코끼리마늘의 3T3-L1 지방세포 분화억제 효과

이슬기¹, 한동엽¹, 김수린^{1,2}, 이원영¹, 남주옥^{1,2*}

¹경북대학교 식품공학부

²경북대학교 농업과학기술연구소

Received: November 25, 2019 / Revised: April 23, 2020 / Accepted: April 27, 2020

Elephant Garlic Extracts Inhibit Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes

Seul Gi Lee¹, Dongyup Hahn¹, Soo Rin Kim^{1,2}, Won Young Lee¹, and Ju-Ock Nam^{1,2*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, ²Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

Elephant garlic (*Allium ampeloprasum* L.) has been reported to have several pharmacological effects. However, its anti-adipogenic effect and the possible molecular mechanisms have not yet been reported. In this study, we demonstrate that elephant garlic extracts suppress adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. Raw and steamed elephant garlic extracts (REG and SEG, respectively) suppressed the differentiation of adipocytes and cellular lipid accumulation. Of note, the anti-differentiation effect of REG treatment on 3T3-L1 cells resulted in cytotoxicity, whereas SEG-treated cells displayed no such cytotoxicity. Additionally, SEG treatment significantly reduced the adipogenesis-related gene expression of PPAR γ , C/EBP α , adiponectin, Ap2, and LPL. To our knowledge, these results are the first evidence of the anti-adipogenic effects of elephant garlic extracts on 3T3-L1 adipocytes.

Keywords: 3T3-L1 adipocytes, *Allium ampeloprasum* L, anti-adipogenic, elephant garlic, steamed elephant garlic

서 론

우리나라 식생활에 있어 필수불가결한 식재료인 마늘은 전통적으로 향신료뿐만 아니라 항암, 항산화 및 항균 등 다양한 약리효과를 갖는 민간치료제로도 사용되어 왔다[1]. 또한 마늘의 주요 유효성분인 allicin은 혈압강화, 혈중 지질 저하 및 혈당 감소효과 등 다양한 생리적 효능을 갖는다고 알려져 있다[2, 3]. 그러나, 생마늘의 경우 특유의 냄새와 향으로 인해 생리활성 효과를 나타내기 충분한 양을 지속적으로 섭취하기 어려울 뿐만 아니라 과량 섭취 시 위벽을 자극, 조직 손상을 야기할 수 있어 있다[4, 5]. 반면, 마늘을 가열 숙성한 흑마늘의 경우, 마늘 특유의 매운 맛과 향은 감소하고 단맛이 증가될 뿐만 아니라 제조과정 중 화학적 변환이 일어나면서 S-allylcysteine와 같은 특정 생리활성 물질이 증가한다고 보고된 바 있다[6]. 이러한 생리활성 물질들의 함량 차

이로 인해 흑마늘은 일반마늘에 비해 항산화, 동맥경화 및 체내 지질 개선효과가 우수한 것으로 알려져 있다[2].

코끼리마늘(*Allium ampeloprasum* L.)은 일반 마늘(*Allium sativum* L.)에 비해 냄새가 적고 인편이 약 10배 가량 큰 부추속에 속하는 식물이다[7]. 코끼리마늘은 일반마늘에 비해 조직감과 단맛이 뛰어나 보다 다양한 종류의 식품소재로 이용하기에 적합할 뿐만 아니라 최근에는 항산화, 항당뇨, 및 항균 효과와 같은 약리효과가 보고되고 있어 이의 활용가치에 대한 방향성이 제시되고 있는 상황이다[8–10]. 또한, 이전의 한 연구는 코끼리마늘 내 유효성분 분석을 통해 일반 마늘에 비해 발효된 코끼리흑마늘에서 총 피루브산의 함량이 큰 폭으로 증가함을 밝힌 바 있으며 코끼리마늘은 항비만 활성이 있는 scopoletin을 포함하고 있다고 알려진 바 있다[4, 11]. 그러나, 아직까지 대부분의 국내 연구는 코끼리마늘의 생육에 관한 연구로 한정되어 있으며 코끼리마늘 및 코끼리 흑마늘과 같은 다양한 조리형태의 코끼리마늘의 생리활성효과에 대한 연구는 현저히 부족한 실정이다.

만성적인 잉여 에너지는 지방세포의 과도한 증식 및 분화를 야기함으로써 궁극적으로는 세포 내 지질축적하여 비만

*Corresponding author

Tel: +82-53-950-7760, Fax: +82-53-950-7762

E-mail: namjo@knu.ac.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

을 유발할 수 있다[12]. 이러한 지방세포의 분화과정은 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) CCATT/enhancer binding protein α (C/EBP α) 등의 전사 인자에 의해 주로 조절된다[13].

본 연구에서는 코끼리마늘을 생마늘, 흑마늘, 흑마늘 열수 추출 세가지 방식으로 조리 이후 다양한 용매를 이용하여 추출한 코끼리 마늘 추출물들이 3T3-L1 지방전구세포의 분화 및 관련 조절 인자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

용매별 시료의 제조

본 연구에서는 경상북도 군위군에서 재배 및 수확된 코끼리마늘을 군위기술센터로부터 지원받아 생코끼리마늘(Raw Elephant Garlic, REG), 흑코끼리마늘(Steam Elephant Garlic, SEG) 및 흑코끼리마늘 열수추출물(Steam Elephant Garlic Extract, SEGE)과 같은 세가지 종류의 코끼리마늘 추출물을 제조하였다. 생코끼리마늘(REG)의 경우 껍질을 제거하고 세척, 건조 및 갈아 균질화하였다. 흑코끼리마늘(SEG) 및 흑코끼리마늘 열수추출물(SEGE)의 경우 찹기를 이용하여 2L의 증류수와 함께 가열 후 12시간 숙성하였다. 숙성된 흑코끼리마늘은 증류수 없이 흑은 증류수와 함께 1:1 비율로 갈아 균질화 하였으며 본 연구에서는 이를 각각 흑코끼리마늘, 흑코끼리마늘 열수추출물이라고 명명하였다. 균질화된 각 코끼리마늘은 70% hexane, 70% ethyl alcohol, 및 butanol에 1:1 비율로 혼합 후 진탕배양기를 이용하여 30시간 동안 200 rpm에서 용해하였다. 용해된 추출물은 회전식 진공농축기를 이용하여 완전 건조 후 DMSO를 이용하여 일정한 농도로 희석, membrane filter (0.22- μ m pore size)로 제균 후 항암 및 항비만 효과 분석을 위한 실험 시료로 사용하였다

세포배양

3T3-L1 지방전구세포는 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받은 후, 10% Newborn Calf Serum, 1% antibiotics를 포함하는 DMEM 배지에 5% CO₂가 공급되는 37°C incubator에서 배양하였다.

세포 생존율 측정

3T3-L1 지방전구세포를 96-well plates에 각 well 당 4×10^3 으로 분주하여 5% CO₂가 공급되는 incubator 에서 하룻동안 배양하였다. 다음날, REG, SEG, SEGE를 0, 2, 4, 8 mg/ml의 농도로 48시간 동안 처리하였으며, 실험 대조군에는 동량의 DMSO를 추가하였다. 처리 시간 종료 후, 각 배지를 제거하고 0.4 mg/ml의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-

2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 를 각 well에 추가하여 incubator에서 3시간 배양한 뒤 iso-propyl alcohol을 이용하여 생성된 formazan을 용해 시킨 뒤, infinite reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정했다. 측정값은 3번은 반복하여 평균값으로 얻었다.

지방세포 분화 유도

지방세포 분화는 이전의 연구에서 서술된 바와 동일하게 방법을 이용하여 진행하였다[13]. 간략히, 3T3-L1 지방전구세포(preadipocytes)를 성숙한 지방세포(mature adipocytes)로 분화 유도하기 위해서, 6-well plate에 분주 뒤, 세포가 100% confluent가 되었을 때 MDI solution (0.5 mM IBMX, 0.25 μ M DEX, 167 nM insulin, and 100 μ M indomethacin) 이 포함된 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지로 교체 해주었다. 분화유도 2를 뒤, 167 nM insulin의 insulin이 포함된 배지로 교체해 주었다. 배양 중인 세포의 배지는 2일 간격으로 새로운 insulin이 포함된 배지로 교체해주었다. 코끼리마늘의 지방세포 분화억제 효과를 관찰하기 위하여, 분화기간 동안(총 8일) REG, SEG 또는 SEGE를 2, 4 mg/ml의 농도로 처리하였다.

세포 내 지질 염색(Oil Red O staining, ORO)

분화가 완료된 성숙한 3T3-L1 지방세포의 세포 내 lipid droplet을 확인하기 위해, ORO 염색을 수행하였다. 분화가 완료된 3T3-L1 세포를 0.6% Glutaraldehyde로 상온에서 1시간 동안 고정, 60% isopropyl alcohol로 세척한 후 0.4% ORO solution으로 상온에서 20분간 염색하였다. 염색된 세포를 촬영하고 100% isopropyl alcohol로 ORO solution을 용해하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 정량화 하였다.

세포 내 mRNA 발현 수준 측정

세포 내 total RNA를 RNAiso Plus reagent (TaKaRa Bio, Japan)를 이용하여 분리한 이후, complimentary DNA (cDNA) 합성은 Prime-Script RT reagent Kit (TaKaRa Bio)를 이용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 수행하였다. Real-time PCR은 SYBR Green (TOYOBO, Japan)과 함께 Cycler iQTM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA) 기기를 이용하여 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 30초(denaturation), 60°C에서 30초(annealing), 72°C 에서 45초(extension)로 35번으로 설정하였다. Primer 서열은 Table 1에 도시된 바와 같다.

세포 내 단백질 발현 수준 측정

세포를 lysis buffer (Biosesang, Korea)에 용해한 뒤 4°C 에서 30분간 방치한 후 세포 용액을 12,000 rpm에서 15분

Table 1. Sequences and accession numbers for primers used in RT-PCR.

Gene name	Accession no.	Forward primer	Reverse primer
Adiponectin	NM_009605.4	GATGGCACTCCTGGAGAGAA	TCTCCAGGCTCTCCTTTCCT
Ap2	NM_024406	AACACCGAGATTTCCTTCAA	TCACGCCTTTCATAACACAT
C/EBP α	NM_001287523	CAAGAACAGCAACGAGTACCG	TCACTGGTCAACTCCAGCAC
LPL	NM_008509	CTGGTGGGAAATGATGTGG	TGGACGTTGTCTAGGGGGTA
PPAR γ	AB644275	GGAAGACCACTCGATTCTT	GTAATCAGCAACCATTGGGTCA
β -actin	EF095208	AGGCTGTGCTGTCCCTGTAT	ACCCAAGAAGGAAGGCTGGA

간 원심 분리하였다. 동량의 단백질(30 μ g)을 10% SDS polyacrylamide gel에 의해 분리시켰다. gel내의 단백질을 Nitrocellulose Membrane (Amersham Protran Premium 0.2 μ m NC, GE Healthcare Life Sciences, Germany)에 전달시킨 뒤 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하였다. 그 후, 1차 항체를 4°C에서 overnight 처리하였고 2차 항체는 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후, enhanced chemiluminescence reagent (GEHealthcare, UK)를 membrane

에 도포하고 FUSION Solo apparatus (Vilber Lourmat)를 이용하여 검출하였다.

통계처리

3회 반복한 실험결과는 평균 및 표준편차를 표시하였으며, 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 SPSS 통계프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석을 실시, 유의성 여부를 판정하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Fig. 1. Effects of REG, SEG, and SEGE on the lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes. (A) The effect of REG, SEG, and SEGE on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Lipid droplets were stained by Oil Red O solution and photographed at 100 $\times$ magnification. (lower right insets were photographed with a microscope at 400 $\times$ magnification). The negative control (NC) are preadipocytes and the positive control (CON) are fully differentiated adipocytes. (B) The absorbance of stained cells measured at 495 nm.

결과 및 고찰

REG, SEG 및 SEGE가 3T3-L1 지방전구세포 분화에 미치는 영향

지방방울(Lipid droplet)은 지방전구세포가 성숙한 지방세포로 분화하는 분화과정(adipogenesis)의 가장 큰 특징 중 하나이며 지방방울은 주로 중성지방인 triglyceride (TG)로 구성되어 있다[14]. TG는 포도당과 같은 중요한 에너지원이지만 과다섭취 할 경우 지방세포에 흡수되어 저장되고 이는 비만의 원인으로 작용한다. 따라서, 본 연구에서는 REG, SEG 및 SEGE가 3T3-L1 지방전구세포가 분화하는 동안 세포 내 축적되는 지방방울의 축적에 영향을 미치는지 조사하였다.

처음으로, 코끼리마늘을 세 가지 다양한 용매(hexane, 70% ethyl alcohol, 및 butanol)에서 추출한 각 코끼리마늘 추출물들을 모두 동일한 농도로 3T3-L1 세포에 처리하였다. 그 결과, 세 가지 추출물에서 전반적으로 Butanol 분획층에서 가장 우수한 지방세포분화 억제효과를 보였다(data not shown). 이에 따라, 하위 연구에서는 Butanol 분획층을 단독으로 사용하였다.

다음으로, Butanol층에서 추출한 REG, SEG 및 SEGE를 세포가 분화하는 기간 내내 2, 4 mg/ml로 처리하고 ORO 염색을 수행하였다. 실험 결과, REG, SEG, SEGE는 모두 지방세포의 지질축적을 농도의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(Figs. 1A, B). 세포 내 ORO가 염색된 지방구를 정량분석한 결과, 대조군(control, CON)과 비교하여 4 mg/ml 농도의 REG, SEG 및 SEGE 처리는 각각 57.3%, 64.8%, 91.0% 지방세포 분화를 억제하였다(Fig. 1B). 그러나, ORO가 염색되지 않은 미분화 세포의 모양을 확인했을 때 REG를 처리

한 세포의 경우 세포모양이 변형되면서 세포손상이 야기된 것을 확인할 수 있었다. 그러므로, REG의 지방방울 축적억제효과는 지방세포 분화과정의 억제를 통해서가 아닌 외부 자극에 의한 세포사멸을 유도함으로써 발생된 현상이라고 추측된다. 반면 SEG는 세포손상을 야기하지 않으면서 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 보여지며, SEGE의 경우 SEG에 비해 지방세포 분화 억제능이 현저히 낮은 것으로 평가된다.

상기의 결과를 바탕으로 우리는 다양한 방식으로 조리 및 다양한 용매에서 추출한 코끼리마늘 추출물 중 부탄올 분획층의 REG와 SEG가 가장 우수한 지방세포 분화억제능을 갖는다는 것을 확인하였으므로, 하위연구에서는 부탄올 분획층의 REG, SEG의 효능에 관해 집중적으로 연구하였다.

REG, SEG 및 SEGE가 3T3-L1 지방전구세포의 생존에 미치는 영향

각 마늘 추출물이 지방전구세포의 생존에 미치는 영향을 규명하기 위해, 우리는 REG 및 SEG를 0-8 mg/ml의 농도로 3T3-L1 지방전구세포에 48시간 동안 처리하였다. 그 결과, 8 mg/ml 농도의 REG 처리는 통계적으로 유의하게 지방세포의 생존을 저해하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 반면에, SEG는 모든 농도의 처리구간에서 지방세포의 생존에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 이러한 결과는, REG가 지방세포의 분화 기간 동안 세포의 생존에 영향을 미침으로써 지방세포의 분화를 감소시킬 수 있다는 가설에 대한 직접적인 증거를 제공하고있다. 또한 지방세포의 분화는 약 8일간 지속되기 때문에 분화 기간 동안 REG 처리의 중첩에 의해 이러한 세포독성 효과는 보다 증폭되었을 것이라고 예상한다.

Fig. 2. Effects of REG and SEG on the viability of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 preadipocytes were treated with REG and SEG at various concentrations for 48 h. The viability of 3T3-L1 was determined by MTT assay. Values are mean $\pm$ S.D. of three experiments, with triplicate of each experiment.

SEG가 지방생성과정에 관여하는 유전자의 mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향

지방세포 분화과정에서 REG 및 SEG가 3T3-L1 지방세포 분화 관련인자들의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 지방형성과정에 관여하는 주요전사조절인자인 PPAR γ , C/EBP α 와 아디포카인(adipokine)인 adiponectin, ap2 (fatty acid-binding proteins) 및 LPL (lipoprotein lipase)의 mRNA 발현 수준을 비교 분석하였다. 대조군과 비교하여 SEG의 처리는 PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Ap2 및 LPL의 발현을 모두 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 3). 한편, REG는 처리에 의한 다양한 지방세포 분화관련인자들의 mRNA 발현 억제율은 동일 농도의 SEG에 비해 낮거나 ap2의 경우 억제하지 못함을 확인하였다.

또한 이러한 SEG 및 REG에 의한 PPAR γ 와 C/EBP α mRNA 발현량 감소는 단백질수준에서도 동일하게 나타났으며 이의 발현 억제를 또한 REG에 비해 SEG에서 현저히 높

Fig. 3. Effect of REG and SEG on the mRNA expression of adipogenesis-related genes in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with SEG or REG during the period of differentiation. After 8 days of differentiation, total RNA was isolated and real time reverse-transcription-polymerase chain-reaction (RT-PCR) confirmed the expression of adipogenic-related genes.

게 나타남을 확인하였다(Figs. 4A, B).

요약하자면, 상기의 연구결과는 흑코끼리마늘이 3T3-L1 지방세포의 분화를 억제함으로써 생체 외 항비만효과를 갖는다는 것을 보여준다. 이는 체중조절기능을 갖는 건강기능식품 원료로써 혹은 더 나아가 의약품의 원료로써의 코끼리마늘의 활용가능성을 간접적으로 제시한다. 또한, 흑코끼리마늘과 동일하게 생코끼리마늘은 지방세포 분화 억제효과를 가졌지만 이는 세포독성효과에 기인한 것으로 판단된다. 이러한 독성효과는 체중조절목적으로 생코끼리마늘을 섭취했을 때, 생체 내 조직손상 및 정상세포파괴 등을 부작용을 동반할 수 있다고 추측할 수 있다. 그러나, 본 연구결과를 바탕으로 코끼리마늘을 산업적으로 활발히 이용하기 위해서는 생체 내 동물실험을 통한 안전성 및 효능 입증과 같은 후속연구가 요구된다. 또한 본 연구에서는 각 마늘의 조리 방식

에 따른 생체 외 항비만 효능 수준의 변화에 관해서는 명확히 제시하고 있으나, 이러한 차이점을 야기하는 추출물 내 유효성분에 관한 연구결과는 제시하고 있지 않다는 점에서 연구의 한계점을 나타내고있다.

요 약

부추 속에 속하는 코끼리마늘(*Allium ampeloprasum* L.)에 대한 몇 가지 약리효과는 보고된 바 있으나, 이의 항비만 및 작용기전에 대한 보고 전무한 실정이다. 이에 따라, 본 연구에서는 코끼리마늘 추출물이 3T3-L1 지방세포의 분화에 미치는 영향을 조사하여 이의 지방세포 분화 억제 효능을 규명하였다. 본 연구에서는 생코끼리마늘(Raw Elephant Garlic, REG) 및 흑코끼리마늘(Steam Elephant Garlic,

Fig. 4. Effects of REG and SEG on protein expression of adipogenic-related genes in 3T3-L1 adipocytes. (A) Cells treated with SEG or REG for the period of differentiation were lysed and total protein was extracted. The protein expression levels of PPAR γ and C/EBP α were analyzed by western blot. An equal amount of loading was confirmed using β -actin. (B) Quantification of the protein expression.

SEG) 추출물이 지방세포의 분화 및 지질축적을 억제한다는 것을 보여주었다. 주목할 만한 점은, REG의 경우 지방세포에 독성을 나타낸 반면, SEG는 독성을 나타내지 않았다는 점이다. 추가적으로, SEG는 PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin, Ap2 및 LPL와 같은 지방세포 분화 관련 유전자의 발현을 통계적으로 유의하게 억제하였다. 본 연구는 두 종류의 코끼리마늘이 3T3-L1 지방세포의 분화를 억제함을 보고한 최초의 연구이다.

Conflict of Interests

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Kwon OC, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, 2006. Physicochemical characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**: 331-336.
2. Kang MJ, Lee SJ, Shin JH, Kang SK, Kim JG, Sung NJ. 2008. Effect of garlic with different processing on lipid metabolism in 1% cholesterol fed rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**: 162-169.
3. Elkayam A, Mirelman D, Peleg E, Wilchek M, Miron T, Rabinkov A, et al. 2003. The effects of allicin on weight in fructose-induced hyperinsulinemic, hyperlipidemic, hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* **16**: 1053-1056.
4. Kim D, Kim KH, Yook HS. 2015. Analysis of active components of giant black garlic. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 1672-1681.
5. Byun PH, Kim WJ, Yoon SK. 2001. Changes of functional properties of garlic extracts during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**: 301-306.
6. Kang JR, Lee SJ, Hwang CR, Kim IS, Sung NJ. 2013. Effect of black garlic and Gaeddongssuk (*Artemisia annua* L.) extracts on the lipid profile and hepatic antioxidant enzyme activities of exercised rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutrition* **42**: 869-876.
7. Youn CK, Kim KH, Ahn KS, Jaeng JH, Park YU, Kwon YH, et al. 2015. Effect of planting density on yield and growth characteristics of elephant garlic. *Korean J. Plant Resour.* **28**: 541-545.
8. Lu X, Ross CF, Powers JR, Aston DE, Rasco BA. 2011. Determination of total phenolic content and antioxidant activity of garlic (*Allium sativum*) and elephant garlic (*Allium ampeloprasum*) by attenuated total reflectance-fourier transformed infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **59**: 5215-5221.
9. Rahimi-Madiseh M, Heidarian E, Kheiri S, Rafieian-Kopaei M. 2017. Effect of hydroalcoholic *Allium ampeloprasum* extract on oxidative stress, diabetes mellitus and dyslipidemia in alloxan-induced diabetic rats. *Biomed. pharmacother.* **86**: 363-367.
10. Hughes BG, Lawson LD. 1991. Antimicrobial effects of *Allium sativum* L. (garlic), *Allium ampeloprasum* L. (elephant garlic), and *Allium cepa* L. (onion), garlic compounds and commercial garlic supplement products. *Phytother. Res.* **5**: 154-158.
11. Ham JR, Lee H-I, Choi R-Y, Sim M-O, Choi M-S, Kwon E-Y, et al. 2016. Anti-obesity and anti-hepatosteatosis effects of dietary scopoletin in high-fat diet fed mice. *J. Funct. Foods.* **25**: 433-446.
12. Lee SG, Kim JS, Min K, Kwon TK, Nam JO. 2018. Hispidulin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through PPAR γ pathway. *Chem. Biol. Interact.* **293**: 89-93.
13. Lee SG, Kwon TK, Nam J-O. 2017. Silibinin inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **45**: 27-34.
14. Lee JA, Ahn E-K, Hong SS, Oh JS. 2012. Anti-obesity effect of ethyl acetate extracts from *Agrimonia pilosa* Ledeb. in 3T3-L1 preadipocytes (62.3). *J. Immunol.* **188**: 62.63-62.63.