

원저

산양산삼 추출물이 지방세포의 분화에 미치는 영향

• 김병우* · 권기록**

* 상지대학교 한의과대학 내과학교실

** 상지대학교 한의과대학 침구학교실

The Effect of Cultivated Wild Ginseng Extract on Preadipocyte Proliferation

Byoung-Woo Kim* · Ki-Rok Kwon**

* Dept. of Internal Medicine, Oriental Medical College, Sangji University

** Dept. of Acup & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Sangji University

ABSTRACT

- Objectives** The purpose of this study is to investigate the effects of cultivated wild ginseng extract on primary cultured preadipocyte and adipocytes.
- Methods** Diminish preadipocyte proliferation does primary role to reduce obesity. So, preadipocytes and adipocytes were performed on cell cultures with using Sprague-Dawley rats and treated with 0.01-1mg/ml cultivated wild ginseng extract.
- Result** At all concentrations, cultivated wild ginseng extract wasn't show the suppress proliferation of preadipocytes significantly and failed to show effects on decomposition of adipocytes except high dosage.
- Conclusion** Based on these findings, cultivated wild ginseng is not a suitable choice for the treatment of localized obesity.
- key words** *Cultivated wild ginseng, preadipocytes, adipocytes, obesity.*

1. 서론

비만은 칼로리의 섭취가 신체활동과 성장 등에 필요한 에너지보다 초과되어 중성지방의 형태로 지방조직에 과잉 축적되어 열량 불균형으로 나타나게 되는 상태를 뜻한다. 남성의 경우 체지방량이 체중의 25% 이상, 여성은 30% 이상인 경우에 비만이라고 한다¹⁾. 최근 삶의 질이 높아지면서 외모에 대한 관심이 점차 많아지고 있고, 특히 젊은 여성을 중심으로 한 다이어트 열풍이 사회적으로 큰 흐름을 형성하고 있음은 부인하지 못할 사실이다.

山蔘은 五加科(주릅나무과 ; Araliaceae)에 속한 다년

생 초목인 人蔘(panax ginseng C. A. Meyer)이 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 蔘을 일컬으며²⁾ 한방에서는 예로부터 대표적인 補氣劑이면서 靈藥으로 여겨졌다³⁾.

산삼의 한의학적 표기 용어인 인삼은 補五臟, 安精神, 除邪氣, 久服輕身延年 등의 효능⁴⁾이 있어 한방에서는 중요한 약재로 사용되고 있으나 산삼이나 산양산삼은 희소성이나 고가 등으로 인하여 대중화 되지 못하고 있는 실정이다.

그동안 산삼이나 산양산삼과 관련한 연구로는 김 등⁵⁾의 항암 효과, 윤 등⁶⁾의 비만 예방 등과 권 등⁷⁾의 유전자 분석을 이용한 감별 연구가 있었고, 산양삼을 이용한 연구로는 약침과 관련한 독성, 안전성 실험과 시험관 내 시험, 인삼

※ 교신저자 : 권기록, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교 부속 한방병원 침구과
(Tel: 033-741-9257 FAX: 033-730-0653 E-mail: beevenom@paran.com)

※ This research was supported by Sangji University Research Fund, 2006

과 산양삼의 효능 비교, 혈당 강하 및 항암효과 등이 보고⁸⁻¹³⁾된 바 있다.

국내에서는 비만의 치료와 관련하여 단미제¹⁴⁻¹⁵⁾ 복합방¹⁶⁻¹⁹⁾의 한약을 이용한 약물요법이나 이침²⁰⁾, 전침²¹⁾, 약침²²⁻²³⁾ 등의 연구가 이루어지고 있으나 국소부위의 비만 치료에 대한 연구는 응답과 우황에 대한 연구가 보고²⁴⁾된 바 있다.

이에 저자는 산양삼삼 추출물이 국소 비만 치료제로 적절함을 알아보하고자 rat의 지방 전구세포를 이용하여 지방세포의 분화능 억제효과를 관찰하여 유의한 결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗 材料

1) 산양삼삼 추출물의 조제

실험에 사용한 산양삼삼은 수령 10년 근으로 충남 서천의 천방농산 영농조합에서 구하였다. 실험에 이용된 40g의 시료들을 원적외선으로 건조한 후 90%의 alcohol을 이용하여 extract를 추출하여 동결 건조한 결과 2.0g의 extract를 얻어 5.0%의 수율을 나타내었다. 산삼추출물의 조제 농도는 10mg/ml, 1mg/ml, 그리고 0.1mg/ml로 다양하게 하여 농도별 효능을 평가하고자 하였다.

2) 動物

(1) Rat의 구입

체중 200-250g의 수컷 Sprague-Dawley rat(대한바이오링크, 한국)을 20±2℃의 실험실 환경에서 수분과 식이를 2주간 충분히 공급하여 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

(2) Rat로부터 지방전구세포의 분리 및 배양

Rat 지방세포의 분리 및 배양은 Negrel과 Dani의 방법²⁵⁾을 수정한 Snyder 등²⁶⁾의 방법에 따라 실시하였다.

수컷 Sprague-Dawley(200-250 g) rat로부터 정소상체 지방조직을 제거하고 잘게 절단한 다음, collagenase (3mg/ml)와 BSA (20mg/ml)가 포함된 DMEM 배양액을 이용하여 37℃에서 1시간 동안 분해시켰다. 분해된 조직액을 250 μM 여과 메쉬를 통해 여과시키고 250

g에서 8분간 원심 분리하여 전 지방세포(pre-adipocyte)를 침전시켰다. 두 차례 세척을 한 다음, 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 전지방세포를 현탁시켰다. Hemocytometer를 사용하여 세포수를 측정하고, 24-well plate에 30,000 세포수/cm² 되도록 세포를 분주하여 CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포가 confluence에 도달한 것을 확인한 후(3days), insulin (0.17μM), triiodothyronine (2nM), isobutylmethylxanthine (200μM) 및 dexamethasone (50nM)이 포함된 분화배지로 교체하여 배양하였다. 3일간 분화배지에서 배양한 다음, insulin (0.17μM)과 triiodothyronine (2nM)만 포함된 배양액으로 교체하여 9-11일간 배양하였다. 세포배양액은 2일 간격으로 교체하였다.

(3) Rat로부터 성숙지방세포의 분리 및 배양

Rat 성숙 지방세포의 분리 및 배양은 Rodbell 방법²⁷⁾을 수정한 Zalatan 등²⁸⁾의 방법에 따라 실시하였다. 먼저 수컷 Sprague-Dawley (200-250g) rat로부터 정소상체 지방조직을 제거하고 잘게 절단한 다음, collagenase (1mg/ml)와 BSA (10mg/ml)가 포함된 Krebs-Ringer 용액을 이용하여 37℃에서 1시간 분해시켰다. 분해된 조직액을 250 μM 여과 메쉬를 통해 여과시키고 250g에서 10분간 원심 분리하여 전지방세포(pre-adipocyte)를 침전시켰다. 상등액에 위치한 지방 세포층을 수거하여 두 차례 세척을 한 다음, 지방세포수를 측정하였다. 50ml conical tube에 5 × 10⁵ 세포 수/ml이 되도록 분주한 다음 37℃ shaking incubator에서 3시간 동안 배양하였다.

III. 結果

1. 지방세포의 분화에 미치는 영향

1) 미분화 지방세포(preadipocyte)의 배양

수컷 Sprague-Dawley rat에서 얻은 정소상체로부터 분리한 미분화 지방세포(preadipocyte)를 배양한 결과 배양 12일째에 성숙된 지방세포가 형성됨을 알 수 있었다(Fig. 1, A-B). 지방세포의 형성을 확인하기 위하여 세포질 내에 축적된 triglyceride(중성지방)를 염색하는 시약인 oil red O를 이용하여 세포 염색을 시행한 결과 성숙 지방세포의 형성이 잘 되었음을 알 수 있었다(Fig. 1, C-D).

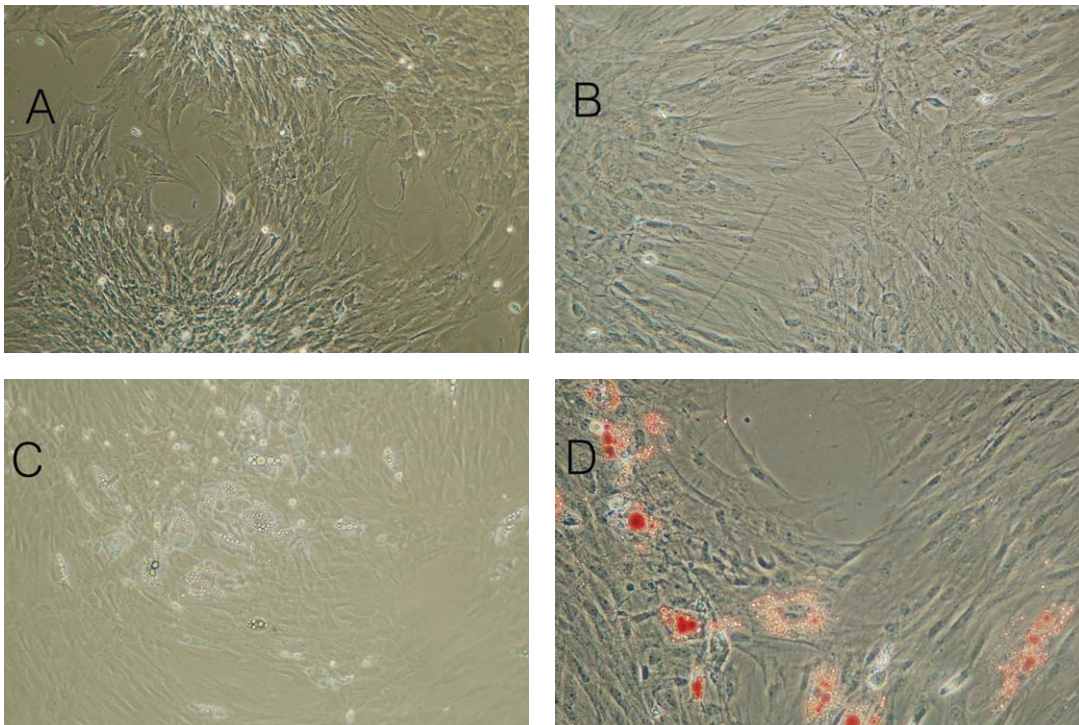


Fig. 1 Light microscopy of Preadipocyte and adipocyte image
 (A) not progressed differentiation(x100)
 (B) Preadipocyte dyed oil red O staining(x100)
 (C) Adipocyte progressed differentiation(x100)
 (D) Adipocyte dyed oil red O staining(x100)

2) 농도별 산양산삼 추출물이 지방세포의 분화에 미치는 영향

산양산삼 추출물을 각각 10.0mg/ml, 1.0mg/ml, 그리고 0.1mg/ml의 농도로 하여 지방전구세포의 분화 전 단계에서 배지에 처리한 후 농도별로 지방세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하였다.

그 결과 10.0mg/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 지방세포의 분화를 억제하는 것이 뚜렷하게 나타났으나 1.0mg/ml, 그리고 0.1mg/ml의 농도에서는 현저한 차이를 나타내지 못하고 비교적 광범위한 지방세포의 형성을 나타내는 것으로 관찰되었다(Fig. 2, A-C).

Oil red O를 이용하여 세포 염색을 시행한 결과 역시 10.0mg/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 지방세포의 분화를 현저히 억제하였으나, 완전한 억제를 나타내고 있지는 않았고, 1.0mg/ml, 그리고 0.1mg/ml의 농도에서 지방세포의 분화 억제가 뚜렷하게 나타내지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2, D-F).

이상의 결과를 바탕으로 산양산삼 추출물은 고농도에서 지방세포의 분화 이전에 억제 작용을 하지만 저농도에서는 억제작용을 나타내지 못하는 것을 알 수 있었다.

IV. 考 察

인삼(panax ginseng C. A. Meyer)은 그 기원에 따라 인위적인 도움 없이 자연 발아하여 성장한 산삼과 천연산삼의 종자나 어린뿌리, 혹은 인삼의 종자를 산림 중에 파종하여 키운 산양 산삼, 그리고 논이나 밭에 인삼의 씨를 파종하여 재배한 인삼으로 나눌 수 있다.

자연산 산삼은 인삼에 비하여 효과가 우수하다고 알려져 있으나 구하기가 힘들고 고가이며, 품질에 대한 객관적 검증방법이 확보되지 않아 학문적 연구나 임상적 사용에는 어려움이 많은 것이 현실이다. 이에 대한 대안으로 최근 국내 한의학계에서도 산양산삼에 대한 관심이 많아지

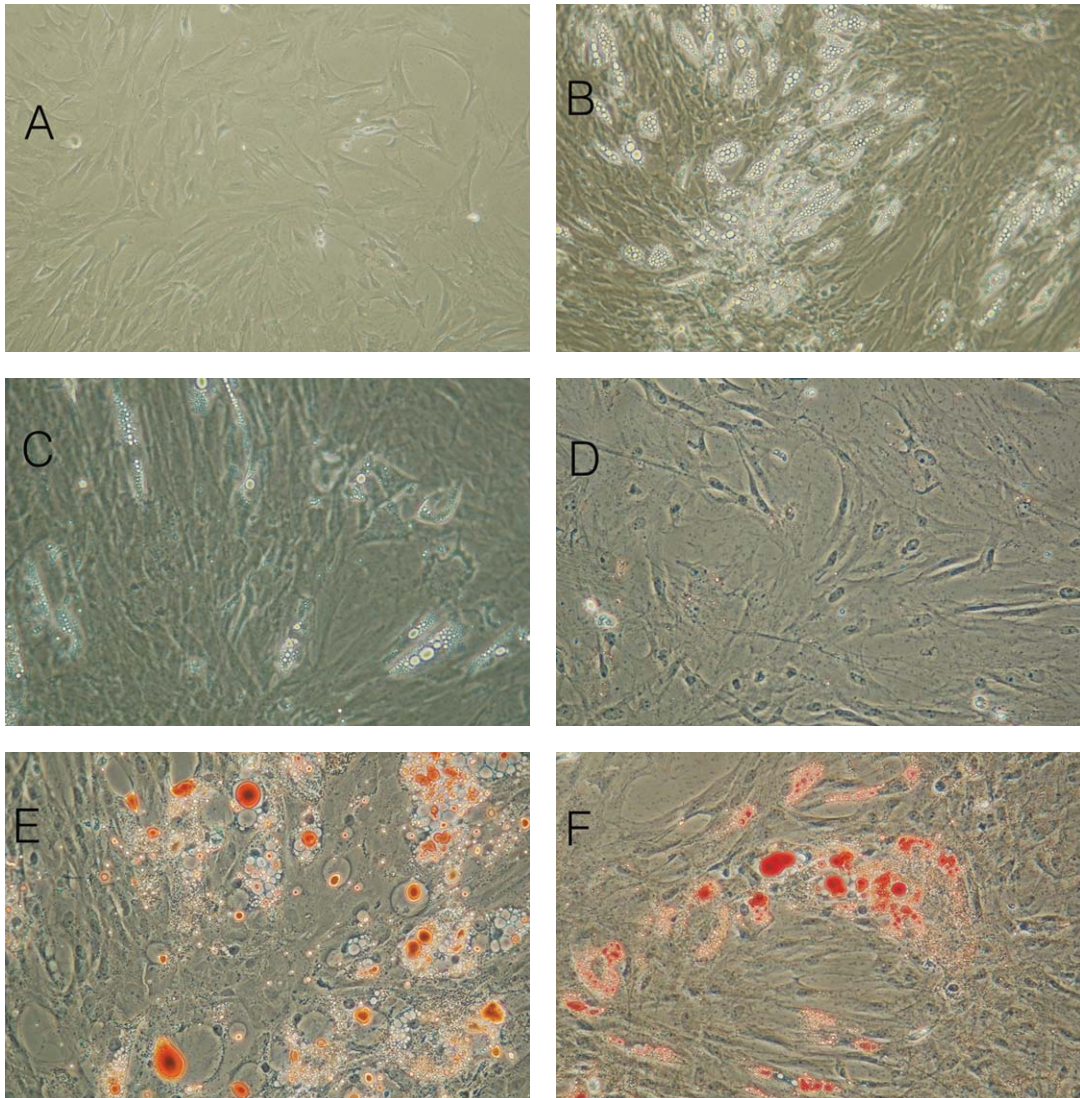


Fig. 2 The suppressed effects of cultivated wild ginseng extract to the preadipocyte differentiation. Preadipocyte differentiation was suppressed depend on concentration ($\times 100$)
(A) 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cultivated wild ginseng extract to the preadipocyte
(B) 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cultivated wild ginseng extract to the preadipocyte
(C) 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cultivated wild ginseng extract to the preadipocyte
(D) Oil red O staining to the 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cultivated wild ginseng extract treated adipocyte
(E) Oil red O staining to the 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cultivated wild ginseng extract treated adipocyte
(F) Oil red O staining to the 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cultivated wild ginseng extract treated adipocyte

고 연구 보고도 비교적 활발하게 이루어지고 있다⁵⁻¹³⁾.

비만은 사회, 문화, 경제적인 특성에 의하여 약간의 차이를 나타낼 수 있지만 최근에는 질병의 한 부분으로 인식하기 시작하였다. 이러한 배경에는 사람이 비만에 의해 생존기간이 현저히 줄어든다는 임상적 증거와 체중감량이

질병의 위험도를 줄인다는 역학적 연구 결과, 비만 치료에 대한 특이적인 약물의 발견과 개발, 그리고 비만 유전자의 발견 등이 있다²⁵⁾.

실제 많은 연구 결과를 바탕으로 비만이 생리적 기능을 저하시킬 뿐만 아니라 뇌졸중, 동맥경화, 심근경색 등의

심·혈관계질환이나 당뇨, 간경변증 등 만성질환의 빈도를 증가시키고, 퇴행성 관절염, 전립선 질환, 유방암 등의 발병 위험도를 높이는 데 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾.

특히 외모에 대한 미의 기준이 사회적 현상으로 특징지어질 정도로 사람을 평가하는 기준으로 중요하게 작용하고 있고, 비만 체형을 가진 사람들의 정신적 우울증이나 자신감 결여 등은 자아 상실이나 자살 등의 극단적 사회병리로 작용할 수 있다³¹⁾. 또한 외모지상주의와 웰빙 열풍으로 인하여 현재 다이어트 시장은 매년 40% 이상 성장하고 있고³²⁾, 이에 대한 시대적 요구를 외면하기에는 너무나 큰 시장을 형성하고 있는 것이 사실이다.

한의학에서는 비만을 膏粱厚味, 先天稟賦, 久臥久坐, 外感, 內傷 등으로 인한 氣虛, 氣滯, 濕痰, 血瘀 등에 의해 발생되는 것으로 생각되어져 왔다³³⁾.

또한 비만의 원인을 穀氣勝元氣³⁴⁾, 脾胃俱旺, 脾胃俱虛, 脾因邪勝³⁵⁾, 痰飲, 氣虛 膏粱厚味^{36,37)} 등으로 보고 있고, 補氣健脾, 祛濕化痰 등의 치료법이 이용되며³⁸⁾, 東醫寶鑑에서도 肥不及瘦라 하여³⁹⁾ 건강한 생활을 영위하는데 있어 비만은 바람직하지 않음을 제시하고 있다.

비만의 치료를 위하여 현재 제시되고 있는 방법은 식이요법, 운동요법, 약물요법, 수술요법, 행동교정요법 등^{32,40)}이 있고, 국내에서도 한약¹⁴⁻¹⁹⁾이나 이침²⁰⁾, 전침²¹⁾, 약침^{22,23)} 등을 이용하여 비만을 치료하는 연구가 이루어지고 있으나 국소부위의 비만 치료를 위한 한의학적인 연구는 최근 시도되고 있는 실정이다²⁴⁾.

이에 저자는 국소비만 치료제 개발의 일환으로 대표적인 보기제인 산양산삼이 비만치료제로 가능성을 알아보기 위하여 Rat의 지방 전구세포를 이용하여 지방세포의 분화능 억제효과를 시도하였다.

Rat의 정소상체 지방조직에서 성숙세포를 제거하고 전 지방세포(pre-adipocyte)를 추출하여 배양한 결과 정상적인 성장이 이루어짐을 확인할 수 있었다(Fig. 1, A-F).

전 지방세포에서 지방세포로 분화되는 과정에서 산양산삼 에탄올 추출물을 각각 10.0mg/ml, 1.0mg/ml, 그리고 0.1mg/ml의 농도로 나누어 지방전구세포의 분화 전 단계에서 배지에 처리한 후 농도별로 지방세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하였다.

그 결과 10.0mg/ml의 농도에서 지방세포의 분화를 억제하였고, 1.0mg/ml와 0.1mg/ml의 농도에서는 아무 처치도 하지 않은 정상군에 비하여 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2, A-C).

Oil red O를 이용하여 세포 염색을 시행한 결과 역시 10.0mg/ml에서는 지방세포의 분화 양상이 정상군에 비하여 현저히 억제되었음을 확인할 수 있었으나 1.0mg/ml와 0.1mg/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 큰 차이를 나타내지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2, D-F).

이상의 결과를 바탕으로 산양산삼 추출물은 10.0mg/ml의 고농도에서 지방세포의 분화를 억제하는 효과가 있었고 1.0mg/ml 이하의 저농도에서는 유의한 효능을 관찰할 수 없음을 알 수 있었다.

V. 結論

산양산삼 추출물이 국소 비만 치료제로서의 사용이 가능한가를 알아보고자 rat의 정소상체 지방조직에서 전 지방세포(pre-adipocyte)를 추출하여 지방세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 산양산삼 추출물은 고농도(10.0mg/ml)에서 지방세포의 분화를 억제하였다.
2. Oil red O 염색을 시행하여 산양산삼 추출물의 지방세포의 분화 억제효능을 관찰한 결과 고농도(10.0 mg/ml)에서만 정상군에 비하여 유의한 억제를 나타내었고 저농도에서는 유의한 변화를 관찰할 수 없었다.

이상의 결과를 바탕으로 산양산삼 추출물을 비만치료의 목적으로 사용하기 위해서는 고농도로 사용해야 함을 알 수 있었다. 향후 다양한 추출방법을 이용하여 산양산삼 추출물에 대한 다각적 연구가 병행되어야 할 필요가 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 김수진, 신정아, 윤영숙, 박혜순. 과제중 환자에서 간단한 환자교육이 지방분포 및 생활습관에 미치는 영향. 가정의학회지. 2002; 23(6): 769-778.
2. 신순식, 김경철, 최영현, 이용태, 엄현섭, 김창식. 산삼 감정 기준의 객관성. 한의학연구소 동의 한의연제 5집. 2001; 107-114.
3. 전국한의학대학교 본초학교수 공편저. 본초학. 영림사. 1994; 531.

4. 중약대사전 편찬위원회. 완역중약대사전. 정담. 1997; (7): 3473-3479.
5. 김성진, 신순식, 서부일, 지선영. 산삼, 장뇌삼, 인삼의 항암효과 비교연구. 대한본초학회지. 2004; 19(2): 41-50.
6. Se Na Yun, Sang Jung Moon, Sung Kwon Ko, Byung Ok Im, Sung Hyun Chung. Wild Ginseng Prevents the Onset of High-Fat Diet Induced Hyperglycemia and Obesity in ICR mice. Arch Pharm Res. 2004; 27(7): 790-796.
7. Ki-Rok Kwon, Jung-Chul Seo. Genetical Identification of Korean Wild Ginseng and American Wild Ginseng by using Pyrosequencing Method. Kor. J. Herbology. 2004; 19(4): 45-50.
8. 권기록, 조아라, 이선구. 정맥주입용 산양산삼 증류약침의 급성, 아급성 독성 실험 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구. 대한약침학회지. 2003; 6(2): 7-27.
9. 조희철, 이선구, 권기록. 농도별 산양산삼 증류약침의 apoptosis에 관한 실험적 연구. 대한약침학회지. 2004; 7(2): 1-15.
10. 곡경승, 이선구, 권기록. pH 및 전해질 조절 산양산삼 증류약침의 apoptosis에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 2004; 21(6): 1-17.
11. 권기록. 정맥주입용 산삼약침이 인체에 미치는 영향에 관한 임상적 연구. 대한약침학회지. 2004; 7(1): 15-26.
12. Ki-Rok Kwon, Chi-Wan Park, Min-Soo Ra, Chong-Kwan Cho. Clinical Observation of Multiple Metastatic Cancer Patient with Hepatocellular Carcinoma treated with Cultivated Wild Ginseng Herbal Acupuncture Therapy, J. of Korean Acupuncture & Moxibustion Society, 2005; 22(2): 211-217.
13. 권기록, 윤휘철, 김호연. B16/F10 세포를 이식한 C57/BL6 생쥐에서 산삼약침의 항암효과 및 Doxorubicin에 의한 생식독성 완화효과. 대한침구학회지. 2006; 23(1): 105-120.
14. 성태수, 손규목, 배만중, 최정. 오가피의 열수추출액이 고지방식이에 의한 비만유도 흰쥐의 지방축적에 미치는 영향. 한국영양식량학회지. 1992; 21(1): 9-12.
15. 신미경, 한성희. 서목태추출물이 고지방 및 고콜레스테롤 식이 급여 흰쥐의 혈청 지질에 미치는 영향. 한국식생활문화학회지. 1998; 27(5): 940-944.
16. 권미원, 김일한, 박은정, 강병기. 조위승청탕과 배수혈 침구요법을 통한 비만 환자 66례의 임상적 보고. 대한한방소아과학회지. 2001; 15(2): 43-51.
17. 신동준, 김달래, 김선형. 태음조위탕과 마황이 비만 백서의 leptin에 미치는 영향. 사상의학회지. 1999; 13(1): 79-87.
18. 서동민, 이상훈, 이재동. 비만 환자에 대한 조위승청탕의 효과 및 부작용에 관한 임상적 관찰. 대한침구학회지. 2005; 22(3): 145-153.
19. 장진택, 서일복, 김정범. 가미마행감석탕 및 포황이 비만유도백서의 체중 및 지질대사에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003; 17(1): 190-202.
20. 박상용, 이병렬. 비만치료에 대한 침구 및 약물치료의 임상적 연구. 대전대학교 한의학연구소 한의학 논문집. 1994; 2(2): 163-185.
21. 정선희, 남상수, 김용석, 이재동, 최도영 외. 비만환자의 전침치료 임상례. 대한침구학회지. 1999; 13(1): 79-87.
22. 주준성, 윤대환, 나창수, 조명래, 채우석. 풍릉·양릉천에 대한 약침이 고지방식으로 유발된 비만 백서에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2004; 21(2): 131-152.
23. 박원필, 권기록, 이은. 산양산삼약침이 고지방식에 의한 당뇨병 유발 흰쥐에 미치는 영향. 대한약침학회지. 2005; 8(2): 97-108.
24. 조희철, 이시형, 신조영, 김강산, 조남근, 권기록, 임태진. 웅담과 우황약침이 지방세포 대사에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007; 24(4): 125-142.
25. Negrel, R. and Dani, C. Culture of adipose precursor cells and cells of clonal lines from animal white adipose tissue. In Adipose Tissue Protocols. G. Ailhaud (ed). Humana Press, Inc., Totowa, NJ. 2001; 225-237.
26. Snyder, P.B., Esselstyn, J.M., Loughney, K., Wolda, S.L. and Florio, V.A. 2005. The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in the regulation of adipocyte lipolysis. J. Lipid Res. 46:494-503.

27. Rodbell, M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 1964; 239: 375-380.
28. Zalatan, F., Krause, J.A. and Blask, D.E. Inhibition of isoproterenol-induced lipolysis in rat inguinal adipocytes in vitro by physiological melatonin via a receptor-mediated mechanism.
29. Mcalindon TE, Wilson PW, Aliabada P, Weissman B, Felson DT. Level of physical activity and the risk of radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in the elderly: The Framingham study. *Am J Med.* 1999; 106: 151-157.
30. 김도한. 도시 노인의 가족지지와 정신건강과의 관계 연구. *노인복지학.* 2001; 11: 11-13.
31. 임인숙. 다이어트의 사회문화적 환경: 여대생의 외모차별 경험과 대중매체의 몸 이미지 수용도를 중심으로. *한국사회학.* 2004; 38(2): 165-187.
32. 강재현. 비만의 약물요법. *대한의사협회지.* 1999; 478: 1106-1117.
33. 한방재활의학과학회. *한방재활의학과학.* 서울 : 군자출판사. 2003 : 343-354.
34. 郭靄春 編著. 黃帝內經靈樞校注語釋. 天津科學技術出版社. 1989; 63, 289.
35. 龔廷賢. 萬病回春(上). 杏林書院. 1982; 220.
36. 李梴. 編註醫學入門(外集券1). 성보사. 1984; 323.
37. 張介賓. 類經. 성보사. 1982; 586.
38. 中醫研究院註譯. 中醫症狀鑑別診斷學. 人民衛生出版社. 1987; 43
39. 許浚. 東醫寶鑑. 南山堂. 1985; 72.