성숙한 3T3-L1 지방세포에서 *Akkermansia muciniphila*의 지방축적 감소 효과

심혜윤 · 임수경 · 신주현¹ · 이도경¹ · 서재구¹ · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실, ¹(주)엔테로바이옴

Effect of Reduction in the Adipose Accumulation of *Akkermansia muciniphila* in Mature 3T3-L1 Adipocytes

Hyeyoon Shim, Sookyoung Lim, Joo-Hyun Shin¹, Dokyung Lee¹, Jae-Gu Seo¹, Hojun Kim

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University, ¹R&D Center, Enterobiome Inc.

Received: October 31, 2019
Revised: December 2, 2019
Accepted: December 5, 2019

Correspondence to: Hojun Kim
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Dongguk University Ilsan Oriental Hospital, 27 Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang 10326, Korea
Tel: +82-31-961-9111
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2019 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: The aim of this study was to observe the reduction of lipid accumulation by treatment with *Akkermansia muciniphila* extract on 3T3-L1 adipocytes.

Methods: After treating pasteurized *Akk. muciniphila* strains in HT-29 colorectal cancer cell, the relative expression of interleukin (IL)-8, tumor necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 β mRNA was analyzed by real time polymerase chain reaction, respectively. 27 strains of *Akk. muciniphila* which have anti-inflammatory effects were selected. 3T3-L1 pre-adipocytes were treated with *Akk. muciniphila* for 24 hr and then measured the toxicity using water soluble tetrazolium salt assay. The cells were incubated for 4 days and then differentiated into adipocytes using the medium including adipogenic reagents for 10 days. The *Akk. muciniphila* was treated when the medium was exchanged for differentiation medium at 4th day and insulin medium at 6th day. To observe the lipid accumulation, the cells were stained with Oil red O dye and were measured using a spectrophotometer.

Results: In the cytotoxicity test, the cell viability of 3T3-L1 pre-adipocytes was significantly increased compared to the control group which untreated with *Akk. muciniphila*, and there was no cytotoxicity of *Akk. muciniphila* at 1×10^7 CFU/mL. The results on Oil red O staining and absorbance measurements were showed a significant decrease in lipid accumulation in the group which was treated with *Akk. muciniphila* compared to the control group.

Conclusions: In our results, *Akk. muciniphila* has the inhibitory effect of lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. This suggests that *Akk. muciniphila* could be help to improve obesity.

Key Words: *Akkermansia muciniphila*, Adipocytes, Microbiota, Obesity

서론

비만, 대사증후군, 제2형 당뇨병 및 비알코올성 지방간 등을 포함한 인체의 대사 장애가 장내 미생물의 불균형 (dysbiosis)으로 인해 발생될 것이라는 연구 결과가 최근 늘어나고 있다¹⁾. 영양 섭취 불균형, 좌식 생활, 유전적 결함, 사회 경제적인 요인 등이 비만의 원인으로 주로 언급

되어 왔지만 여러 연구를 통해 비만 및 여러 대사질환의 발병이 장내 미생물의 심각한 변화와 관련이 있다는 것이 밝혀졌으며²⁾, 비만 쥐에서 bacteroidetes가 현저히 감소하고 firmicutes의 유의한 증가가 관찰된 바 있다^{2,3)}. 인간의 장내 미생물은 대략 1,100종으로 구성되어 있고 인간 게놈보다 150배 더 많은 유전자를 포함하는 것으로 추정된다. 그렇기 때문에 장내 미생물 생태계는 인체와 생리학

및 병리학적인 상호작용에 있어 대단한 잠재력을 가지고 있다³⁾.

최근 프로바이오틱스에 대한 관심이 높아졌는데 프로바이오틱스는 발효 식품이나 배양된 우유 등에서 발견되는 살아있는 미생물로 구성된 안전한 식이 보충제이다⁴⁾. 항비만 효능을 가진 프로바이오틱스는 에너지 대사의 변화와 열 발생 및 포도당 대사, 지질 대사와 관련된 유전자의 발현을 변화시키고, 부교감 신경 활동을 변화시킬 수 있다⁵⁾. 예를 들어, 비만한 사람들에게 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus* 혼합물을 6주 동안 섭취하게 한 연구에서 총 콜레스테롤, low density lipoprotein, triglycerides, high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP)가 감소되고 high density lipoprotein과 인슐린 감수성이 증가되었다는 결과가 있었다⁵⁾. *Bifidobacterium breve* 단독으로 12주 동안 비만한 성인에게 투여한 연구에서는 체지방량이 감소되고 염증 마커인 hsCRP와 간기능 마커인 γ -guanosine triphosphate가 개선된 것으로 나타났고, *Lactobacillus gasseri* 단독으로 12주 동안 건강한 성인에게 투여한 결과 내장 지방, 체중, body mass index 및 허리둘레가 감소하였다⁵⁾. 그러나 장내 미생물은 복잡한 성질로 인해 안전성이 확보되지 않은 상태이고, 비만과 직접적으로 연관되는 미생물 군집도 구체적으로 알려져 있지 않기 때문에 활발한 연구가 진행 중이다⁴⁾.

*Akkermansia muciniphila*는 10여 년 전 인간의 분변에서 분리된 혐기성 및 그람음성 미생물로 체내의 장 건강 유지에 기여한다고 알려져 왔다. 장 점액은 뮤신이라 불리는 고분자의 당단백질로 구성된 점성 물질로서 장 상피를 병원체로부터 보호한다⁶⁾. *Akk. muciniphila*는 탄소 및 질소 공급원으로서 뮤신을 이용하는데, 이때 올리고당을 분해하며 발생한 당당류나 아미노산은 다른 미생물들에게 영양분이 될 수 있다^{7,8)}. 여러 마우스 실험을 통해서 체지방량 감소, 포도당 항상성 개선, 지방조직 염증 완화 및 gut integrity를 향상시킨다는 것이 확인되었고, *Akk. muciniphila*의 경구 투여 후 mucin층의 두께 증가 및 대사성 내독소증의 감소로 증명되었다⁶⁾. 또, normal chow와 *Akk. muciniphila*를 함께 섭취한 마우스 실험에서도 체지방량 감소, 인슐린 저항성 개선, 간과 근육에서의 지방산 합성 및 수송과 관련된 유전자 발현을 감소시켰다는 결과도 있다⁹⁾. 최근 연구에 따르면, Amuc_1100으로 불리는 *Akk. muciniphila*의 외막에 존재하는 특정 단백질은 향후 약물 개발의 강력한 후보가 될 수 있다는 것이 밝혀졌다¹⁰⁾.

본 연구는 향후 비만 치료제 개발 및 대사질환의 원인 규명을 위한 선행 연구로써 3T3-L1 지방전구세포(pre-adipocytes)에 *Akk. muciniphila*를 처리한 후 세포 생존율을 측정하고, 분화된 지방세포에서 지방축적 정도를 Oil red O 염색과 흡광도를 통한 염색의 강도로 관찰하여 이에 유의한 결과를 얻어 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. *Akk. muciniphila* 분리

실험에 이용한 *Akk. muciniphila*는 human fecal sample에서 분리하였으며, human fecal sample은 국가생명윤리정책원(Korea National Institute for Bioethics Policy) 공공기관생명윤리위원회에서 승인받고(No. P01-201705-31-002) 수집하였다. 분변에서 *Akk. muciniphila*는 Derrien 등⁷⁾의 방법으로 분리하였고, 실험을 위한 균주 배양방법은 mucin이 없는 modified synthetic medium으로 배양하였다¹¹⁾.

탁도 0.25 ± 0.03 (8 log CFU/mL)의 *Akk. muciniphila* sample을 5분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 이후 phosphate-buffered saline (PBS)에서 70°C로 30분 동안 pasteurization하여 *Akk. muciniphila* sample을 준비하였다. 실험에 이용할 균주 선별을 위해 HT-29 cell에 pasteurized *Akk. muciniphila*를 처리한 후 real time polymerase chain reaction (PCR)을 통해 interleukin (IL)-8, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6, IL-1 β mRNA의 relative expression을 분석하여 항염증 효능이 있는 균주 27개(EB-AMDK1~72)를 선별하였고, 이를 이용하여 실험을 진행하였다. 실험을 위해 *Akk. muciniphila* type strain (BAA-835)을 양성 대조군으로 포함하였고, 본 논문에서는 *Akk. muciniphila*의 효과를 주로 관찰하였다.

2. 세포 배양

실험에 사용한 3T3-L1 지방전구세포(pre-adipocyte)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank [KCLB], Seoul National University Cancer Research Institute, Seoul, Korea)에서 구입하였고, 10% bovine serum (BS) (Gibco 16170-078; Gibco, Rockville, MD, USA)와 1% penicillin/streptomycin (P/S)를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Welgene LM 001-05; WELGENE Inc., Gyeongsan, Korea) 배지를 기본 배양 배지로 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 well당 2×10^4 cells를 넣어 4일 동안 배양하였다.

3. 세포 생존율 평가

3T3-L1 지방전구세포의 *Akk. muciniphila*에 대한 세포 생존율을 평가하기 위해 10% BS, 1% P/S를 첨가한 DMEM 배지에서 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 배양한 세포 배양액에 *Akk. muciniphila*를 well당 1×10⁷개를 첨가하였다. 24시간 배양 후 EZ-cytox (water soluble tetrazolium salt, WST) ((주)대일바이오텍, 수원, 한국) 10 µL를 각 well에 첨가한 후 1시간 정도 반응시켰고, plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포분화 유도

3T3-L1 지방전구세포를 성숙한 지방세포(adipocyte)로 분화하기 위해 먼저 24 well plate에 well당 2×10⁴개의 세포를 분주하였다. 10% BS를 포함한 DMEM 배지에서 4일 동안 배양한 후 세포가 full-confluence가 되면 분화용 배지(DMEM, 10% fetal bovine serum [FBS], 0.5 mL 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma I5879), 1 µM dexamethasone (Sigma D4902, FW392.5), 1 µg/mL insulin)로 교체하고 *Akk. muciniphila* sample 50 µL를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2일 간 배양하였다. 이후 DMEM, 10% FBS, 1 µg/mL insulin이 포함된 인슐린 배지로 교체하여 *Akk. muciniphila* sample 50 µL를 첨가한 후 8일 동안 동일 조건에서 배양하였다.

5. Oil red O 염색 및 지방축적 측정

*Akk. muciniphila*가 성숙한 3T3-L1 지방세포에서 지방축적 억제 효과가 있는지 확인하기 위해 Oil red O 염색을 시행하였다. 배양 중인 배지를 제거하고 PBS로 세포를 세척한 후, 4% formaldehyde in PBS를 각 well마다 500 µL씩 첨가하여 5분 동안 배양한다. 4% formaldehyde in PBS를 교체하고 1시간 이상 세포를 고정한다. 고정된 세포를 60% isopropanol로 세척한 후 건조하고, 0.3% Oil red O (Sigma O0625; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 염색약을 각 well당 500 µL씩 분주하여 10분 동안 염색한다. 염색약 제거 후 distilled water를 이용해 4번 세척한 후 제거하고 1시간 동안 자연 건조한다. 이후 isopropanol 500 µL를 첨가하여 침전을 완전히 녹여내고 96 well plate에 100 µL/well로 분주하여 optical density 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 통계

모든 측정값은 평균값(mean)과 표준편차(standard deviation)로 나타내었고, 각 실험군 간의 통계분석은 Graphpad prism5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 one way analysis of variance test를 통해 시행하였다. 사후검정은 Turkey multiple comparison test, Bonferroni's multiple comparison test로 실시하였고, 실험군의 통계적 유의성은 P-value<0.05인 경우에 유의한 것으로 판단하였다.

결과

1. 유전자 발현 분석을 통한 *Akk. muciniphila*의 항염증 효능 관찰

균주 선별을 위해 HT-29 colorectal cancer cell에 pasteurized *Akk. muciniphila*를 처리한 후 real time PCR을 통해 IL-8, TNF-α, IL-6, IL-1β mRNA 발현을 분석하였다. HT-29 cell에 강한 염증 반응을 일으키는 내독소인 lipopolysaccharide를 처리하였을 때와 비교하여 *Akk. muciniphila* 균주(EB-AMDK1~72)를 처리하였을 때 유의한 항염증 효과가 나타난 것을 볼 수 있다(Fig. 1).

2. 3T3-L1 지방전구세포에서 *Akk. muciniphila*에 대한 세포 생존율 변화

*Akk. muciniphila*에 대한 3T3-L1 지방전구세포에서의 세포 생존율을 확인하기 위해 WST assay를 통해 각 세포의 세포 생존율(cell viability)을 미생물 처리하지 않은 3T3-T1 지방전구세포인 대조군, *Akk. muciniphila*의 type strain (표준 균주, BAA-835)을 처리한 양성 대조군, 27가지의 *Akk. muciniphila* 균주를 처리한 실험군(EB-AMDK1~72)에서 각각 비교하였다. 그 결과, 대조군인 3T3-L1 지방전구세포에 비해 type strain 또는 *Akk. muciniphila*를 처리한 군에서 대부분 유의하게 세포 생존율이 증가하였다. Type strain을 처리한 실험군과 *Akk. muciniphila*를 처리한 실험군을 비교하였을 때 8개의 *Akk. muciniphila* sample (EB-AMDK6, 8, 10, 39, 43, 46, 50, 54) 처리 시 세포 생존율이 유의하게 증가된 것이 관찰되었고 세포 독성은 관찰되지 않았다(Fig. 2).

3. 3T3-L1 지방세포의 Oil red O를 이용한 염색

분화된 3T3-L1 지방세포에서 지방축적에 대한 *Akk.*

Fig. 1. Anti-inflammatory effect of *Akkermansia muciniphila* on HT-29 cell. After treating pasteurized *Akk. muciniphila* strains in HT-29 cells, the relative expression of (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-8, and (D) TNF- α mRNA was analyzed by real time PCR. Compared with the treatment of LPS which causes strong inflammation in HT-29 cells, *Akk. muciniphila* strains (EB-AMDK1~72) showed significant anti-inflammatory effects. Data showed mean $\pm$ standard deviation. LPS: lipopolysaccharide, TS: type strain, IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, PCR: polymerase chain reaction. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared to LPS group.

Fig. 2. Effect of *Akkermansia muciniphila* on the cell viability. 3T3-L1 pre-adipocytes were treated with *Akk. muciniphila* for 24 hr and then cell viability was measured by WST assay. The viability of 3T3-L1 pre-adipocytes which were treated with *Akk. muciniphila* samples (EB-AMDK6, 8, 10, 39, 43, 46, 50, 54) increased compared to treatment with TS (BAA-835). Data showed mean $\pm$ standard deviation. Con: control, TS: type strain, WST: water soluble tetrazolium salt. ** P <0.01, *** P <0.001 compared to control group, † P <0.01, †† P <0.001 compared to TS group.

*muciniphila*의 효과를 확인하기 위해 Oil red O를 이용하여 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 미생물을 처리하지 않은 3T3-L1 지방세포인 대조군에 비해 *Akk. muciniphila*를 처리한 실험군(EB-AMDK1~72)에서 정도의

차이가 있으나 대부분 붉게 염색된 정도가 적게 관찰되며 지방축적이 유의하게 감소되었음이 관찰되었다(Fig. 3).

Fig. 3. Effect of *Akkermansia muciniphila* on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes through Oil red O staining. 3T3-L1 adipocytes were stained with Oil red O and were observed by microscope ($\times 40$). The stained area of 3T3-L1 adipocytes was small when treated with *Akk. muciniphila* compared to control group. It means when compared to the control group, lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes reduced when treated with *Akk. muciniphila* (EB-AMDK1~72).

Fig. 4. Effect of *Akkermansia muciniphila* on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes. The absorbance of 3T3-L1 adipocytes was measured at 500 nm. The absorbance of 3T3-L1 adipocytes decreased when treated with *Akk. muciniphila* compared to control group. The lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes treated with *Akk. muciniphila* samples (EB-AMDK10, 27) decreased compared to the group which was treated with TS (BAA-835). Data showed mean $\pm$ standard deviation. Con: control, TS: type strain. *** $P < 0.001$ compared to control group, $^{+}P < 0.01$ compared to TS group.

4. 흡광도를 이용한 3T3-L1 지방세포의 지방축적 측정

분화된 3T3-L1 지방세포에서 지방축적에 대한 *Akk. muciniphila*의 효과를 확인하기 위해 Oil red O로 염색한 후 흡광도를 이용하여 염색의 강도를 측정하였다. 그 결과 type strain (BAA-835)을 처리한 양성 대조군, *Akk. muciniphila*를 처리한 실험군(EB-AMDK1~72)에서 미생물을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 지방축적이 유의하게 감소하였고, type strain 양성 대조군과 *Akk. muciniphila* 실험군을 비교하였을 때 2개의 *Akk. muciniphila* 균주(EB-AMDK10, 27) 처리 시 지방축적이 유의하게 감소되었다(Fig. 4).

고찰

성인의 장 내부에는 $10^{13} \sim 10^{14}$ 개 가량의 다양한 미생물이 인간과 공생하며 살아가고 있다. 장내 미생물이 이루는 미세 환경은 숙주의 면역계 및 항상성 조절에 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있고, 최근에는 숙주의 에너지 균형과 대사에도 영향을 준다는 근거들이 보고되고 있다¹². 장내 미생물에 대한 관심이 높아지면서 식이보충제인 프로바이오틱스에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

*Akkermansia muciniphila*는 10년 전 인간의 분변에서 분리된 미생물로 mucin을 분해하여 살아가며 장 점막에서 안정적인 미생물 군집을 이루는데 도움을 준다¹³. 이로써 장 장벽의 기능을 개선시키고 숙주의 대사활동을 활성화시켜 면역력을 향상시킨다¹⁴. 실제로 최근 연구에서 대사

장애 및 염증성 장 질환을 가진 환자의 장내에서 *Akk. muciniphila*가 감소되어 있다는 것이 밝혀졌고¹⁵⁾, *Akk. muciniphila*를 비만한 여성에게 투여한 결과 체중, 체지방량 및 골반 둘레가 감소되었음을 관찰하였다¹⁶⁾. 이에 인간의 분변에서 분리한 *Akk. muciniphila*를 성숙한 지방세포에 직접 처리하여 지방축적 감소 효과를 관찰하고자 하였다.

*Akk. muciniphila*의 세포 독성 여부를 확인하기 위해 실험 물질인 3T3-L1 지방전구세포에 실험에 필요한 양인 1×10^7 cells을 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 대조군인 미생물을 처리하지 않은 3T3-L1 지방전구세포를 제외하고 실험군인 type strain (BAA-835) 또는 *Akk. muciniphila*를 처리한 3T3-L1 지방전구세포에서 세포 생존율이 유의하게 증가하였는데($P < 0.001$), 이는 3T3-L1 지방전구세포가 배양되는 과정에서 proliferation이 발생할 때 viability가 증가될 가능성이 있기 때문이고, *Akk. muciniphila*의 세포독성 자체는 거의 없다고 볼 수 있다.

본 실험에서는 3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨 후, *Akk. muciniphila*를 처리하여 adipocytes에서 형성되는 지방축적의 양을 관찰하기 위해 Oil red O 염색을 하였다. 그 결과, 미생물을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 *Akk. muciniphila*를 처리한 실험군에서 지방축적이 감소되어 있음을 관찰했고, 현미경 관찰에서도 지방축적이 눈에 띄게 감소되었음을 확인할 수 있었다.

*Akk. muciniphila*의 지방축적 감소 효과를 확인하기 위해 Oil red O 염색 후 흡광도를 측정하였으며, 대조군과 비교하여 *Akk. muciniphila*를 처리한 실험군에서 지방축적이 유의하게 감소되었음을($P < 0.001$) 확인할 수 있었다. 또한 type strain (BAA-835)을 처리한 군과 비교해서도 2개의 *Akk. muciniphila* sample 처리 시 지방축적이 유의하게 감소되었는데 이는 기존 연구에 많이 이용해왔던 type strain보다도 지방축적 감소에 더 효과적인 것으로 나타나 의의가 있다. 또한 결과는 고지방식이(high fat diet)를 섭취한 마우스 실험⁶⁾ 및 비만 환자를 대상으로 한 연구에서 실제로 체지방량이 감소된 것에 대한 근거¹⁶⁾가 될 수 있다.

본 연구를 종합하면 지방 합성을 활성화시키기 위해 3T3-L1 지방전구세포를 성숙한 지방세포로 분화시켰으며, 분화된 지방세포에 pasteurized *Akk. muciniphila*를 처리하였을 때 지방축적이 유의하게 감소되었다. 기존 연구에 이용해왔던 *Akk. muciniphila*의 type strain (BAA-835)보다 더 효과적인 후보 균주가 존재하는 것이 발견되어

앞으로의 연구에 더 다양한 균주를 이용해볼 수 있는 당위성을 확보하였다. 따라서 체내 지방축적을 억제시키는 *Akk. muciniphila*가 향후 체내 지방조직이 과다한 비만 환자들에게 지방축적을 감소시키는 치료제로 응용될 수 있을 것으로 생각되며, 이를 위해 *in vitro*뿐 아니라 동물 모델에서 *Akk. muciniphila*의 투여 후 비만과 관련된 다양한 생물학적 마커의 변화 분석 등 *in vivo*에서도 심도있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

결론

본 연구는 *Akkermansia muciniphila*의 성숙한 3T3-L1 지방세포에서 지방축적 억제효과를 관찰하기 위해 진행되었다. 우선 *Akk. muciniphila*의 세포독성 여부를 확인하기 위해 WST assay 시행 후 세포독성이 거의 없다는 것을 확인하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 분화시키며 *Akk. muciniphila*를 처리하였고, Oil red O 염색을 통해 지방세포의 지방축적 효과가 유의하게 감소되었다는 것을 현미경을 통해 관찰하였다. 또한 흡광도 측정에서도 *Akk. muciniphila* 처리 후 지방축적 효과가 감소된 것을 확인하였다. 부가적으로 기존의 연구에 이용되던 type strain (BAA-835)과 비교하였을 때도 cell viability가 유의하게 증가한 sample 8개, 지방축적이 유의하게 감소된 sample 2개를 발견하여 의의가 있었다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부에서 지원하는 2018년도 산학연협력 기술개발사업 S2651938의 연구지원에 의해 수행되었음.

References

1. Vallianou N, Stratigou T, Christodoulatos GS, Dalamaga M. Understanding the role of the gut microbiome and microbial metabolites in obesity and obesity-associated metabolic disorders: current evidence and perspectives. *Current Obesity Reports*. 2019 ; 8 : 1-16.
2. John GK, Mullin GE. The gut microbiome and obesity. *Current Oncology Reports*. 2016 ; 18(7) : 45.

3. Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011 ; 121(6) : 2126-32.
4. Dahiya DK, Renuka, Puniya M, Shandilya UK, Dhewa T, Kumar N, et al. Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: a review. *Front Microbiol*. 2017 ; 8 : 563.
5. Sivamaruthi BS, Kesika P, Suganthi N, Chaiyasut C. A review on role of microbiome in obesity and antiobesity properties of probiotic supplements. *BioMed Research International*. 2019 ; 2019 : 3291367.
6. Dao MC, Everard A, Aron-Wisniewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. 2016 ; 65(3) : 426-36.
7. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004 ; 54(5) : 1469-76.
8. Derrien M, Van Baarlen P, Hooiveld G, Norin E, Muller M, de Vos W. Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*. 2011 ; 2 : 166.
9. Zhao S, Liu W, Wang J, Shi J, Sun Y, Wang W, et al. *Akkermansia muciniphila* improves metabolic profiles by reducing inflammation in chow diet-fed mice. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2017 ; 58(1) : 1-14.
10. Cani PD, de Vos WM. Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*. 2017 ; 8 : 1765.
11. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med*. 2017 ; 23(1) : 107-13.
12. Kim HW, Baeg MK, Kim JH. The role of the gut microbiota in obesity. *The Korean Journal of Medicine*. 2019 ; 94(5) : 410-3.
13. Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog*. 2017 ; 106 : 171-81.
14. Ottman N, Geerlings SY, Aalvink S, de Vos WM, Belzer C. Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2017 ; 31(6) : 637-42.
15. Rajilic-Stojanovic M, Shanahan F, Guarner F, de Vos WM. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 ; 19(3) : 481-8.
16. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: A proof-of-concept exploratory study. *Nature Medicine*. 2019 ; 25(7) : 1096.