

3T3-L1 細胞의 增殖 및 分化에 미치는 白茯苓, 澤瀉 및 蒼朮의 影響

殷 載 淳·洪 種 星·*蘇 俊 魯
全州又石大學校 藥學科·*生物工學科

Effects of the Extracts from Hoelen alba, Alismatis Rhizoma and Atractylodes Rhizoma on Proliferation and Differentiation of 3T3-L1 Cells

Jae Soon Eun, Jong Sung Hong and June No So*

Dept. of Pharmacy and *Dept. of Biotechnology, Chunju Woo Suk University, Chonju 565-800, Korea

Abstract—These studies were conducted to investigate the effects of the extracts from Hoelen alba, Alismatis Rhizoma and Atractylodes Rhizoma on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells. The results were summarized as follows: Hoelen alba and Alismatis Rhizoma extracts inhibited the proliferation of preadipose 3T3-L1 cells. In inductive differentiation, all three extracts inhibited the adipose conversion in 2 days of initial-culture, Atractylodes Rhizoma extract inhibited the adipose conversion in 5 days of final-culture and Hoelen alba and Alismatis Rhizoma inhibited adipose conversion in treatment of whole term of culture. In spontaneous differentiation, Atractylodes Rhizoma extract increased the adipose conversion in 2 days of initial-culture, Hoelen alba and Alismatis Rhizoma increased the adipose conversion in 5 days of final-culture, all three extracts increased adipose conversion in treatment of whole term of culture.

The 10% serum of mice treated with each sample did not affect, but the 5% serum of them inhibited the proliferation of 3T3-L1 cells. In inductive differentiation, the 10% serum of them inhibited the adipose conversion in treatment of whole term of culture.

Keywords—Hoelen alba · Alismatis Rhizoma · Atractylodes Rhizoma · 3T3-L1 cell proliferation · inductive differentiation · spontaneous differentiation · adipose conversion

전지방세포(preadipocyte)인 3T3-L1 세포는 3T3 세포로부터 유래된 세포주로서 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있어 지방세포의 대사과정을 물론 지방축적과 지방세포의 분화과정을 연구하는데 널리 사용되고 있다.¹⁻³⁾ 전지방세포의 증식 및 지방세포로의 분화에 영향을 미치는 물질을 탐색하고 그 작용과정을 밝히는데 3T3-L1

세포를 이용하여 실험한 결과 retinol⁴⁾, retinoic acid⁵⁾, vitamin D group⁶⁾, vitamin E⁷⁾, nicotinamide⁸⁾, phorbol ester⁹⁾, dihydroteleocidin B⁹⁾, lithium¹⁰⁾ 등을 전지방세포의 지방세포의 분화를 억제하지만, 이와는 달리 ascorbate¹¹⁾, hemin¹²⁾, cadmium¹³⁾, corticosterone³⁾, cAMP³⁾ 등은 지방세포로의 분화를 촉진시킨다는 사실이 밝혀져

지방세포의 분화과정을 자세하게 이해하게 되었으며 전지방세포의 증식과 분화 및 지방세포의 지방생산을 조절하거나 과도한 지방생산과 축적을 억제시킬 수 있는 약물의 개발에도 크게 기여하고 있다.

본 연구에서는 백복령(Hoelen Alba), 택사(Alismatis Rhizoma) 및 창출(Atractylodis Rhizoma)이 전지방세포인 3T3-L1 세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 관찰한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

실험재료

검액 조제—본 실험에 사용한 약제는 시중 건재상에서 구입하여 엄선하여 사용하였으며, 각 생약 100 g을 증류수에 5시간 가열 추출하고, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 60°C에서 감압농축한 뒤, vaccum dry oven에서 40°C로 건조시켜 엑스(백복령 3g, 택사 10.7g, 창출 20g)를 각각 얻어 실험시에 멸균하여 사용하였다.

세포주 및 실험동물—실험에 사용한 3T3-L1 세포는 일본 나고야대학 농학부 생화학제어실 Y. Kitagawa 교수로부터 분양받아 사용하였으며, 마우스는 ICR 20±2g 웅성을 사용하였다.

시약 및 기구—실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME, Sigma), RPMI 1640(Gibco), fetal bovine serum(FBS, Gibco), trypsin(Gibco), penicillin-streptomycin(Sigma), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A, Sigma), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma), dexamethasone(DEX, Sigma), 1-methyl-3-isobutylxanthine(MIX, Sigma), insulin(Sigma), Oil Red O(Sigma), Mayer's hematoxylin(Sigma) 등이며, 사용기구는 culture flask(Nunc), multi-well plate(96-well, Costa), disposable pipette(Bellico), disposable pasteur pipette(9 inch, Sigma), ELISA-Reader(Dynatech), CO₂ incubator(Vision Scientific Co.), inverted microscope(Nicon Co.) 등을 사용하였다.

실험 방법

세포 배양—실험에 사용된 3T3-L1 세포의 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME)이었으며, 실험조건에 따라 다양한 농도의 fetal bovine serum(FBS), penicillin(100 units/ml), streptomycin(100 µg/ml) 등을 첨가하였다. 3T3-L1은 배양 3~4일 간격으로 배양세포 표면을 Dulbecco's phosphate buffered saline A(DPBS-A) 용액으로 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin 용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin 용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DME 배양액(DME/FBS10) 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기(50 ml culture flask)에 1:20의 split ratio로 옮겨 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 이러한 계대배양 조건에서 3T3-L1은 preadipocyte 상태로 유지된다고 알려져 있다.¹⁴⁾

MTT 법에 의한 세포 증식능 측정—3T3-L1 세포의 증식능은 Moseman의 방법¹⁵⁾을 개량한 Skaper 등의 방법¹⁶⁾을 응용하여 측정하였다. 세포증식능 측정에 사용한 MTT는 DPBS-A에 5 mg/ml 농도로 용해시켜 여과멸균 하였으며, 세포는 96-well plate에 1×10⁴ cells/well 농도로 점종하고 배양액의 최종 용적은 200 µl로 하였다. 세포배양 종료 4시간 전에 MTT 용액을 첨가하였으며(20 µl/well), 배양종료 후 세포배양액을 제거하고 100 µl의 0.01 N HCl-isopropanol을 첨가하여 세포에 의해 생성된 청색 결정의 formazan을 용해시켰다. Formazan이 용해된 배양 plate의 각 well의 흡광도는 ELISA Reader로 570 nm에서 측정하였다. 이상의 과정에서 MTT 용액을 첨가한 다음 부터는 배양 plate를 은박지로 포장하고 빛을 차단시킨 상태로 배양하여 빛에 의한 MTT의 환원을 최소화 하였다.

세포증식능 측정을 위한 배양 조건—계대배양 중인 배양 3일째의 3T3-L1 세포를 trypsin 처리에 의해 상기한 바와 같은 방법으로 탈착시켜 실험조건에 따라 FBS가 다양한 농도로 첨가된 DME 배양액에 1×10⁵ cells/ml로 부유시켰다. 세포부유액 100 µl씩을 96 well plate의 각 well에

분주하여 well당 1×10^4 세포가 접종되게 한 다음 각 well에 배양액을 50 μ l씩 더 첨가하고 CO₂ incubator(5% CO₂, 37°C)에서 24시간 배양하여 세포를 부착시켰다. 그후 다시 각 well에 희석된 시료 또는 배양액을 50 μ l씩 첨가하여 최종용적이 200 μ l가 되게 하였다. 이상과 같이 처리한 다음, CO₂ incubator에서 2일간 배양하여 3T3-L1 세포의 증식능에 미치는 검액의 효과를 조사하였다.

3T3-L1 세포증식에 미치는 검액의 영향—엑스화된 검액을 다양한 농도로 배양액에 희석하고 여과멸균 시켜 앞서 언급한 바와 같은 방법으로 부착된 세포에 처리하였다. 세포의 증식능에 미치는 검액의 효과는 MTT 법으로 측정된 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 산정하였다.

3T3-L1 세포의 분화능 측정—3T3-L1 세포의 분화능은 Oil Red O로 염색하여 측정하였다. 분화된 세포를 관찰하기 위해서는 배양 후 세포표면을 DPBS로 2회 씻어준 다음 10% formalin/DPBS로 30분간 고정하고 Oil Red O로 10분간 염색하였다. 염색 후 여분의 염색액을 흐르는 물에서 3분간 조심스럽게 씻어내고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하여 검정하였다. 분화정도를 측정하기 위해서는 배양 후 세포표면을 DPBS-A로 씻어준 다음 trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 떼어낸 다음 적당한 양의 DME/FBS10에 부유시켰다. 세포부유액에 동량의 Oil Red O를 첨가하여 실온에서 수분간 처리한 다음, 염색된 Oil Red O를 isopropanol로 용출시켜 ELISA reader 510nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 분화정도를 측정하였다.¹⁷⁾

3T3-L1 세포의 분화에 미치는 검액의 영향—배양 중인 3T3-L1 세포가 confluent stage에 도달하면 분화유도 물질인 dexamethasone(DEX, 0.25 μ M), 1-methyl-3-isobutylxanthine(MIX, 0.5 mM), insulin(10 μ g/ml) 등이 함유된 DME/FBS10(분화유도 배양액)으로 배양액을 교환하고 48시간 동안 배양하여 adipocyte로 분화를 유도하였다.¹⁷⁾ 분화유도 배양 후 insulin만 첨가된 배양액으로 배양액을 교환하고 5일간 더 배양하여 mature adipocyte로 분화시켰으며, 3T3-

L1 세포의 분화에 미치는 검액의 효과를 조사하기 위해서 여러 농도의 검액을 분화유도 물질처리 시 동시에 첨가하거나 또는 분화유도 후 배양액 교환시에 첨가 하였다. 한편으로는 confluent stage에 도달한 3T3-L1 세포에 분화 유도물질 처리없이 검액만을 처리하고 7일 이상 장기간 배양하여 장기 배양에 의한 3T3-L1 세포의 분화에 미치는 검액의 효과도 조사 하였다.

3T3-L1 세포증식 및 분화에 미치는 검액투여 마우스 혈청의 영향—각 검액을 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 마우스에 경구투여한 뒤, 단두하여 채혈하고 혈청을 분리하여, filter로 여과멸균하여 10% 및 5% 농도로 또는 FBS와 혼합하여 세포증식능 및 분화능을 앞서 언급한 바와 같은 방법으로 부착된 세포에 처리하였다.

실험 결과

3T3-L1 세포증식에 미치는 검액의 효과—지방세포의 특성을 규명하는데 주로 이용되는 3T3-L1 세포는 DME/FBS10 배지로 통상적인 조건인 37°C의 5% CO₂ 항온기에서 배양되면 doubling time이 20~30시간 정도이나, 계대배양 횟수에 따라 변화가 있을 수 있는 것으로 알려져 있어¹⁹⁾, 본 실험에 사용한 3T3-L1 세포의 증식을 조사한 결과 doubling time은 24.6시간이었으며 포화밀도(saturation density)는 대략 $7 \sim 10 \times 10^4$ cells/cm²로 측정되어 본 실험의 세포도 3T3-L1 세포의 일반적인 증식특성을 보유하고 있는 것으로 확인되었다.

지방세포로 분화되기 전단계인 전지방세포의 증식에 미치는 백복령, 텍사 및 창출엑스의 영향을 조사하기 위하여 96-well plate의 각 well에 세포농도를 10^4 cells/well로 하고 여러 농도의 검액을 2일 동안 처리하여 배양한 결과, 백복령엑스는 10^{-4} 및 10^{-3} g/ml 농도에서, 텍사엑스는 $10^{-7} \sim 10^{-3}$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 현저하게 세포증식을 억제하였으나, 창출엑스는 10^{-5} 및 10^{-4} g/ml 농도에서 오히려 세포증식을 촉진시켰다. 이상의 결과는 백복령과 텍사엑스가 전지방세포인 미분화 상태의 3T3-L1 세포의 증식을 저지시키는 효과가 있음을 보여주는 것이다

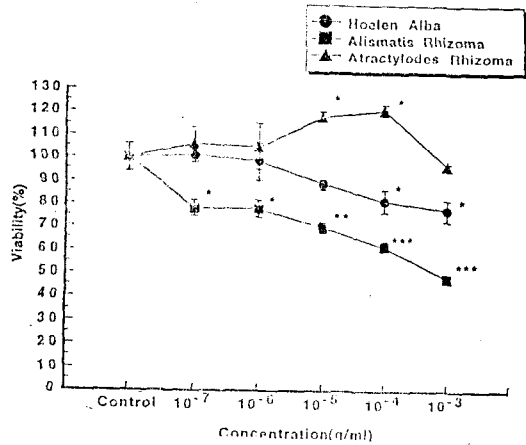


Fig. 1. Effect of Hoelen alba, Alismatis Rhizoma and Atractylodes Rhizoma extract on the proliferation of cultured 3T3-L1 cells (1×10^4 cells/well) for 2 days using the MTT-colorimetric assay

Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays.

Significantly different from the control group,

*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$.

The OD of each well was measured with a microplate spectrophotometer (Dynatech MR 700) at 570 nm.

The % viability was calculated by the following equation.

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{OD of treated group}}{\text{OD of control}} \times 100$$

(Fig. 1).

3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화에 미치는 검액의 효과—미분화 상태의 전지방 세포인 3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화에 미치는 백복령, 택사 및 창출엑스의 영향을 조사하기 위하여 96-well plate의 각 well에 10^4 개의 세포를 넣고 4 일 동안 배양하여 confluent stage에 도달시킨 후, 세포분화 유도물질 첨가없이 또는 첨가하에 2일 동안 배양(초기 배양 2일)하고 배지교환 후 5일 간 더 배양(후기 배양 5일) 하였다. 분화 유도물질 처리군 또는 무처리군 모두에 여러 농도의 검액을 처음 2일간만 처리하거나, 나중의 5일 동안만 처리하거나 또는 처음부터 7일간 계속 처리하거나 하여 자연적인 분화와 유도물질에 의한 유도분화에 미치는 효과를 나누어 조사하였다.

초기배양 2일간 각 생약엑스 처리에 의한 영향

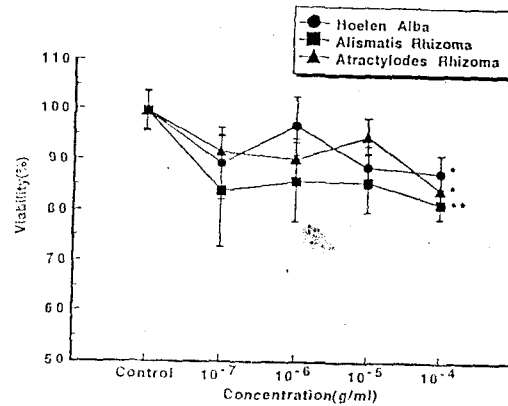


Fig. 2. Effect of Hoelen alba, Alismatis Rhizoma and Atractylodes Rhizoma extract on the adipose conversion of 3T3-L1 cells

At the confluent stage of 3T3-L1, the medium was changed by induction medium (DEX, MIX, insulin, biotin) contained extract and then culture plate was incubated at 37°C CO₂-incubator for 48hrs. After 48hrs, the medium was changed by DME/FBS contained insulin and biotin, and then culture plate was incubated for further 5 days.

Significantly different from the control group, *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$.

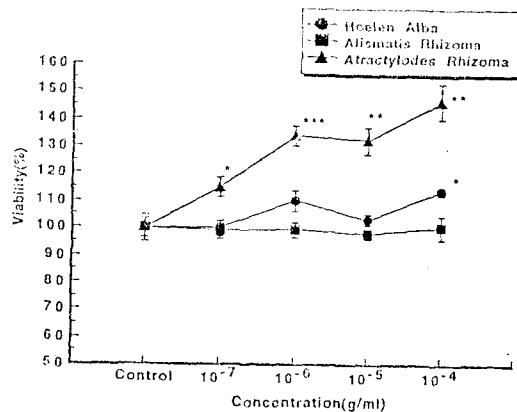


Fig. 3. Effect of Hoelen alba, Alismatis Rhizoma and Atractylodes Rhizoma extract on the spontaneous adipose conversion of 3T3-L1 cells

At the confluent stage of 3T3-L1, the medium was changed by DME/FBS contained extract and then culture plate was incubated at 37°C CO₂-incubator for 48hrs. After 48 hrs, the medium was changed by DME/FBS contained insulin and biotin, and then culture plate was incubated for further 5 days.

Significantly different from the control group, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$.

을 조사한 결과, 유도분화시에는 백복령, 택사 및 창출엑스 모두 10^{-4} g/ml 농도에서 지방세포 분화를 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였으나(Fig. 2), 자연분화시에는 창출은 $10^{-7} \sim 10^{-4}$ g/ml 농도에서, 백복령은 10^{-4} g/ml 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가시켰고 택사는 별 영향을 주지 못하였다(Fig. 3).

후기배양 5일간의 각 생약엑스 처리에 의한 영향을 조사한 결과, 유도분화시에는 창출엑스는 $10^{-7} \sim 10^{-4}$ g/ml 농도에서 지방세포 분화를 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였으나(Fig. 4), 자연분화시에는 백복령과 택사엑스는 10^{-4} g/ml 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가시켰고 창출은 별 영향을 주지 못하였다(Fig. 5).

초기배양 2일간 및 후기배양 5일간 합하여 7일간 각 생약엑스 처리에 의한 영향을 조사한 결과, 유도분화시에는 백복령엑스는 10^{-6} g/ml 이상의 농도에서, 택사엑스는 10^{-5} g/ml 이상의 농도에서 지방세포 분화를 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였으나(Fig. 6), 자연분화시에는 백복령엑스는 10^{-5} g/ml 이상의 농도에서, 택사는

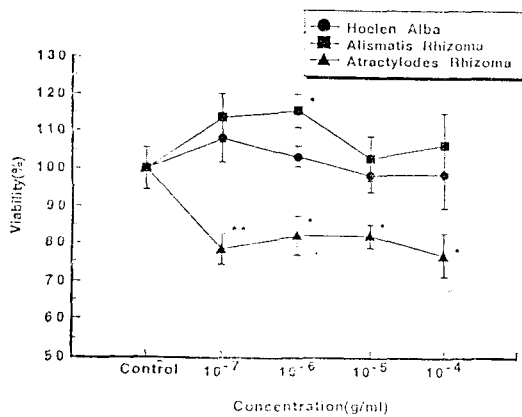


Fig. 4. Effect of Hoelen alba, Alismatis Rhizoma and Atractylodes Rhizoma extract on the adipose conversion of 3T3-L1 cells

At the confluent stage of 3T3-L1, the medium was changed by induction medium and then culture plate was incubated for 48 hrs. After 48 hrs, the medium was changed by DME/FBS contained insulin, biotin and extract, and then culture plate was incubated for further 5 days.

Significantly different from the control group, *; $p < 0.05$ and **; $p < 0.01$.

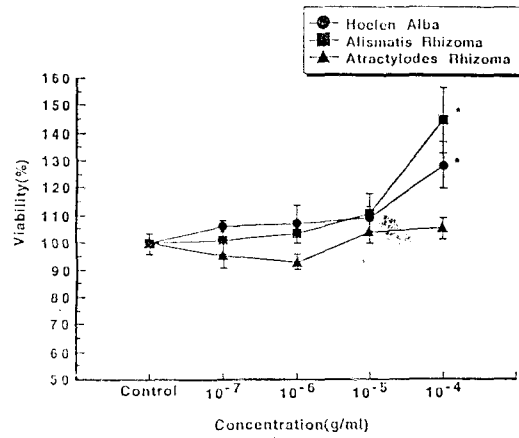


Fig. 5. Effect of Hoelen alba, Alismatis Rhizoma and Atractylodes Rhizoma extract on the spontaneous adipose conversion of 3T3-L1 cells

At the confluent stage of 3T3-L1, the medium was changed by DME/FBS medium and then culture plate was incubated for 48 hrs. After 48 hrs, the medium was changed by DME/FBS contained insulin, biotin and extract, and then culture plate was incubated for further 5 days.

Significantly different from the control group, *; $p < 0.05$.

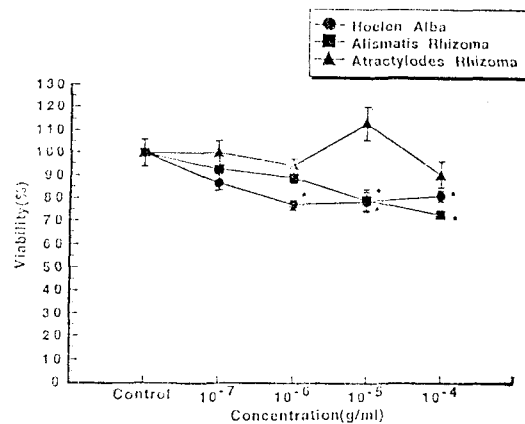


Fig. 6. Effect of Hoelen alba, Alismatis Rhizoma and Atractylodes Rhizoma extract on the adipose conversion of 3T3-L1 cells

At the confluent stage of 3T3-L1, the medium was changed by induction medium contained extract and then culture plate was incubated for 48 hrs. After 48 hrs, the medium was changed by DME/FBS contained insulin, biotin and extract, and then culture plate was incubated for further 5 days.

Significantly different from the control group, *; $p < 0.05$.

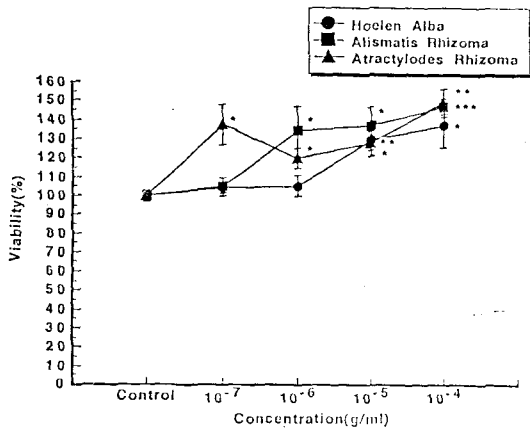


Fig. 7. Effect of Hoelen alba, Alismatis Rhizoma and Atractylodes Rhizoma extract on the spontaneous adipose conversion of 3T3-L1 cells

At the confluent stage of 3T3-L1, the medium was changed by DME/FBS medium contained extract and then culture plate was incubated for 48 hrs. After 48 hrs, the medium was changed by DME/FBS contained insulin, biotin and extract, and then culture plate was incubated for further 5 days.

Significantly different from the control group, *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ and ***; $p < 0.001$.

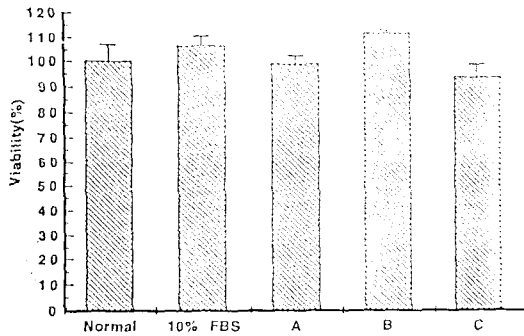


Fig. 8. Effect of 10% serum of Hoelen alba, Alismatis Rhizoma and Atractylodes Rhizoma treated mice on the proliferation of cultured 3T3-L1 cells for 2 days

Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays.

Drugs (500 mg/kg/day) were administered p.o. for 7 days.

A; 10% serum of Hoelen alba treated mice
B; 10% serum of Alismatis Rhizoma treated mice

C; 10% serum of Atractylodes Rhizoma treated mice

10^{-6} g/ml 이상이 농도에서, 추출은 $10^{-7} \sim 10^{-4}$ g/ml 농도에서, 대조군에 비하여 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 7).

3T3-L1 세포증식에 미치는 검액투여 마우스 혈청의 효과—각 검액을 마우스에 경구투여하여 얻어진 혈청이 세포증식에 미치는 영향을 관찰한 결과, 10% 혈청만을 가하였을 때, 10% 혈청과 10% FBS를 혼합하여 가하였을 때, 백복령, 택사 및 창출엑스를 투여한 마우스의 혈청 모두 세포증식에는 영향을 주지 못하였으나(Fig. 8, Fig. 9), 5% 혈청만을 가하였을 때, 5% 혈청과 5% FBS를 혼합하여 가하였을 때는 백복령, 택사 및 창출엑스 모두 정상 마우스의 혈청에 비해 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 10, Fig. 11).

3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화에 미치는 검액투여 마우스 혈청의 효과—각 검액을 마우스에 경구투여하여 얻어진 혈청이 유도분화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 초기배양 2일간의 혈청처리에 의해서는 백복령엑스를 투여한 마우스의 10% 혈청을 가하였을 때, 대조군에 비하여 유의성 있게 지방세포 분화를 억제하였으며, 택사 및 창출엑스를 투여한 마우스의 10% 혈청은 별 영향을 주지 못하였다. 창출엑스를 투여한 마우스의 5% 혈청을 가하였을 때는, 대조군에

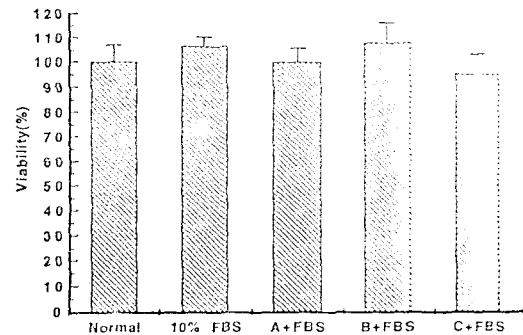


Fig. 9. Effect of 10% FBS and 10% serum of samples treated mice on the proliferation of cultured 3T3-L1 cells for 2 days

Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays.

A; 10% serum of Hoelen alba treated mice
B; 10% serum of Alismatis Rhizoma treated mice

C; 10% serum of Atractylodes Rhizoma treated mice

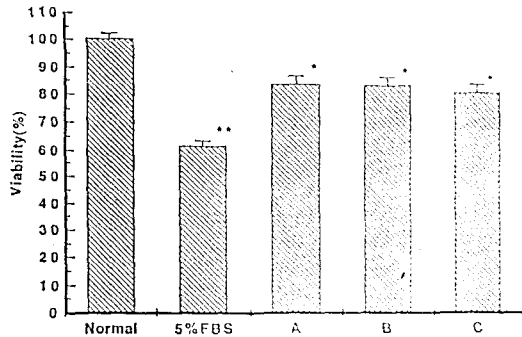


Fig. 10. Effect of 5% serum of samples treated mice on the proliferation of cultured 3T3-L1 cells for 2 days

Each bar represents the mean±SE of 4 assays

Significantly different from the control group, *; $p < 0.01$ and **; $p < 0.001$.

- A; 5% serum of Hoelen alba treated mice
- B; 5% serum of Alismatis Rhizoma treated mice
- C; 5% serum of Atractylodes Rhizoma treated mice

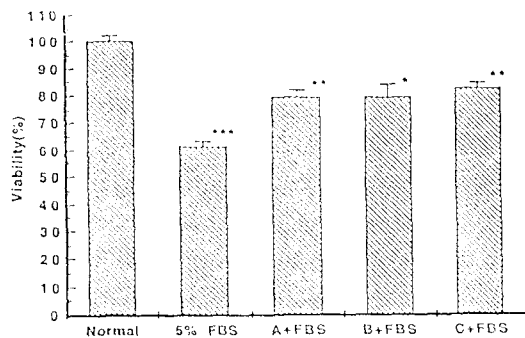


Fig. 11. Effect of 5% FBS and 5% serum of samples treated mice on the proliferation of cultured 3T3-L1 cells for 2 days

Each bar represents the mean±SE of 4 assays.

Significantly different from the control group, *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ and ***; $p < 0.001$.

- A; 5% serum of Hoelen alba treated mice
- B; 5% serum of Alismatis Phizoma treated mice
- C; 5% serum of Atractylodes Rhizoma treated mice

비하여 유의성 있게 지방세포 분화를 억제하였으며, 백복령 및 텍사엑스를 투여한 마우스의 5% 혈청은 별 영향을 주지 못하였다(Fig. 12).

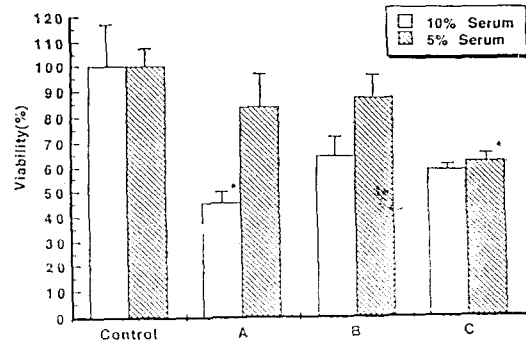


Fig. 12. Effect of 5% serum and 10% serum of samples treated mice on the adipose conversion of 3T3-L1 cells for 2 days

At the confluent stage of 3T3-L1, the medium was changed by induction medium contained serum of sample treated mice and then culture plate was incubated 37°C CC₂ incubator for 48 hrs. After 48 hrs, the medium was changed by DME/FBS, and then culture plate was incubated for further 5 days.

Each bar represents the mean±SE of 4 assays.

Significantly different from the control group, *; $p < 0.05$.

- A; 5% and 10% serum of Hoelen alba treated mice
- B; 5% and 10% serum of Alismatis Rhizoma treated mice
- C; 5% and 10% serum of Atractylodes Rhizoma treated mice

초기배양 2일간 및 후기배양 5일간 합하여 7일간의 혈청치리에 의해서는 백복령, 텍사 및 창출엑스를 투여한 마우스의 10% 혈청을 가하였을 때 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 지방세포 분화를 억제하였으며, 텍사 및 창출엑스를 투여한 마우스의 5% 혈청을 가하였을 때는, 대조군에 비하여 유의성 있게 지방세포 분화를 억제하였으나, 백복령엑스를 투여한 마우스의 5% 혈청은 별 영향을 주지 못하였다(Fig. 13).

고 찰

백복령 및 텍사엑스가 전지방세포인 미분화 상태의 3T3-L1 세포의 증식을 억제한 본 실험결과는 전지방세포의 증식을 직접 억제하는데 이들 약물이 유효하게 작용하리라는 점을 시사한다.

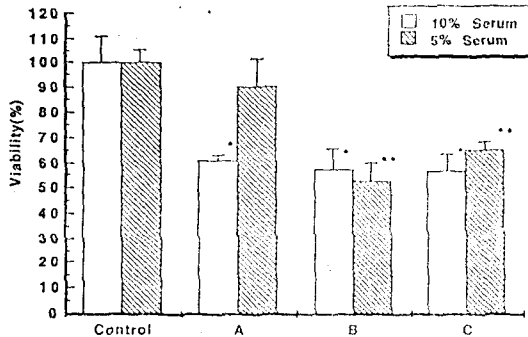


Fig. 13. Effect of 10% serum and 5% serum of samples treated mice on the adipose conversion of 3T3-L1 cells for 7 days

At the confluent stage of 3T3-L1, the medium was changed by induction medium contained serum of samples treated mice and then culture plate was incubated 37°C CO₂ incubator for 48 hrs. After 48 hrs, the medium was changed by DME/FBS contained serum of samples treated mice, and then culture plate was incubated for further 5 days.

Each bar represents the mean ± SE of 4 assays.

Significantly different from the control group, *; $p < 0.05$ and **; $p < 0.01$.

A; 5% and 10% serum of *Hoelen alba* treated mice

B; 5% and 10% serum of *Alimatis Rhizoma* treated mice

C; 5% and 10% serum of *Atractylodes Rhizoma* treated mice

배양초기 2일간의 처리시에 유도분화의 경우, 백복령, 택사 및 창출엑스 모두 10⁻⁴ g/ml 농도에서 세포분화를 억제하였으나, 자연분화시에는 창출엑스가 세포분화를 오히려 증가시켰으며, 후기배양 5일간의 처리시에는 유도분화의 경우, 택사엑스가 전농도에서 세포분화를 억제하였고, 자연분화시에는 백복령 및 택사엑스가 10⁻⁴ g/ml 농도에서 세포분화를 오히려 증가시켰다. 초기 배양 2일간 및 후기배양 5일간 합하여 7일간 각 생약엑스 처리에 의한 영향을 조사한 결과, 유도분화의 경우, 백복령 및 택사엑스가 세포분화를 억제하였으나, 자연분화시에는 백복령, 택사 및 창출엑스 모두 세포분화를 오히려 증가시켰다. 이 결과는 이들 생약들이 분화유도 물질에 의해 빠르게 분화하는 지방세포의 분화는 억제하나 자

연분화시에는 오히려 증가시킨다는 것을, 이들 약물이 생체내의 이상 대사에 의해 분화유도물질이 급격히 상승할 때, 이를 억제하는 것이 아닌가 추정되나 자세한 기전은 추후 연구 검토되어야 할 것이다.

각 약물투여 마우스의 10% 혈청 및 10% FBS와의 혼합 처리시에 세포증식에는 영향을 주지 못하였으나, 5% 혈청 및 5% FBS와의 혼합처리시에는 정상 마우스의 혈청에 비해 세포증식을 감소시켰으며, 10% 혈청 및 5% 혈청은 유도분화시 초기배양 때 처리하는 것 보다는 초기배양 및 모두 처리할 때 더 강력하게 지방세포의 분화를 억제하였으나, 자연분화시 처리시에는 별 영향을 주지 못 하였다. 이러한 결과는 앞의 실험결과에도 비슷한 결과이다.

비만(obesity)은 단순한 과잉체중(overweight)과는 달리 체내 지방의 과잉축적이며 이러한 비만에는 지방세포의 수의 변화없이 세포가 비후되는 세포비대형 비만(hypertrophic obesity)과 지방세포의 수와 크기가 증가한 세포과다증식 및 세포비대형 비만(hyperplastic-hypertrophic obesity) 등이 있어, 비만은 지방세포의 이상과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 완전히 분화된 지방세포에서는 triglyceride가 세포 중량의 95% 정도를 차지하며 세포내부에 많은 수의 잘 발달된 지방과립낭이 포함되어 있고 신경조절 및 호르몬 조절에 반응하여 매우 활발한 대사를 한다. 이런 지방세포가 결합조직의 세포로부터 분화되어 나오며 분화된 지방세포 내에 존재하는 지방은 지방세포 자체가 합성한다는 사실과 insulin 및 glucocorticoid 호르몬의 지방세포의 분화와 지방 생산 및 축적을 유발시키는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁾

이상의 실험결과 백복령 및 택사가 전지방세포의 증식을 억제하고 백복령, 택사 및 창출이 자연분화시 보다 유도분화시에 더 강력하게 지방세포의 분화를 억제한다는 결과는 비만의 요인인 전지방세포의 분화과정에 이들 약물들이 밀접하게 관계될 수 있으리라 추정되나 좀더 자세한 기전은 추후 연구 되어야 할 것이다.

결 론

백복령, 텍사 및 창출이 3T3-L1 세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백복령 및 텍사는 전지방세포의 증식을 현저히 억제하였으며, 창출은 세포의 증식을 촉진하였다.

2. 유도분화시에는 초기배양 2일간 각 검액을 처리한 경우 백복령, 텍사 및 창출은 10^{-4} g/ml 농도에서, 후기배양 5일간 처리한 경우 창출은 전농도에서, 초기배양 2일간 및 후기배양 5일간 처리한 경우 백복령 및 텍사는 세포의 분화를 억제하였다.

3. 자연분화시에는 백복령은 10^{-4} g/ml 농도에서 창출은 10^{-7} ~ 10^{-4} g/ml 농도에서, 후기배양 5일간 처리한 경우 백복령 및 텍사는 10^{-4} g/ml 농도에서, 초기배양 2일간 및 후기배양 5일간 처리한 경우 백복령, 텍사 및 창출은 세포분화를 증가시켰다.

4. 백복령, 텍사 및 창출엑스를 마우스에 경구투여하여 얻어진 혈청을 처리한 경우 5% 혈청 및 5% 혈청과 5% FBS를 혼합하여 가하였을 때 모두 정상 마우스의 혈청에 비해 세포증식을 유의성 있게 감소시켰다.

5. 초기배양 2일간의 혈청처리에 의해서는 백복령엑스를 투여한 마우스의 10% 혈청에서, 창출엑스를 투여한 마우스의 5% 혈청에서 대조군에 비하여 유의성 있게 지방세포 분화를 억제하였다.

6. 초기배양 2일간 및 후기배양 5일간 혈청처리에 의해서는 백복령, 텍사 및 창출엑스를 투여한 마우스의 10% 혈청에서, 텍사 및 창출엑스를 투여한 마우스의 5% 혈청에서 대조군에 비하여 유의성 있게 지방세포 분화를 억제하였다.

이상의 실험결과 백복령 및 텍사가 전지방세포의 증식을 억제하고 자연분화시 보다 유도분화시 초기에 더 강력하게 지방세포의 분화를 억제하며, 창출은 유도분화시 후기에 더 강력하게 지방세포의 분화를 억제한다는 사실은 이들 약물들이 비만의 요인인 전지방세포의 증식 및 분

화에 관계될 수 있음을 시사하는 것이다.

(1993년 4월 9일 접수: 5월 3일 수리)

참 고 문 헌

- Green, H. and Kehinde, O.: *Cell* 1, 113 (1974).
- Green, H. and Kehinde, O.: *Cell* 7, 105 (1976).
- Serrero, G. and Khoo, J.C.: *Anal. Biochem.* 120, 351 (1981).
- Sato, M., Hiragun, A. and Mitsui, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1839 (1980).
- Stone, R.L. and Bernlohr, D.A.: *Cell Biol. & Biochem. Mol. Biol.* (1989).
- Sato, M. and Hiragun, A.: *J. Cell. Physiol.* 135, 545 (1988).
- Kawada, T., Aoki, N., Kamei, Y., Macshige, K., Nishiu, S. and Sugimoto, E.: *Comp. Biochem. Physiol.* 96A, 323 (1990).
- Lewis, J.E. Shimizu, Y. and Shimizu, N.: *FEBS Lett.* 146, 37 (1982).
- Shimizu, Y., Shimizu, N., Fujiki, H. and Sugimura, T.: *Cancer Res.* 43, 4974 (1983).
- Aratani, Y., Sugimoto, E. and Kitagawa, Y.: *FEBS Lett.* 218, 47 (1987).
- Cno, M., Aratani, Y., Kitagawa, I. and Kitagawa, Y.: *Exp. Cell Res.* 187, 309 (1990).
- Chen, J.J. and London, I.M.: *Cell* 26, 117 (1981).
- Harrison, S.A., Buxton, J.M. Clancy, B.M. and Czech, M.P.: *J. Biol. Chem.* 266, 19438 (1991).
- Morikawa, M., Nixon, T. and Green, H.: *Cell* 29, 783 (1982).
- Mosmann, T.: *J. Immunol. Methods* 65, 55 (1983).
- Skaper, S.D., Facci, L., Milani, D., Leon, A. and Toffano, G.: In *Methods in Neurosciences*, Vol. 2, *Cell Culture*, pp.17-33 (1990).
- Gamou, S., Shimizu, Y. and Shimizu, N.: In *Methods in Molecular Biology*, Vol. 5, *Animal Cell Culture*, pp.197-207 (1990).
- Bray, G.A.: Obesity. In *Encyclopedia of Human Biology* 5, pp.517-521 (1991).
- Buskirk, E.R.: In *Encyclopedia of Human Biology* 1, pp.57-62 (1991).