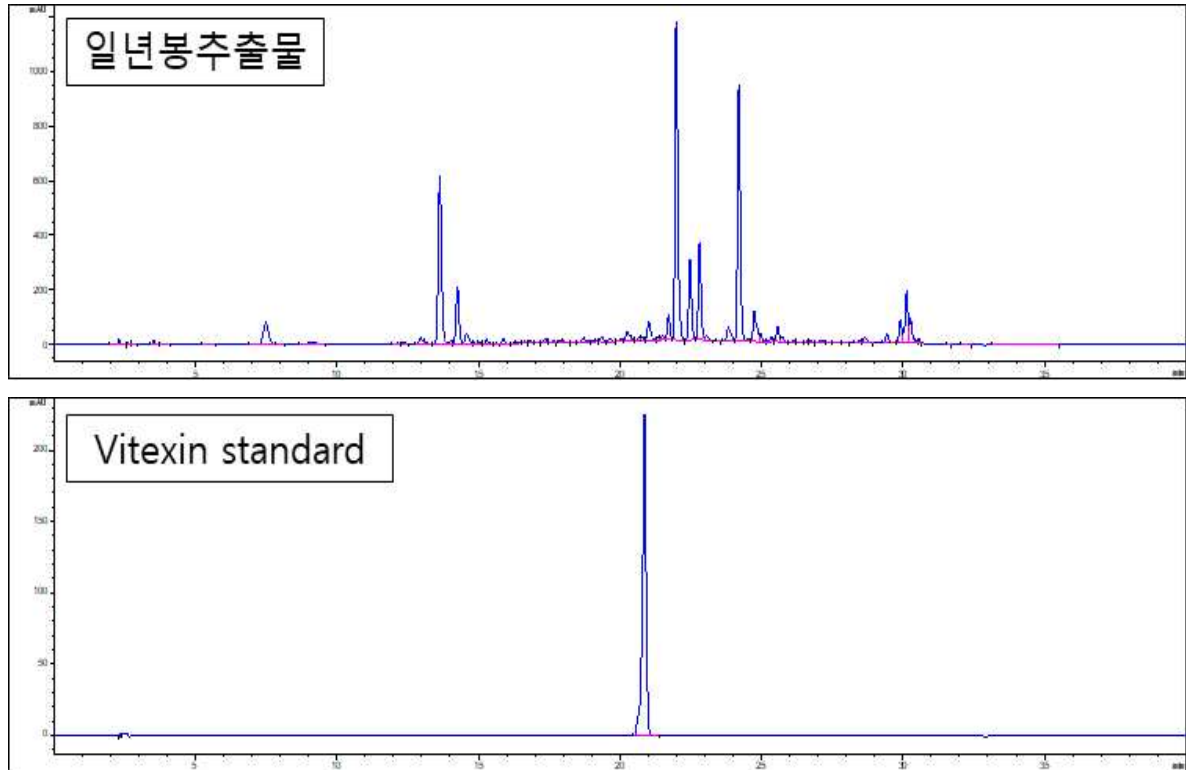
(ㄱ) 보리지추출물 내 Vitexin 분석결과





위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Vitexin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 보리지추출물에 Vitexin이 존재하지 않는 것으로 판단.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 Rosmarinic acid 분석결과

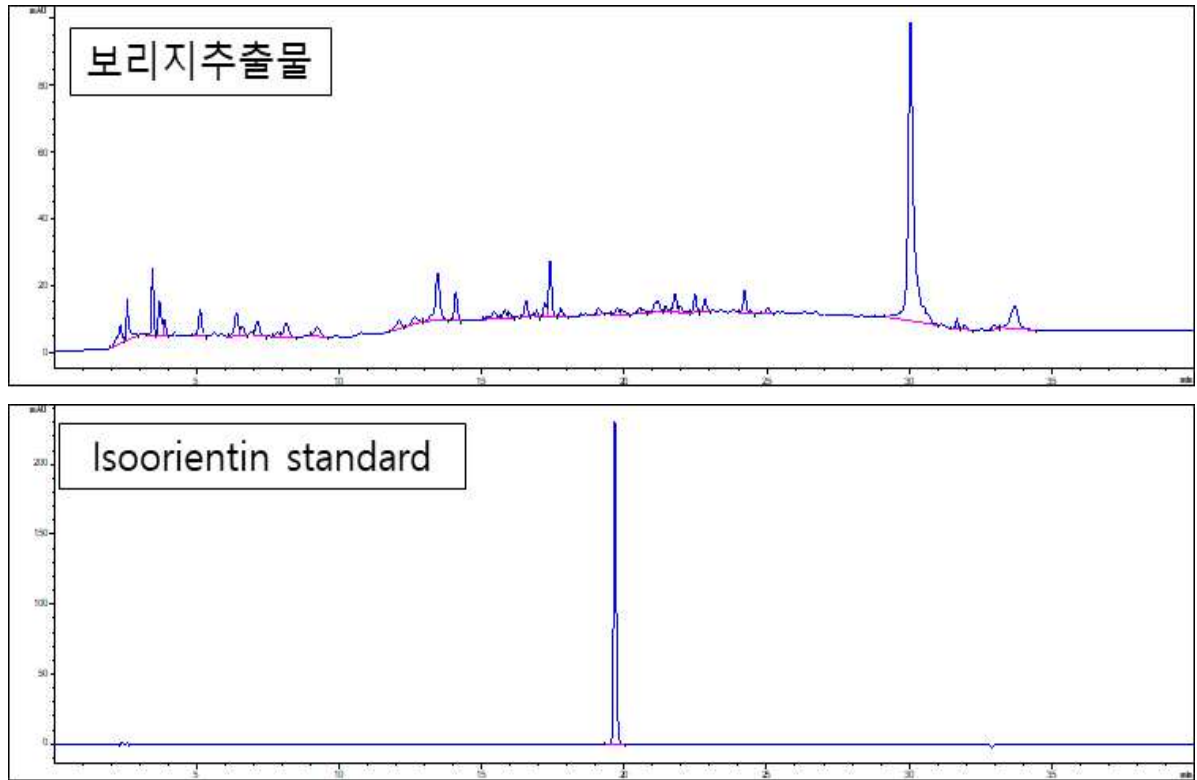


위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Vitexin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 일년봉추출물에 Vitexin이 존재하지 않는 것으로 판단.

결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Vitexin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

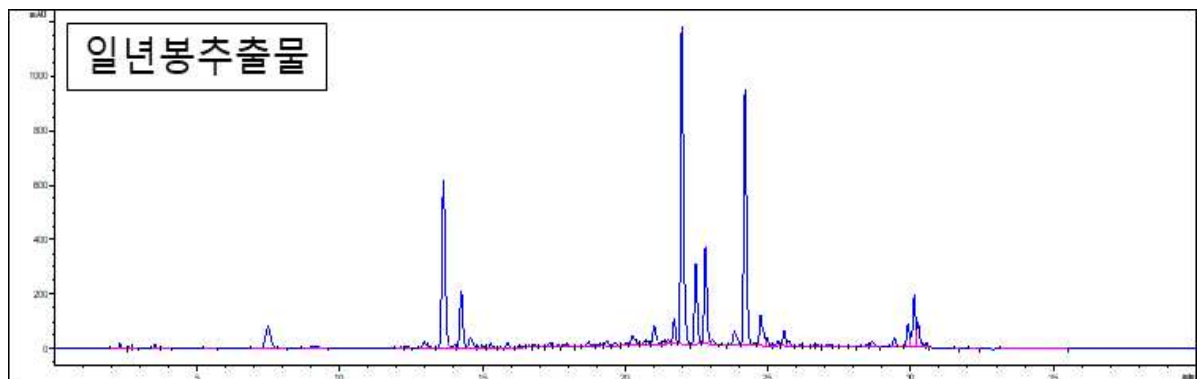
⑬ Isoorientin 분석 검토 실험결과

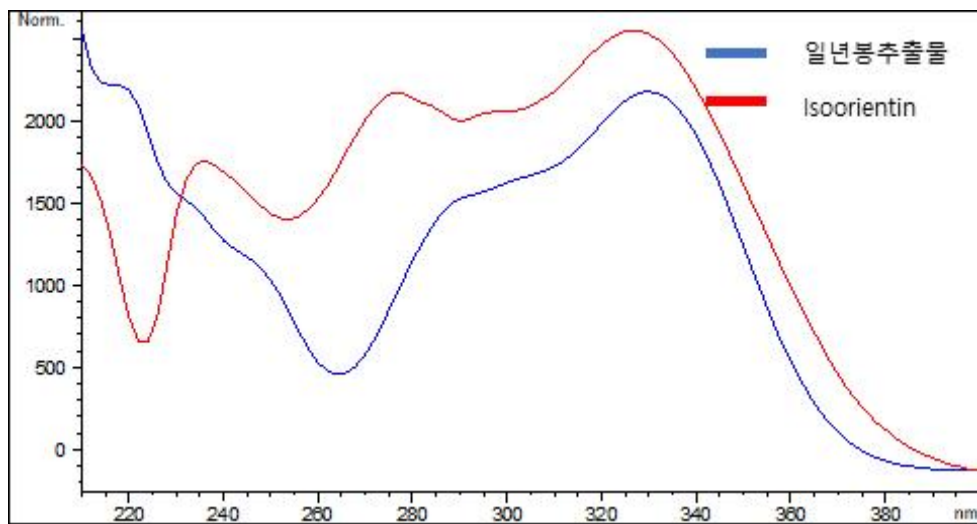
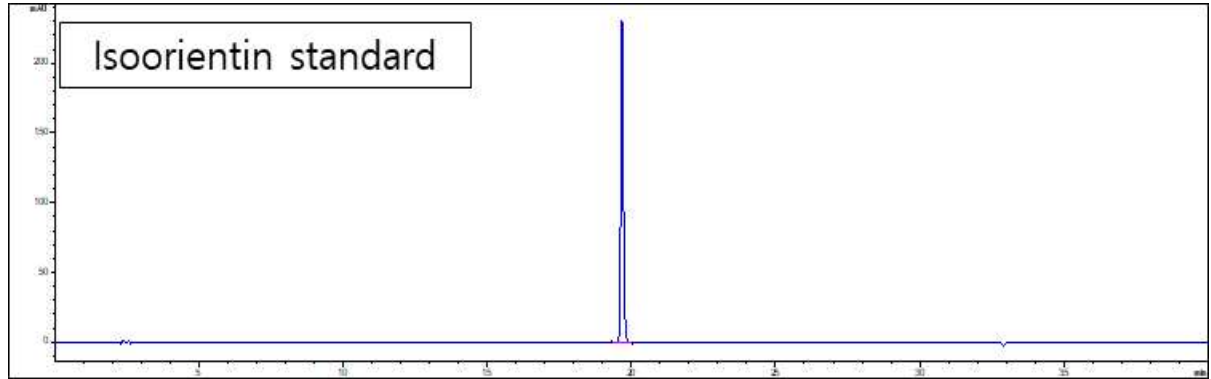
(ㄱ) 보리지추출물 내 Isoorientin 분석결과



위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Isoorientin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 보리지추출물에 Isoorientin이 존재하지 않는 것으로 판단.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 Isoorientin 분석결과



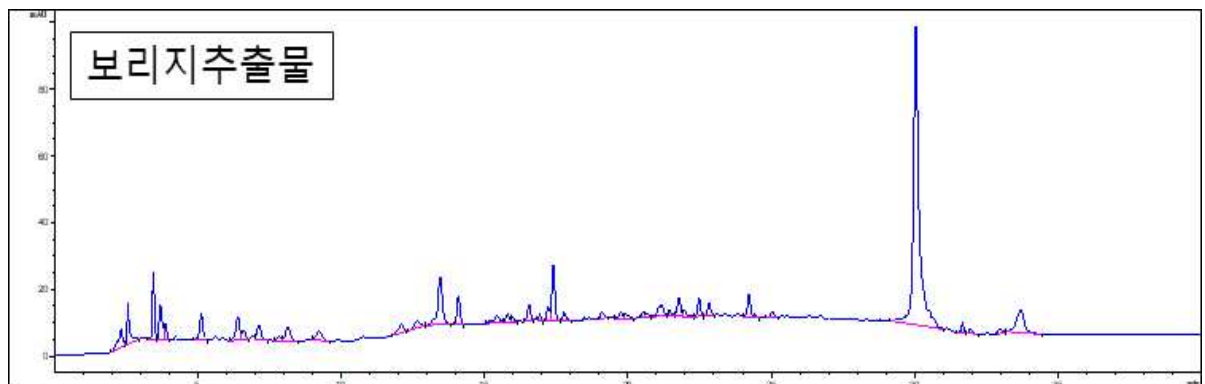


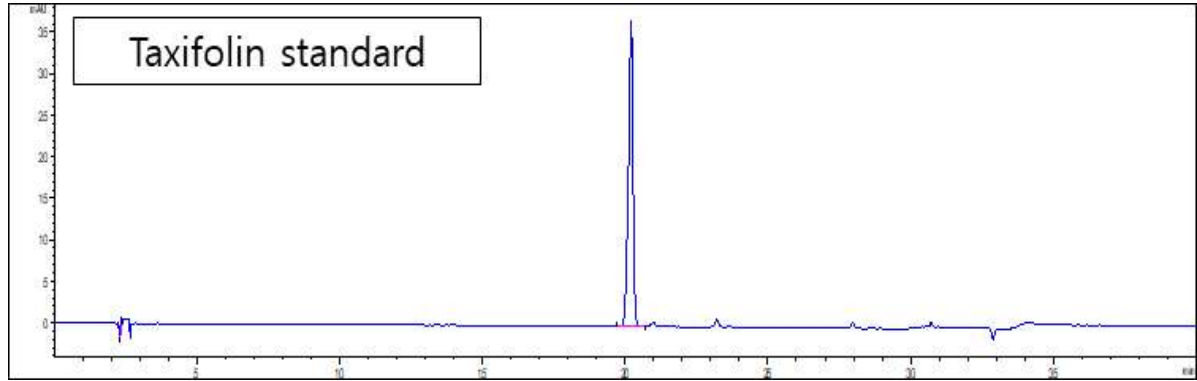
위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Isoorientin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT는 일치하나 UV Spectrum의 패턴이 일치하지 않아 일년봉추출물에 Isoorientin이 존재하지 않는 것으로 판단.

결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Isoorientin가 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

⑭ Taxifolin 분석 검토 실험결과

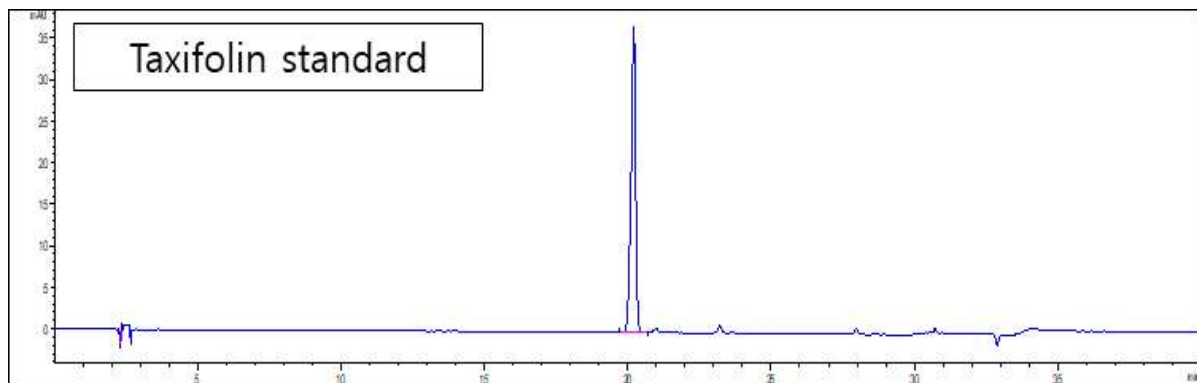
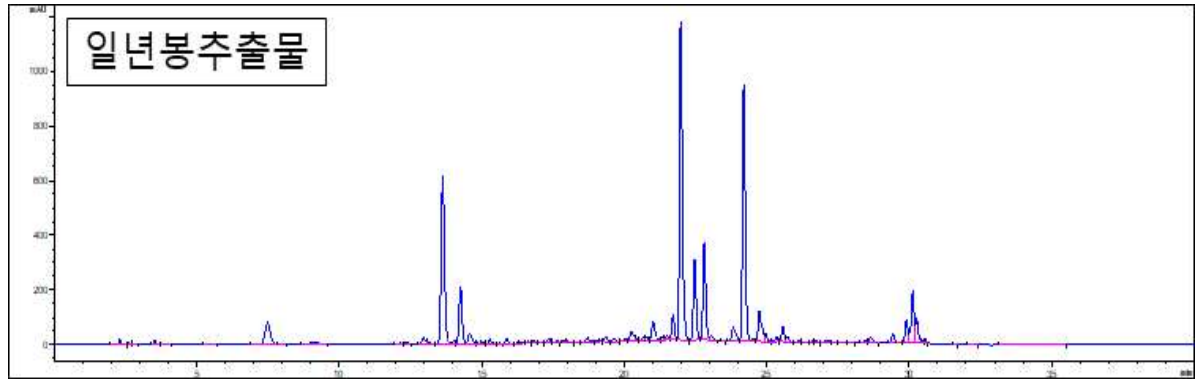
(ㄱ) 보리지추출물 내 Taxifolin 분석결과





위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Taxifolin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 보리지추출물에 Taxifolin이 존재하지 않는 것으로 판단.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 Taxifolin 분석결과

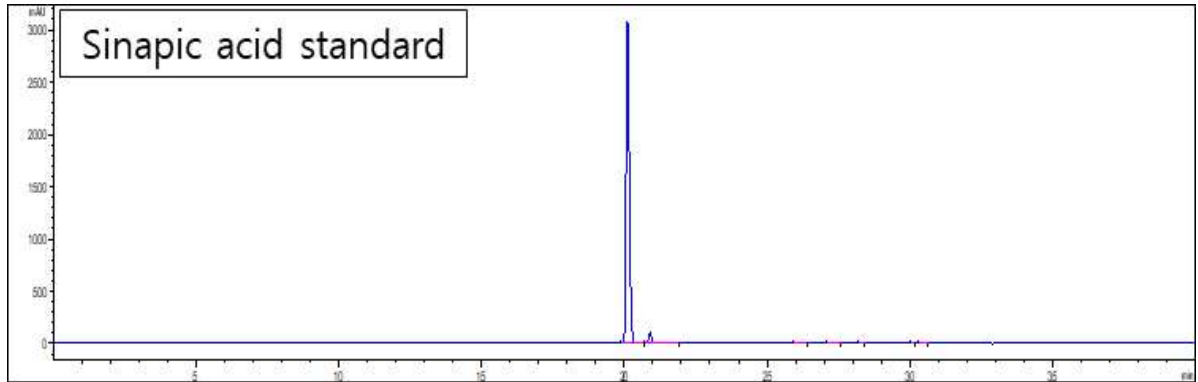
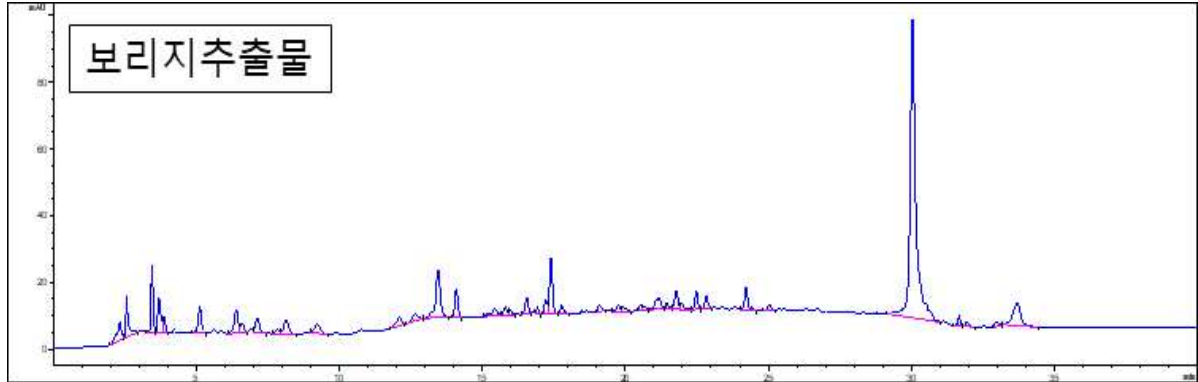


위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Taxifolin 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 일년봉추출물에 Taxifolin이 존재하지 않는 것으로 판단.

결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Taxifolin이 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

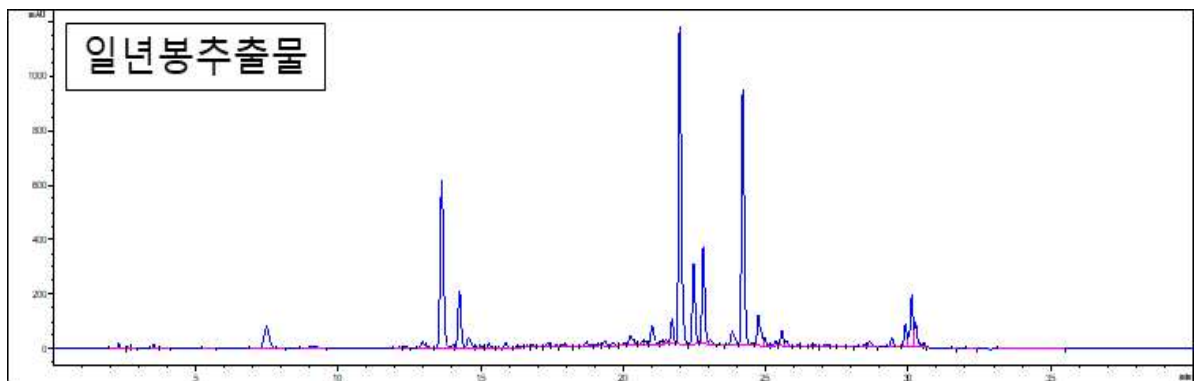
⑮ Sinapic acid 분석 검토 실험결과

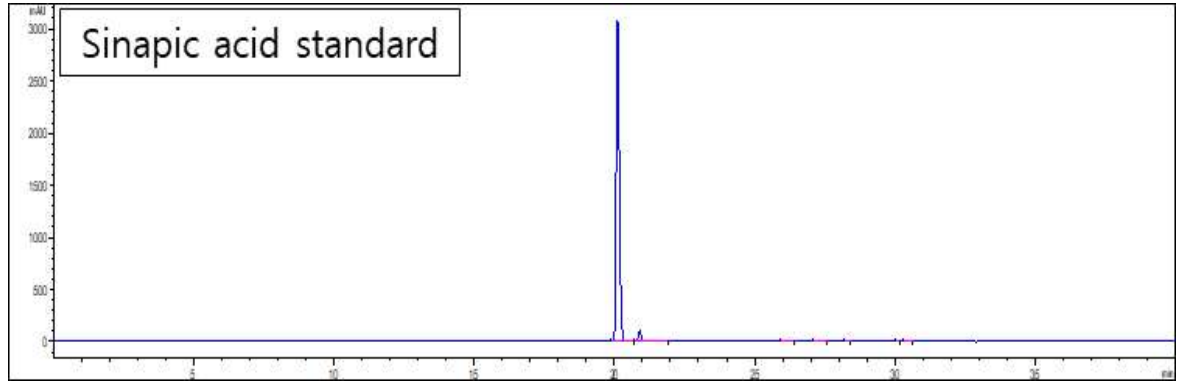
(ㄱ) 보리지추출물 내 Sinapic acid 분석결과



위 HPLC 분석결과와 같이 보리지추출물과 Sinapic acid표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 보리지추출물에 Sinapic acid가 존재하지 않는 것으로 판단.

(ㄴ) 일년봉추출물 내 Sinapic acid 분석결과





위 HPLC 분석결과와 같이 일년봉추출물과 Sinapic acid 표준품 분석 그래프를 비교한 결과 RT가 일치하지 않아 일년봉추출물에 Sinapic acid가 존재하지 않는 것으로 판단. 결론적으로 보리지추출물, 일년봉추출물에서 Sinapic acid가 불검출 되었으므로 지표성분으로 타당하지 않음.

#### 9) 연구개발 성과

##### - 특허출원

특허명: 비만 치료 및 개선용 조성물 (출원번호: 10-2017-0164232, 대한민국)

특허출원일: 2017.12.01. (출원인: 주식회사 엔에스웰니스)

##### - 제품화 (보리지 및 일년봉 추출물을 활용한 다이어트 용 일반식품 제품화)



보리지 및 일년봉 열수 추출물을 활용하여 다이어트용 일반식품을 제품화함.

본제품은 우유 및 물을 섞어 식사 대용으로 섭취할 수 있는 제품으로서 오리지널, 다이어트, 비타민과 단백질 그리고 뷰티 네 가지 제품으로 출시하였음. 현재 일본 등 해외와 국내 제품으로 판매 계획 중. 현재 일본에 제품 출시를 협의 중에 있음.

일반식품 식품위생법(제 10조와 11조의 )의 관련규정에 맞게 표시하기 위하여 식품의 영양표시에 대한 필요한 기준만을 제시할 수 있도록 하였음. 따라서 추후 개별인정을 통한

건강기능식품 소재로서 인증을 받기 전까지는 보리지 및 일년봉은 단순 원재료로서 최종 제품 내에 함유하고 표시하였음. 단, 단순 영양 강조표시는 가능함에 따라서 보리지 함유, 일년봉 함유를 반드시 표시하고 주표시면 (용기, 포장의 표시면 중 상표, 로고 등이 인쇄되어 있어 소비자가 식품 또는 식품첨가물을 구매할 때 통상적으로 소비자에게 보여지는 면)에 복합원료로서 보리지와 일년봉의 그림을 넣어 다른 식품과 구별하고 특징있게 하는데 사용하고자 함.

## 10) 사업화성과 및 매출실적

### - 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	10억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	10억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 10% 국외 : 10%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 15% 국외 : 15%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			0위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			30위

### - 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세 부 항 목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1년			
	소요예산(백만원)	80			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지			
		없음	10	20	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	없음	10	20
		국외	없음	5	8
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	건강기능식품 및 다양한 일반식품으로 확대할 예정임.			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	없음	5	10	
	수 출	없음	5	10	

## 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

### 가. 목표달성도

#### ○ 주요 성과목표 달성도

- 기전연구를 통한 체지방 감소 기전(지방산 산화 촉진 및 지방세포 분화 억제 등) 연구 결과 확보
- 보리지 외 1종의 추출물을 활용한 체지방감소 소재의 효능 평가 결과물 제시
- 기능성 승인을 위한 전임상 안전성 평가 자료 확보
- 산업화를 위한 필수 요건인 지적재산권 자료 확보 및 특허출원

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
보리지 외 1종의 추출물에 의한 지방세포 생성 억제 또는 지방 분해 효능 평가	5	100	보리지외 1종 소재(일년봉)의 지방세포 생성 억제 또는 지방 분해 효능 평가를 완료함.
보리지 외 1종의 추출물에 의한 고지방식이 비만실험동물의 지방축적 억제 및 체지방감소 효능 평가	40	100	보리지외 1종 소재(일년봉)의 고지방식이 비만실험동물의 지방축적 억제 및 체지방감소 효능 평가를 완료하여 항비만 효과를 입증함.
보리지 외 1종의 에 의한 유전자 수준, 분자생물학적 체지방감소 작용기전 연구	5	100	보리지외 1종 소재(일년봉)의 유전자 수준, 분자생물학적 체지방감소 작용기전 연구를 완료함.
고지방식 비만동물모델을 활용한 보리지 외 1종의 추출물의 체지방감소 작용기전 규명	30	100	보리지외 1종 소재(일년봉)의 작용기전 연구를 통해 지방세포 분화에 관여하는 전사 인자들을 억제하며 지방산 $\beta$ 산화를 증가시킨다는 기전을 밝힘.
보리지 외 1종의 추출물에 대한 안전성 확인	10	100	보리지외 1종 소재(일년봉) 추출물을 농도별로 단회/다회 독성실험 결과, 사망동물이 없고, 장기의 병리적 소견에 이상이 없는 것을 확인하여 두 소재 모두 안전성을 입증함.
보리지 외 1종의 추출물의 본 인체적용시험을 위한 실험 설계	5	100	보리지 외 1종(일년봉) 추출물의 인체시험에 대한 지표를 분석함.
인체적용시험을 위한 IRB 승인	5	0	연구비 및 연구기간의 제약, 인체시험 적용규정의 까다로운 여건으로 인해 예비인체적용시험을 진행하지 못하였음. IRB 승인을 위해서는 별도의 준비가 필요함.
합계	100		



성과지표명	성과목표	실적	비중(%)	달성도(%)
지식재산권	특허 출원 1건	특허출원 1건 완료	60	100
학술성과	학술발표 2건	학술발표 2건 완료	20	100
사업화	제반 기술 개발을 통한 제품화	제품화 1건 완료	20	100

#### 나. 관련분야 기여도

- 우리나라 천연물을 대상으로 분자생물학적 기법 및 생화학적 기법을 이용하여 실험을 수행하며 국제적 수준의 기술축적을 유발하여 농업과 국가발전에 전문 인력 양성에 기여함.
- 천연소재의 *in vivo* 안전성 평가 자료는 국내외 기능성/효능의 인허가의 기초 자료로서 적극 활용될 수 있음.
- 국내 재배 기능성 소재를 기반으로 한 성능개선 항비만 소재는 농작물의 재배 생산관리에 있어서도 HACCP기준을 상회하는 엄격한 생산관리 시스템을 도입하여 직간접적으로 국내 농업의 발전에 기여함.
- 본 연구 과제를 통해 기성 제품대비 항비만 효과가 우수한 소재가 도출되었으므로 인체 적용시험을 거쳐 소재개발이 완성되면 내수 연간 30억 원 이상, 수출효과 20억 원 이상이 예상되며, 국가사회가 비만으로 인해 지불되는 연간 직간접비용 절감에도 크게 기여할 것임. 또한 수입대체 효과에 있어서도 약 15억 원 이상으로 판단되어 전체적으로 연간 950억 원 이상의 경제적 가치 창출에 기여할 것으로 판단됨.

## 5. 연구결과의 활용계획

- 본 과제를 통한 성능 개선 천연소재 복합물과 전임상 효능 평가 자료는 국내외 지적재산권의 형성과 국내외 효능의 인허가 자료로서 적극 활용
  - 비만관련 건강기능식품은 국내외로 최대의 수요를 가짐.
  - 체지방감소에 대한 엄격한 기준으로 국내외 전문 기관으로부터 인허가 진행.
  - 연구개발 초기에는 사전에 확보된 소재를 기반으로 성능개선 소재를 탐색하고 최우수 복합소재를 선정하여 건강기능식품이나 Diet Supplyment로 활용
  - 최대효능을 나타내는 복합 효능소재를 확정하여 지적재산권 및 기능성 인증
  
- 본 과제의 수행을 기반으로 식약처 건강기능식품 개별인정 진행함과 동시에 새로운 글로벌 시장으로 떠오르고 있는 할랄 시장 진입을 위한 할랄인증을 획득하고 중동시장에 진출. 인도 말레이시아 중동 등의 할랄시장은 세계인구의 30% 이상을 차지할 뿐 아니라, 종교적 문제와는 전혀 다르게 엄격한 품질관리의 덕분으로 미주와 유럽의 수출 통로가 되고 있음. 우리나라 우수상품의 국제화를 위해 할랄시장의 진출 사례는 매우 중요함. 하지만 기존의 제품들과 원료 등은 이미 다른 나라에서 장악하고 있기 때문에 천연물을 기반으로 새롭게 기능성 규명된 우리나라 소재로 지적재산권을 확보하여 시장 진입에 활용함.
  
- 국내산 천연물 건강기능식품 세계화를 위한 대학-병원-기업 network 구축하고 다학제간 연구팀 구성으로 국내의 앞선 BT 연구 역량을 건강기능식품 개발에 활용하여 시너지 효과 창출과 이를 통해 해외 시장 진출의 기반 구축에 활용함.
  
- 본 연구결과를 바탕으로 사업화를 위해서는 식품의약품안전처의 건강기능식품 개별인정을 획득해야 함. 이를 위해서는 다음과 같은 구체적이고 체계적인 향후 연구 계획이 필요함.
  - 1) 식품의약품안전처의 개별인정형 담당자와 사전 상담 (지표성분 및 기능 지표 검토)
  - 2) 기준규격보고서 (식약처 인정기관) 의뢰
  - 3) 보리지 및 일년봉의 원물 분류 규정 보고서 작성
  - 4) 보리지 및 일년봉의 섭취 근거 및 안전성 자료 정리
  - 5) 서울대학교 내과교실과 IRB 신청 및 인체적용시험 수행 (2018년 연구 수행)
  - 6) 보리지 및 일년봉의 체지방 감소 효능 기전 규명을 위한 전임상 추가 연구 (논문 게재)
  - 7) 2019년 초 서류 수합을 통해서 식품의약품안전처 개별인정형 신청

위와 같은 승인 진행 계획을 통해서 본 연구 소재의 개별인정을 승인받아 산업적 가치를 창출할 계획임.

- 본 과제를 통해서 산업적 가치를 창출하기 위해서는 대량 생산을 위한 원료 수급이 매우 중요하므로 일년봉을 대량으로 재배하고 수급할 수 있는 재배단지 구축이 매우 중요할 것으로 예상됨. 다만 일년봉은 노지에서도 매우 재배가 쉽고 잘 자라는 특징을 가지고 있기 때문에 충청북도 음성의 약초연구회 회원으로 구성된 3개 농가와 1차 재배 계약을 진행하고 추후 개별인정 등의 과정을 거치면서 대단위 재배단지화 계획을 수립함. 보리지의 경우 국내 재배 조건이 아직 확립되지 않은 상황이므로 농진청 등과 협조하여 연구 개발된 방법으로 국내 재배 여건을 확립해야함.
- 지금까지의 항비만 효능으로 보아 건강기능식품 원료로서 개별인증을 받을 만한 가치가 충분히 있으며, 대단위 재배단지가 설립되어 현재보다 원료의 단가가 낮아진다면 경제적 가치 또한 높다고 판단되므로 식약처로부터 본 연구 소재의 개별인정을 승인받아 체지방감소에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 원료로서 적극 활용할 계획임.

○ 사업화 추진계획

구분		( 2018 년 ) 개발 종료 후 1년	( 2019 년 ) 개발 종료 후 2년	( 2020 년 ) 개발 종료 후 3년
국 내	시장점유율(%)	0.01	1	2
	판매량(단위: ea )	200	9800	20000
	판매단가(원)	50000	50000	50000
	국내매출액(백만원)	10	490	1000
해 외	시장점유율(%)	-	-	0.001
	판매량(단위: ea )	-	-	10936
	판매단가(\$)	-	-	40
	해외매출액(만\$)	-	-	43

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인해 체내 지방이 과잉 축적되어 있어 여러 건강상의 문제들을 야기할 수 있는 상태를 말함. 그 원인은 과도한 영양섭취, 신체활동 부족 등 생활방식으로 인한 경우가 대부분이며, 드물게는 약물 복용이나 질환에 의해 2차적으로 발생하는데 이과정은 지방세포의 증식과 증대로 나뉨. 세계보건기구(WHO)는 과체중과 비만을 제5대 위협으로 매년 280만 명이 이에 의해 사망한다고 함. 2015년 국민 건강영양조사에 따르면, 지난 10년간 우리나라 사람들의 지방 섭취량은 5.9g 증가하여 비만 유병률은 2005년 대비 1.9% 증가한 것으로 조사됨. 특히, 남자 비만 유병률은 39.7%까지 크게 증가하였으며 고콜레스테롤혈증 유병률이 17.9%로 9.9% 증가함. 비만은 심혈관계 질환, 제2형 당뇨병과 여러 종류의 암 등 만성 질환을 일으킬 수 있어, 현대인들의 생활수준이 향상되면서 비만이 전 세계적인 사회 문제가 되고 있음.
- 비만을 개선하기 위해 이미 개발된 여러 가지 약물은 부작용이 많아 비만을 예방 또는 치료하기 위해 부작용이 적은 안전한 약물 개발의 필요성이 제기되고 있음. 따라서 국내외에서 항비만에 대해 여러 가지 연구를 진행하고 있다. 항비만 연구 모델로는 in vitro 실험의 3T3-L1 지방전구세포(6)와 in vivo 실험의 고지방 식이로 비만 유도된 C57BL/6J mice를 많이 사용하고 있음. 최근에는 Li 등의 은시호(Radix Stellariae) 추출물과 Azzini 등의 안토시아닌과 같은 여러 가지 천연물의 추출물이나 Jin 등의 해양 생물 활성 물질과 같은 연구가 많으며 adipogenesis, lipogenesis와 lipolysis의 통로로 비만을 억제하는 연구가 진행되고 있음.
- 보리지(*Borago officinalis* L.)는 월년초로 원산지는 지중해 연안이며 고대 그리스나 로마 시대부터 즐겨 이용한 허브로 꽃이나 잎을 술에 담갔다가 마시면 모든 슬픔이나 시름을 씻어 주어 기분을 즐겁고 명랑하게 해준다 하여 “쾌활초 (cuphorosium)” 라고 불렀음. 전통의학에서는 보리지를 과민성 위장질환, 호흡기 및 심혈관계 질환에 사용하며 복통, 설사, 천식, 기관지염, 고혈압, 방광염 등을 치료하기 위한 약초로 알려져 있으며, 항균과 항산화 활성을 가지고 있음. 일년봉(*Erigeron annuus* L. Pers)은 북아메리카 원산으로, 우리나라 각처의 밭, 들, 길가에 나는 월년초로 국화 속 식물이며 또한 망풀, 잔꽃풀, 지붕초, 큰망초, 개망초 등으로 이름이 다양함. 일년봉은 소화불량, 학질, 장염, 간염, 이노작용, 혈당 강하 작용과 항산화 작용 등 여러 가지 생리 활성이 알려져 있음.

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항 없음.		

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
-	해당사항 없음	-	-	-	-	-	-	-

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

### ○ 연구실 안전시설 장비

연구실에 배치되어 있는 소화기를 점검하였으며, 화상 및 산과 염에 의한 외상치료를 위한 구급약을 구입하여 배치하였음.

### ○ 연구실 안전 및 정기점검

실험실의 재해예방과 안전성 확보를 위하여 국가기술자격법령에 따라 안전관리분야 기술자격을 취득한 전문가가 안전점검을 실시하여 연구개발 활동에 사용되는 기계, 기구, 전기, 약품 등의 보관상태 및 보호 장비의 관리상태 등을 점검하였음.

### ○ 동물실험 윤리 교육

본 과제에서 사용할 실험동물의 관리자 및 이용할 연구자는 교육훈련을 실시하였음. 동물실험 운영 실태는 지도, 감독 받으며 안전점검을 실시하였으며, 동물연구계획서는 동물실험윤리위원회의 심의를 거친 후 승인을 받았음.

### ○ 교육훈련

실험실에서 발생될 수 있는 재해를 예방하기 위하여 기계, 기구, 전기, 화학, 일반, 위생 등의 분야에 대한 안전 교육을 실시하였음.

### ○ 건강검진

연구실에서 발생한 사고로부터 부상, 질병, 신체장애 등 생명 및 신체상의 손해를 입었을 때를 대비하여 안전공제보험에 가입하였음. 또한 정기적으로 연구 활동 종사자를 위하여 일반 건강검진을 정기적으로 실시함.

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허 출원	비만 치료 및 개선용 조성물 (출원번호: 10-2017-0164232)	주식회사 엔에스웰 니스	발명자	대한민국	-	2017.12.01	단독사사	-

## 11. 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음.	

## 12. 참고문헌

1. Wu, C.H., Yang, M.Y., Chan, K.C., Chung, P.J., Ou, T.T., Wang, C.J., 2010. Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a *Nelumbo nucifera* leaf flavonoid-rich extract in mice. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7075-7081.
2. S. Vandevijvere, C.C. Chow, K.D. Hall, E. Umali, B.A. Swinburn, Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic: a global analysis, *Bull. World Health Organ.* 93 (2015) 446-456.
3. Chandrasekaran, C.V., Vijayalakshmi, M.A., Prakash, K., Bansal, V.S., Meenakshi, J., 2012. Review article: herbal approach for obesity management. *Am. J. Plant Sci.* 3, 1003-1014.
4. Seo, J.B., Park, S.W., Choe, S.S., Jeong, H.W., Park, J.Y., Choi, E.W., Seen, D.S., Jeong, J.Y., Lee, T.G., 2012. Foenumoside B from *Lysimachia foenum-graecum* inhibits adipocyte differentiation and obesity induced by high-fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 800-806.
5. Apovian CM, Aronne LJ, Bessesen DH, McDonnell ME, Murad MH, Pagotto U, Ryan DH, Still CD. 2015. Pharmacological management of obesity: an endocrine Society clinical practice guideline. *Clinical Endocrinology and Metabolism* 100(2):342362.
6. Tsai, Y.C., Yang, B.C., Peng, W.H., Lee, Y.M., Yen, M.H., 2017. Heme oxygenase-1 medi

ates anti-adipogenesis effect of raspberry ketone in 3T3-L1 cells. *Phytomedicine* 31 (2017) 11-17.

7. Cotten, B.M., Diamond, S.A., Banh, T., Hsiao, Y.H., Cole, R.M., Li, J.H., Simons, C.T., Bruno, R.S., Belury, M.A., Vodovotz, Y., 2017. Raspberry ketone fails to reduce adiposity beyond decreasing food intake in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Food Funct.*, 2017, 8, 1512.

8. Li Y., Liu X., Fan Y., Yang B., Huang C.. 2017. Radix *Stellariae* extract prevents high-fat-diet-induced obesity in C57BL/6 mice by accelerating energy metabolism. *PeerJ* 5:e3305.

9. Azzini, E., Giacometti, J., Russo, G.L., 2017. Antiobesity Effects of Anthocyanins in Preclinical and Clinical Studies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2017, Article ID 2740364, 11 pages.

10. Jin, Q., Yu, H.H., Li, P.C., 2017. The Evaluation and Utilization of Marine-derived Bioactive Compounds with Anti-obesity Effect. *Current Medicinal Chemistry*. DOI 10.2174/0929867324666170602082620.

11. Wang, Z.Q., Kim, J.H., Jang, Y.S., Kim, C.H., Lee, J.Y., 2017. Anti-obesity effect of *Solidago virgaurea* var. *gigantea* extract through regulation of adipogenesis and lipogenesis pathways in high-fat diet-induced obese mice (C57BL/6N). *Food & Nutrition Research*, 61:1, 1 273479.

12. Lahrita, L., Hirosawa, R., Kato, E., Kawabata, J., 2017. *Eurycoma longifolia* Jack and Its Quassinoids Stimulate Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes. *Phytopharmacology & Extract Pharmacology I*. 2017; 4(S 01): S1-S202.

13. Song JT. 1984. *Korea Plant Resources*. Mido Publishing, Seoul.p. 1048

14. Song Ji. 1982. *Herbal Medicine Dictionary (Chinese pharmaceutical War)*. Tongdomunwhasa. Seoul. p. 88

15. Yoo NH, Jang DS, Yoo JL, Lee YM, Cho JH, Kim JS. 2008. Erigeron flavanone, a flavanone derivative from the flowers of *Erigeron annuus* with protein glycation and aldose reductase inhibitory activity. *J Nat Prod* 71:713-715

16. Kim, Y.H., Choi, K.S., Effect of the *Erigeron annuus* In Vitro Antioxidant Properties and Extract on Serum Lipid in Mice. 2015. *Korean J. Food Nutr.* Vol. 28. No. 3, 387~395.

17. Hassan Gilani, A., Bashir, S., & Khan, A. (2007). Pharmacological basis for the use of *Borago officinalis* in gastrointestinal, respiratory and cardiovascular disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 393-399.

18. M. Asadi-Samani, M. Bahmani, M. Rafieian-Kopaei, The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: a review. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7, S22-S28 (2014)

19. Samani, M.A., Bahmani, M., Kopaei, M.R., 2014. The chemical composition, botanical cha

racteristic and biological activities of *Borago officinalis*: a review. *Tropical Medicine*. September 2014, Pages S22–S28.

20. Miceli, A., Aleo, A., Corona, O., Sardina, M.T., Mammina, C., Settanni, L., 2013. Antibacterial activity of *Borago officinalis* and *Brassica juncea* aqueous extracts evaluated in vitro and in situ using different food model systems. *Food Control*. June 2014, Pages 157–164.

21. Samani, M.A., Bahmani, M., Kopaei, M.R., 2014. The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. September 2014, Pages S22–S28.

22. Neyrinck, A.M., Bindels, L.B., Geurts, L., Hul, M.V., Cani, P.D., Delzenne, N.M., 2017. A polyphenolic extract from green tea leaves activates fat browning in high-fat-diet-induced obese mice. *Nutritional Biochemistry*. November 2017, Pages 15–21.

23. Tung, Y.C., Lin, Y.H., Chen, H.J., Chou, S.C., Cheng, A.C., Kalyanam, N., Ho, C.T., Pan, M.H., 2016. Piceatannol Exerts Anti-Obesity Effects in C57BL/6 Mice through Modulating Adipogenic Proteins and Gut Microbiota. *Molecules* 2016, 21(11), 1419.

24. Park, B.G., Park, Y.S., Park, J.W., Shin, E.J., Shin, W.S., 2016. Anti-obesity potential of enzymatic fragments of hyaluronan on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 22 April 2016, Pages 290–295.

25. Pan, M.H., Yang, G.L., Li, S.M., Li, M.Y., Tsai, M.L., Wu, J.C., Badmaev, V., Ho, C.T., Lai, C.S., 2017. Combination of citrus polymethoxyflavones, green tea polyphenols, and Lycium extract suppresses obesity and hepatic steatosis in high-fat diet induced obese mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 11, 2017, 1601104.

26. Yook, J.S., Kim, K.A., Park, J.E., Lee, S.H., Cha, Y.S., 2015. Microalgal Oil Supplementat ion Has an Anti-Obesity Effect in C57BL/6J Mice Fed a High Fat Diet. 2015 Dec; 20(4): 230–237.

27. Park, S.J., Jeon, Y.J., Kim, H.J., Han, J.S., 2013. Anti-obesity Effects of *Ishige okamurae* Extract in C57BL/6J mice Fed High-fat Diet. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* Vol. 45, No. 2, pp. 199–205.

28. Sung, J.H., Yang, J.W., Kim, Y.H., Kim, M.H., Jeong, H.S., Lee, J.S., 2016. Effect of defatted pepper (*Capsicum annum* L.) seed extracts on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Food Sci. Biotechnol.* 25(5): 1457–1461.

29. Kersten, S. Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *Eur. J. Pharmacol.* 2002, 440, 223–34.

30. Darlington, G.J.; Ross, S.E.; MacDougald, O.A. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 30057–0060.

31. Student, A.K.; Hsu, R.Y.; Lane, M.D. Induction of fatty acid synthetase synthesis in diff



- erentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 4745-750.
32. Vu, D.; Ong, J.M.; Clemens, T.L.; Kern, P.A. 1,25-Dihydroxyvitamin D induces lipoprotein lipase expression in 3T3-L1 cells in association with adipocyte differentiation. *Endocrinology* 1996, 137, 1540-544.
33. Tanaka, T.; Yoshida, N.; Kishimoto, T.; Akira, S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene. *EMBO J.* 1997, 16, 7432-7443.
34. Kim, J.B.; Spiegelman, B.M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 1996, 10, 1096-107.
35. Lee, M.S.; Kim, C.T.; Kim, Y. Green tea ()-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Ann. Nutr. Metab.* 2009, 54, 151-157.