

오미자 추출물의 지방세포 분화 억제 효과

박선영 · 황홍연 · 서은아¹ · 권강범 · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 벽성대학교 발효식품과

Inhibition Effects of *Galla Chinenisis* Extract on Adipocyte Differentiation in OP9 Cells

Sun Young Park, Hong Yeon Hwang, Eun A Seo¹, Kang Beom Kwon, Do Gon Ryu*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
1: Department of Fermented Food, Byuksung College

Obesity is associated with numerous diseases such as type 2 diabetes, hypertension and cancer. Inhibition of adipogenesis is a effective strategy to anti-obesity. In this study, *Galla Chinenisis* extract (GCE) inhibited adipocyte differentiation in OP9 cells. There was no cytotoxicity when cells were treated with GCE in designated time intervals, unaffected by concentration. In this cell model, increases in fat storage were inhibited by 2 days treatment with various concentration of GCE, visualized by Oil red-O, BODIPY and DAPI staining. To understand the underlying mechanism at the molecular level, the effects of GCE were examined on the expression of the genes involved in adipogenesis by real-time PCR. In the progress of adipocyte differentiation with GCE-treated, the mRNA level of adipogenic genes such as peroxisome-proliferator-activated receptors gamma (PPAR γ), computer-assisted axial tomography/enhancer binding protein-alpha (C/EBP α) were decreased. Also, GCE treatment inhibited increase of mRNA expression, which is adipogenic factor such as fatty acid synthase (FAS), hormone-sensitive lipase (HSL), lipoprotein lipase (LPL), and adipocyte-specific lipid binding protein (aP2). Therefore, the result of this study suggest that *Galla Chinenisis* extract can prevent adipocyte differentiation and GCE may have a great potential as a novel anti-adipogenic agent.

Key words : *Galla Chinenisis*, OP9 cells, Adipocyte differentiation, Peroxisome-proliferator-activated receptors gamma, Computer-assisted axial tomography/enhancer binding protein-alpha, Fatty acid synthase, Hormone sensitive lipase, Lipoprotein lipase, Adipocyte P2

서 론

지질대사는 우리 몸 에너지의 저장 및 분배, 당대사 조절, 에너지 항상성을 유지하는데 필요하며, 지질대사에 이상이 생기면 비만, 당뇨, 고지혈증 등의 증상이 나타나는 원인이 될 수 있다. 이러한 지질대사는 주로 간과 지방조직에서 일어나며, 지방조직에서는 조직을 구성하는 지방세포에 의해 조절 된다^{1,3)}. 지방세포는 체내 대사에 있어 중요한 기관의 하나로, 단순한 에너지 저장 기관이 아니라 여러 가지 호르몬을 분비하는 내분비기관이기도 하며, 대사과정에서 능동적인 작용을 하는 장기이다^{4,5)}. 지방세포

는 지방세포내의 중성지방(triglyceride) 양이 증가하거나 지방세포의 수가 늘어나 비만을 유도하게 된다⁶⁾. 따라서 비만을 예방 및 치료함에 있어서 지방 축적을 감소시키고 지방세포의 수를 줄이는 방안을 찾아내야 한다. 또한 지방세포는 지방전구세포(preadipocyte)가 분화되어 만들어지므로 지방세포 형성(adipogenesis)의 기전 연구 또한 지방조직의 역할을 이해하는데 매우 중요하다¹⁻³⁾. 최근 지방조직을 구성하는 지방세포의 분화와 조절기관에 대한 분자생물학적 연구가 광범위하게 진행되고 있다⁷⁾.

한의학적 관점에서 볼 때, 비만에 대해서 고대 한의학 문헌에서는, “肥, 肥胖, 肥人, 肉人, 肥貴人”등⁸⁾의 범주에 속하며, 黃帝內經에서는 膏粱厚味와 甘味の 음식을 많이 먹어서 생긴다 하였고⁹⁾, 이후 여러 문헌에서는 先天稟賦, 飲食失調, 久臥久坐, 內傷七情등의 원인으로 濕, 痰, 氣虛, 氣滯 및 瘀血 등이 비만을 유

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6846

· 접수 : 2012/07/30 · 수정 : 2012/08/10 · 채택 : 2012/08/16

발한다고 기록되어 있다. 治法으로는 補氣健脾, 化濕利水, 祛痰, 通腑消導, 活血通絡 등이 활용되고 있다¹⁰⁻¹⁴⁾.

오미자는 율나무과(Anacardiaceae:漆樹科)에 속한 落葉 혹은 小喬木인 붉나무(*Rhus Chinensis* MILL.)의 잎날개에 오미자 진드기가 刺傷을 주어 생긴 벌레집으로, 커다란 주머니처럼 생겼고 속이 텅 비었으며, 문합(文蛤), 백충창(白蟲倉)이라고도 한다. 중국에서는 염부목(*Rhus chinensis* Mill.:鹽膚木), 청부양(*Rhus potaninii* Maxim.:靑麩楊), 홍부양(*Rhus punjabensis* var. *sinica*(Diels) Rehd. et Wils.:紅麩楊)을 말한다. 味는 酸澁으로 수렴성이 있고, 性은 寒無毒하며 生津液, 潤肺, 降火, 化痰, 止瀉의 효능이 있다^{15,16)}. 그동안 오미자에 대해서 향균¹⁷⁻²¹⁾, 단백질 합성²²⁾, 간 보호^{23,24)}, 항염증²⁵⁾, 항산화²⁶⁾, 항혈전²⁷⁾, 항알러지²⁸⁾ 등의 효과에 관한 연구가 이루어졌지만 오미자 추출물을 이용하여 지방세포에 대한 작용과 항비만 활성효과에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

본 연구에서는 오미자 추출물이 지방세포 분화와 관련이 있는지, 또한 그 작용기전을 확인하기 위해 OP9 지방전구세포를 이용한 지방세포의 분화 과정을 관찰하였으며, 오미자 추출물의 세포독성과 지방세포 내 지방 축적량을 조사하고 지방합성과 관련된 유전자의 발현 상태를 조사하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 약재

본 실험에 사용한 오미자는 2009년 10월 익산시 신용동 소재 대한한약국에서 구입하였으며, 형태학적 평가를 통하여 동정하였고 표본시료 (NNMBS051)는 천연물신약표준화소재은행(원광대학교 약학대학 약학과)에 보관하였다. 오배자 70% 에탄올 추출물의 비수용성 분획물(NNMBS51)은 천연물신약표준화소재은행에 보관하고 있다.

2. 시약

세포배양에 사용된 세포배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, 세포배양액인 MEM- α , FBS(Fetal bovin serum), 항생제 등은 GIBCO사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Insulin, Dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, EZ-CyTox Assay(Daeil Lab Service Co., Ltd, Seoul, Korea), Oil red-O solution(Sigma, O0625), DMSO(Sigma, Lot#84596) 제품을 사용하였다.

3. OP9 세포배양

OP9 세포주는 미국 세포주 은행(American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA; catalog no. CRL-2749)에서 구입해서 사용하였으며, 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 함유한 MEM- α 배지에서 37°C와 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.

4. 오배자 추출물 분리

오미자 50 g을 70% 에탄올 수용액 300 ml 로 2시간 동안 가열 환류추출하고 여과한 다음 여액을 감압 농축하여 오미자의 70% 에탄올추출물 10.64 g을 얻었다. 얻어진 오미자 70% 에탄올추출물에 증류수 100 ml를 넣고 교반하여 현탁 시킨 후, 24시간 동안 실온에서 방치하고, 3000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 침전물을 취함으로써 오미자 70% 에탄올추출물의 비수용성 분획물 (NNMBS51) 3.29 g을 제조하였다.

5. OP9 지방세포 분화유도

OP9 세포를 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 MEM- α 배지에서 배양한 후, confluent 한 상태가 되면 분화를 유도하였다. 분화 시작 시점을 Day-0 이라 볼 때, 10% FBS, 175 nM insulin, 0.25 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 함유한 MEM- α 배지로 배양했다. 2일 후 10% FBS, 175 nM insulin, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 함유한 MEM- α 배지로 바꿔준 후 3일 동안 배양하였다. 분화를 시키지 않는 그룹은 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 MEM- α 배지로 동일하게 바꿔준다. 오미자 추출물은 Day-0에서 5 μ g, 20 μ g, 50 μ g/ml 농도로 처리해 준다.

6. 세포독성시험(EZ-CyTox Assay)

오미자 추출물의 지방세포에 대한 세포독성여부를 확인하기 위하여 EZ-CyTox 용액(Daeil Lab Service Co., Ltd, Seoul, Korea)을 이용하였다. 1.5×10^4 cells/ml의 OP9 세포를 96-well plate에 배양한 후 다양한 농도의 오미자 추출물을 처리한 후 배양하였다. 오미자 추출물을 정해진 시간 노출 시킨 뒤 10 μ l의 EZ-CyTox 용액(Daeil Lab Service Co., Ltd, Seoul, Korea)을 각 well에 첨가한 후, 37°C에서 3시간 배양하여 microplate spectrophotometer (Molecular Device, USA)로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

7. Oil Red-O staining

오미자 추출물이 OP9 지방전구세포의 분화를 억제하는지 여부를 확인하기 위하여 Oil red-O 염색법을 이용하였다. 4.5×10^5 cells/ml OP9 세포를 6-well plate에 배양한 후, 다양한 농도(5, 20 and 50 μ g/ml)의 오미자 추출물을 처리한 후, 지방세포로 분화를 유도하였다. 분화가 최종적으로 완료된 후, 세포를 3.7% formalin으로 30분간 고정시킨 후, 60% isopropanol로 1번 세척한다. 1 ml Oil red-O solution(Sigma, O0625)을 첨가한 후, 60분간 염색시킨 후, 3차 증류수를 이용하여 3번 세척하고 건조시킨 후, 현미경(Olympus IX70 model)을 이용하여 200배율로 촬영하였다. 염료의 추출을 위해서는 100% isopropanol로 세포 내 축적된 lipid를 염색한 Oil red-O solution를 추출하여 microplate spectrophotometer로 510 nm 파장에서 흡광도를 측

정하였다.

8. BODIPY 및 DAPI staining

4.5×10^5 cells/ml의 OP9 세포를 6-well plate에 배양한 후, 다양한 농도(5, 20 and 50 $\mu\text{g/ml}$)의 오미자 추출물을 처리한 후, 지방세포로 분화를 유도하였다. 5일간 분화를 유도한 후 세포를 3% paraformaldehyde로 30분간 상온에서 고정시킨 후, phosphate buffered saline(PBS)로 3번 세척하였다. 30 nM DAPI(Sigma, D8417)와 1 $\mu\text{g/ml}$ BODIPY(Invitrogen, D2191) 용액을 첨가한 후, 세포배양기에서 60분간 노출시킨 후, 현미경(Olympus IX70 model)을 이용하여 200배율로 각각 파란색, 녹색 형광 파장을 이용하여 촬영하였다.

9. Total RNA 분리 및 cDNA 합성

분화가 끝난 OP9 세포로부터 total RNA의 분리는 Trizol reagent (Life Technologies, UK)를 이용하여 제조사가 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 6-well culture dish에서 배양된 4.5×10^5 cells/ml 세포를 PBS로 세척한 후 1.5 ml tube에 옮겨 3,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 수거하였다. 상층액을 제거한 세포 침전물은 500 μl Trizol reagent로 용해시킨 후, 50 μl chloroform을 첨가하여 얼음 속에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. 위 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 섞은 후, 얼음에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하고 침전물을 80% EtOH로 세척하였다. 세척된 RNA를 건조시킨 후 DEPC가 처리된 20 μl 로 녹이고 분광광도계에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

10. 실시간 역전사 효소 증합반응 (Real Time PCR)

역전사 반응 (reverse transcription reaction)은 3-5 μg total RNA와 reverse transcriptase (MMLV; GIBCO, BRL)를 이용하여 제조사에서 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 역전사 반응은 total RNA (3-5 μg), oligo d(T)12-18 (1 μg), 2 μl dNTP (10 mM), MMLV reverse transcriptase (200 U), DTT (10 mM), RNase inhibitor (1 μl ; Promega, USA), 20 μl 완충용액 (50 mM Tris-Cl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2)에 함유된 반응액으로 42°C에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 실시간 증합효소 연쇄반응은 10배 희석한 cDNA에 taq 증합효소가 포함된 2X SYBR-Green 완충용액 (Roche Diagnostics Ltd, UK)를 반응시켜 LightCycler rapid thermal cycler system (Roche)을 이용하여 수행하였다. 요약하면, reaction mixture를 10분 동안 95°C에서 반응시킨 후, denaturation (95°C, 10초), annealing (58°C for FAS, HSL, LPL, aP2, PPAR γ , C/EBP α or 60°C for GAPDH, 5초), elongation (72°C, 10초)의 조건에서 45 cycles을 수행하였다. 발현된 각각 유전자의 mRNA 양은 LightCycler System software (Roche)를 이용하여 GAPDH에 대한 상대적인 양으로서 계산하였다. 실험에 사용된 FAS, HSL, LPL, aP2, PPAR γ , C/EBP α , GAPDH의 primer 염기 서열은 Table 1에 표기하였다.

11. 통계처리

실험 결과는 mean \pm S.E.M으로 표시하였으며 유의성의 검정은 One-Way Anova test (Microcal Origin; version6.0; Microsoft; USA)에 의하였으며 $p < 0.05$ 인 것만 유의한 것으로 하였다.

Table 1. Sequences and Accession Numbers for Primer, Forward and Reverse, Used in Real-Time PCR

Gene	Sequence for Primers	Accession no.
GAPDH	Forward: CGTCCCGTAGACAAATGGT Reverse: TTGATGGCAACAATCTCCAC	NM_008084
FAS	Forward: TGATGTGGAACACAGCAAGG Reverse: GGCTGTGGTGACTCTTAGTGATAA	NM_007988
aP2	Forward: AGCCTTTCTCACCTGGAAGA Reverse: TTGTGGCAAGGCCACTC	NM_024406
HSL	Forward: GGAGCACTACAAACGCAACGA Reverse: TCGGCCACCGGTAAAGAG	NM_010719
LPL	Forward: GGACGGTAACGGGAATGTATGA Reverse: TGACATTGGAGTCAGGTCTCTCT	NM_008509
PPAR γ	Forward: GAAAGACAACGGACAAATCACC Reverse: GGGGGTGATATGTTTGAACCTTG	NM_011146
C/EBP α	Forward: TTGTTTGGCTTTATCTCGGC Reverse: CCAAGAAGTCGGTGGACAAG	NM_007678

결 과

1. 오미자의 세포 독성 효과

오미자 추출물의 지방세포 분화에 대한 실험을 위하여 적절한 농도를 구하고자 5, 20, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 OP9 세포에 24, 48, 72, 96시간 처리한 후, 세포독성을 조사하였다. 오미자 추출물의 농도증가에 따른 OP9 세포의 세포생존율은 변화가 나타나지 않았다(Fig. 1). 오미자 추출물에 대한 OP9세포의 세포 독성을 나타내지 않아 5, 20, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 지방세포 분화에 대한 효과를 조사하였다(Fig. 1).

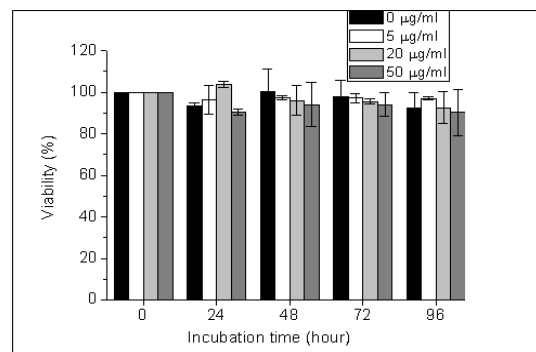


Fig. 1. Effects of *Galla Chinenisis* Extract on cell viability in OP9 cells. Cells were treated with various concentration of GCE in designated time intervals. The cell viability was evaluated by EZ-CyTox assay as described in materials and methods. Values are mean \pm SD of three replicates.

2. 오미자의 지방세포 분화에 대한 효과

오미자 추출물이 OP9 지방전구세포의 분화를 억제하는지 여부를 확인하기 위하여 5, 20, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 OP9 세포에 처리한 후, 세포내 축적된 지방(lipid droplet)의 양을 측정하였다. 지방세포로 분화가 끝난 OP9 세포를 지방전구세포 분화에서 형성되는 중성지방을 특이적으로 염색시키는 Oil red-O 염색법

을 이용하여 지방의 축적 정도를 조사하였다. 5일 동안 분화가 끝난 후, 대조군은 세포 내 지방 축적 정도가 증가하였으나 오미자 추출물을 처리한 군은 지방 축적이 감소하여 지방세포의 분화를 억제하였다. 세포 내 염색된 Oil red-O 염료의 양을 isopropanol로 용해한 후, 측정된 결과 5, 20, 50 µg/ml 오미자 추출물을 처리한 군은 대조군(100%)에 비하여 각각 27.7%, 48.7%, 63.7%로 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

지방세포 분화에 대한 오미자 추출물의 억제효과를 세포 내 지방에 특이적인 반응을 나타내는 BODIPY 염료를 이용하여 재 조사하고, 동시에 핵에 특이적으로 반응하는 DAPI 염료를 이용하여 조사한 결과 Fig. 2와 유사하게 지방세포 분화를 억제하였다(Fig. 3).

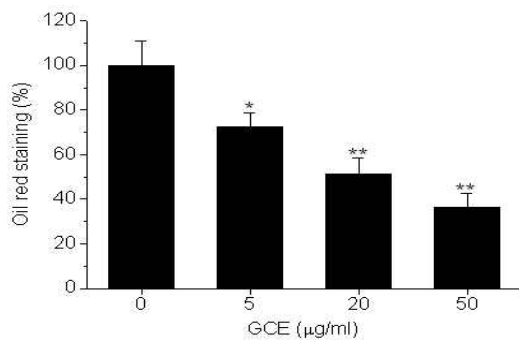


Fig. 2. Effects of *Galla Chinensis* Extract (GCE) on adipocyte differentiation in OP9 cells. Cells were incubated with various concentration of GCE for 2 days. For OP9 cells differentiation into adipocyte, Cells were cultured in MEM- α medium containing 175 nM insulin, 0.25 µM dexamethasone and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine for 2 days, and then in MEM- α medium containing 175 nM insulin for 3 days. The Oil red-O stain were accomplished as described in materials and methods. Values are mean \pm SD of three replicates. Significance: * p <0.05 and ** p <0.01 vs control group.

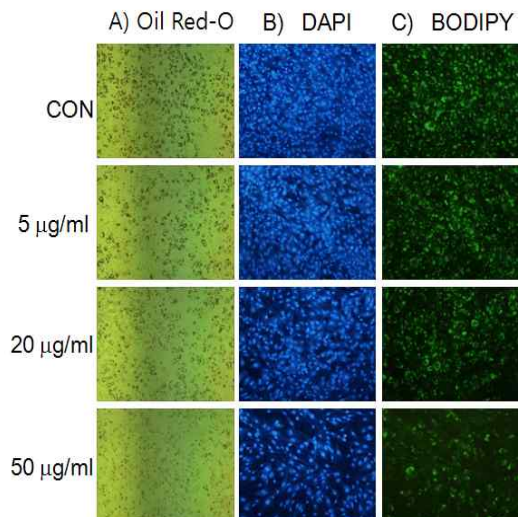


Fig. 3. Inhibition effects of *Galla Chinensis* Extract (GCE) on adipocyte differentiation. Cells were incubated with various concentration of GCE for 2 days. For OP9 cells differentiation into adipocyte, Cells were cultured in MEM- α medium containing 175 nM insulin, 0.25 µM dexamethasone and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine for 2 days, and then in MEM- α medium containing 175 nM insulin for 3 days. The Oil red-O(A), DAPI(B) and BODIPY(C) stain were accomplished as described in materials and methods.

3. 오미자의 PPAR γ , C/EBP α 발현에 미치는 영향

지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 과정은 많은 종류의 adipogenic transcription factor들의 단계적인 조절에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다. 오미자 추출물이 지방세포 분화를 조절하는 전사 인자로 알려진 PPAR γ , C/EBP α mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 분화가 끝난 OP9 세포를 수집하여 total RNA를 분리하여 cDNA합성 후, 실시간 연쇄 효소 증합 반응을 이용하여 mRNA 발현 정도를 조사하였다.

대조군에서는 지방세포로 분화한 지 2일, 3일, 4일째 PPAR γ mRNA 양이 각각 1.7배, 3.7배, 4.5배 증가하였으나 오미자 추출물을 처리한 군에서는 각각 0.6배, 1.3배, 2.4배로 억제되었다. 또한 C/EBP α mRNA 발현양도 대조군에서는 지방세포로 분화한 지 2일, 3일, 4일째 각각 2.2배, 3.6배, 5.5배 증가하였으나, 오미자 추출물을 처리한 군은 1.1배, 1.3배, 2.3배로 억제되었다(Fig. 4).

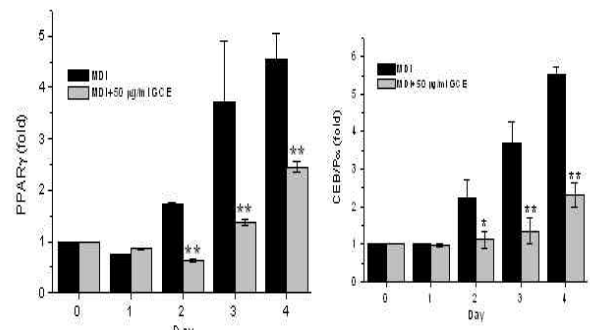


Fig. 4. Effects of *Galla Chinensis* Extract (GCE) on PPAR γ and C/EBP α expression in OP9 cells. Differentiation conditions are same as Fig. 2 legends. PPAR γ and C/EBP α mRNA expression levels were measured by real time PCR as described in Materials and Methods. Significance: * p <0.05 and ** p <0.01 vs GCE non-treated group.

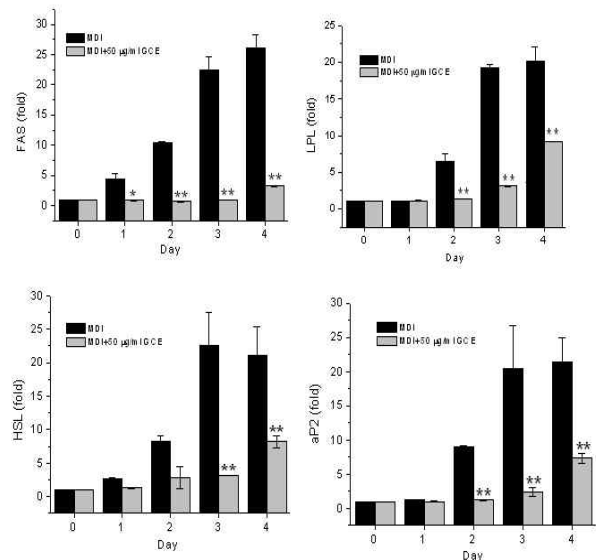


Fig. 5. Effects of *Galla Chinensis* Extract (GCE) on adipogenic factors expression in OP9 cells. Differentiation conditions are same as Fig. 2 legends. FAS, HSL, LPL, aP2 mRNA expression levels were measured by real time PCR as described in Materials and Methods. Significance: * p <0.05 and ** p <0.01 vs GCE non-treated group.

4. 오미자의 지방세포 분화 관련 유전자의 발현에 미치는 영향
오미자 추출물이 지방세포 분화와 관련된 유전자인 FAS, HSL, LPL, aP2 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 분화가 끝난 OP9 세포를 수집하여 total RNA를 분리하여 cDNA합성 후, 실시간 연쇄 효소 증합반응을 이용하여 각 유전자의 mRNA 발현 정도를 조사하였다. FAS, HSL mRNA의 경우 대조군에서 분화한지 4일째 대조군에 비하여 각각 10.4배, 22.4배, 26배 증가하였으나, 오미자 추출물을 처리한 군에서는 각각 0.6배, 0.9배, 3.2배로 억제되었으며, LPL, aP2 mRNA의 발현양도 오미자 추출물을 처리한 군에서는 발현의 증가가 나타나지 않았다(Fig. 5).

고 찰

산업화, 기계화 이후 서양에서는 눈부신 경제 발전과 노동력의 절감에 기인하여 비만이 꾸준히 증가되는 추세이며 우리나라에서도 산업화에 힘입어 비만인구가 꾸준히 늘어서 최근 심각한 건강상의 문제로 대두되고 있다²⁹⁾. 비만은 그 자체로도 질병이 되지만 고혈압, 심질환, 뇌졸중, 지방간, 동맥경화증, 죽상경화증, 당뇨병, 통풍, 간질, 담낭질환, Pickwick 증후군 등의 합병증³⁰⁾을 일으켜 현대 성인병의 중요한 원인이 되고, 심리적으로 외모에 대해 수치심, 혐오감을 가지게 되어 심리적 위축, 우울증까지도 야기 시킨다³¹⁾. 이러한 비만 치료를 위한 특허청 자료 중에서 비만 치료제의 작용기전별 출원동향을 살펴보면 지방 등의 소화 흡수 저해제(24%), 지방세포분화 저해제(12%), 호르몬 조절제(10%), 열 대사 촉진제(4%), 식욕 억제제(3%), 지방산 생성 억제제(2%), 혈관 신생 억제제(2%)등, 생명공학기술의 발전을 통해 규명되고 있는 다양한 비만 발생 기전을 활용하여 새로운 비만 치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있음을 알 수 있다³²⁾. 지금까지 외국에서 개발되어 시판되고 있는 비만치료제의 대부분은 화학적으로 제조된 의약품으로 사용되고 있으나 지방변, 오심, 구토, 두통, 변비, 불면증, 위장장애등의 부작용이 발생할 수 있다고 보고된 바 있다^{33,34)}. 그러므로 체중조절 효과를 나타내며 부작용이 거의 없는 한약재를 이용하여 비만치료제를 개발하기 위한 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

한의학 문헌을 통하여 비만의 원인과 병리를 고찰해 보면 <素問 通評虛實論>¹⁰⁾에서 "肥貴人, 高粱之疾也"라 하여서, 膏粱珍味가 원인이 됨을 언급하였으며, 朱震亨³⁵⁾는 "肥人氣虛生痰 寒生濕 濕生痰 故 肥多寒濕"이라하여 寒濕을, 張¹¹⁾은 "肥人多氣虛也 ... 故肥人多氣虛之症 然肥人多濕多滯多有不利"라 하여 氣虛와 濕滯를, 劉³⁶⁾는 "血實氣虛即肥...所以肥人能寒不能熱...由寒則傷血"이라 하여 肥人和 氣虛, 寒과의 관계를, 李³⁷⁾는 "脾胃久實 則能食而肥 脾胃久虛 則不能食而瘦 或小食而肥, 雖肥而四肢不舉, 蓋脾胃實而邪氣盛也"라 하여서 비만과 脾胃와의 관계를 언급하였다. 李³⁸⁾는 "人肥必氣結而肺盛, 肺金克肝木, 故痰盛"이라 하여 肥人和 痰과의 관계를, 傅³⁹⁾는 "婦人有身體肥胖, 痰涎甚多 ... 肥胖者 多氣虛 氣虛者 多痰涎"이라 하여 부인의 비만과 痰涎의 관계를 살펴보았다.

이를 정리하여 보면 비만의 원인은 過食膏粱珍味, 先天稟賦,

脾胃俱虛, 氣虛, 氣結, 痰盛, 內熱로 요약할 수 있고, 그 외에도 濕, 內傷七情의 원인이 있다⁴⁰⁾.

한의학적인 비만의 치료법을 살펴보면, 王⁴¹⁾은 利濕去痰, 健脾胃, 塗^{42,43)} 등은 化濕, 祛痰, 利水, 通腑, 消導, 疏肝利膽, 健脾, 溫陽의 八法을 사용하였고 우리나라의 趙⁴⁴⁾등은 비만의 證候를 痰濕內蘊型和 氣虛型의 두 가지로 분류하여 치료를 시도하였으며, 金⁴⁵⁾등은 肥滿의 治法을 補氣健脾, 化濕利水去痰, 通腑消導, 活血通絡 등의 治法을, 趙⁴⁶⁾등은 虛證인 경우에는 健脾, 益氣, 補腎, 溫陽, 養陰하는 治法을 주로 응용하고, 實證인 경우에는 祛濕(化濕), 化痰(去痰), 利水, 消導, 活血化癥, 通腑하는 治法을 사용하였다.

본 연구에서 오미자 추출물을 OP9 지방전구세포로 분화하는 단계에 처리하였을 경우 분화억제 효과와 그 기전을 확인하고자 하였다. 오미자 추출물을 5, 20, 50 µg/ml의 농도로 OP9 세포에 24, 48, 72, 96시간 처리하였을 때, 오미자 추출액의 농도와 처리시간에 따라 대조군에 비해 세포 독성을 나타내지 않아 각 농도에서의 지방세포 분화에 대한 효과를 조사하였으며, 지방에 특이 반응을 나타내는 Oil red-O 염료를 이용하여 얻은 결과에서 오미자 추출물은 지방의 축적량을 현저하게 감소시켰고, BODIPY 염료와 DAPI 염료를 이용하여 조사한 결과에서도 지방세포의 분화가 유의하게 억제되었다.

전구지방세포에서 형태학적, 생화학적으로 완전히 성숙된 지방세포로의 분화는 호르몬, cytokine 그리고 전사인자 등의 여러 인자들의 상호작용에 의해 일어나는 복잡한 과정이다³⁾. 전구지방세포가 adipogenetic signal을 받으면 전사인자 cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine (CCAAT)/enhancer binding proteins (C/EBPα, C/EBPβ 및 C/EBPδ)의 발현이 유도되고, 이들이 adipogenesis의 주요 조절자인 peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPARγ)의 발현을 유도하여 분화를 진행시키는 것으로 알려져 있다⁴⁷⁾. 분화과정 초기에서 발현되는 C/EBPβ는 초기에는 발현이 증가되었다가 말기에는 점점 감소하며, C/EBPα와 PPARγ의 발현을 활성화시키는 기능도 있다⁴⁸⁾. PPARγ는 adipogenesis의 주요 조절자로서 fatty acid synthase (FAS) 및 adipocyte-specific lipid binding protein (aP2)등의 adipogenetic gene들의 발현을 조절한다⁴⁹⁾.

오미자 추출물이 adipogenic transcription factor들의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 mRNA 및 단백질 발현량에서 확인하였으며, 지방세포 분화를 조절하는 전사 인자로 알려진 PPARγ, C/EBPα mRNA의 경우, 대조군에서는 지방세포로 분화한지 3일, 4일째에 PPARγ, C/EBPα, mRNA 발현이 모두 현저하게 증가하였으나 오미자 추출물을 처리한 군에서는 유의하게 억제되었다. 이러한 결과는 오미자 추출물의 지방세포 분화 억제 효과가 지방의 합성 과정을 억제함으로써 이루어짐을 보여주고 있다. 또한 지방세포 분화와 관련된 유전자인 FAS, HSL, LPL, aP2 mRNA의 경우, 분화한지 3일, 4일째에 대조군에서 큰 폭으로 증가하였으나 오미자 추출물을 처리한 군에서는 발현이 현저하게 억제되었다.

이상을 종합해 볼 때 오미자 추출물이 지방세포 분화과정에서 adipogenic transcription factor인 PPAR γ , C/EBP α 와 그 표적 유전자인 FAS, HSL, LPL, aP2 mRNA의 발현을 억제함으로써 지방세포의 분화와 지방조직 내의 지방 축적을 억제하는 것으로 생각된다. 오미자 추출물이 지방세포 분화억제에 높은 활성을 나타내는 천연소재로 사료되어지며, 본 연구를 기반으로 임상에서 비만 환자를 대상으로 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다. 이를 통해 오미자 추출물이 항비만 제제 개발의 후보 물질이 될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

오미자 추출물이 OP9 세포에서 지방세포 분화기전에 미치는 영향을 분자생물학적 방법을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

오미자 추출물은 지방세포 분화과정에서 농도 및 시간에 따른 세포독성을 나타내지 않았다. 오미자 추출물은 지방세포 분화과정에서 농도에 따라 축적되는 지방의 양을 유의하게 감소시키고, 지방세포 분화를 유의하게 억제하였다. 오미자 추출물은 지방세포 분화과정에서 지방세포분화 조절인자인 PPAR γ , C/EBP α 의 mRNA의 발현을 유의하게 억제하였다. 오미자 추출물은 지방세포 분화과정에서 지방분화 관련 유전자인 FAS, HSL, LPL, aP2 mRNA의 발현을 유의하게 억제하였다.

이상의 결과에서 오미자 추출물이 지방세포 분화억제에 높은 활성을 나타내는 천연소재로 사료되어지며, 본 연구를 기반으로 다각적인 연구가 이루어져 향후 비만 치료에 유용하게 사용될 수 있기를 기대한다.

감사의 글

이 논문은 2012년 원광대학교 교내연구비 지원을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

- MacDougald, O.A., Lane, M.D. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem.* 64: 345-373, 1995.
- Trujillo, M.E., Scherer, P.E. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev.* 27(7):762-778, 2006.
- Gregoire, F.M., Smas, C.M., Sul, H.S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 78(3):783-809, 1998.
- 김재우. 대사질환의 연구와 지방세포의 분화. *생화학분자생물학뉴스(구-생화학뉴스)* 30(4):36-45, 2010.
- Otto, T.C., Lane M.D., Adipose development from stem cell to adipocyte. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40: 229-242, 2005.
- 이재성, 이성현. 한방치료의 체지방 및 복부비만 감소효과. *대한한방비만학회지* 1(1):33-42, 2001.
- Bray GA:Handbook of obesity, Mercel Dekker Inc. New York, 1998.
- 中醫研究院 主編. 中醫症狀鑑別診斷學. 北京, 人民衛生出版社, p 43, 1987.
- 馬元臺, 張隱庵. 黃帝內經素門. 서울, 정보사, pp 224-330, 1975.
- 洪元植. 精校黃帝內經. 서울, 동양의학연구원출판부, p 61, 94, 219, 220, 275, 1991.
- 張介賓. 景岳全書. 上海. 上海科學技術出版社, p 194, 1984.
- 劉河間. 宣明放論. 卷十. 서울, 녹강출판사, p 768, 1984.
- 李挺. 編註醫學入門. 서울, 대성문화사, p 108, 1984.
- 허수영. 비만의 동서의학적 고찰과 치료. *대한한방재활의학회지* 7(1):272-286, 1997.
- 전국 한의과 대학 본초학 교수 共編著. 本草學. 서울, 영림사, pp 620-622, 2000.
- 당종해 원저. 권건혁 譯. 국역 본초문답. 서울, 반룡, p 126, 2003.
- 장준복, 이경섭, 안병기. 음호병의 외용약으로 응용되는 오배자, 애엽, 고삼, 측숙 및 황백의 향균과 소염효과. *대한한의학회지* 14(2):270-280, 1993.
- 이영근, 김용균, 최영환, 김근기. 비브리오패균에 대한 오배자 메탄올 추출물의 향균 효과. *農業技術開發研究所報.* 3(3):201-204, 1993.
- 부용출, 김정순, 전체옥. 오배자의 향균성분. *韓國農化學會誌* 36(3):58, 1993.
- 김윤영. 오배자 추출물을 이용한 면직물의 향균가공에 관한 연구. *경북대학교 산업대학원 학위논문*, pp 49-51, 2004.
- 최혜승. 오배자 추출물의 어병세균에 대한 향균력 및 어류에 대한 생리반응. *부경대학교 해양산업공학과 대학원 학위논문*, pp 1-121, 2004.
- 김천중, 안영민, 안세영, 두호경. 八味地黃丸 및 오미자 추출물이 뼈모유사세포와 치주인대섬유모세포의 증식, alkaline phosphatase의 활성 및 단백질 합성능에 미치는 影響. *대한한의학회지* 24(3):35-44, 2003.
- 이승배. 오배자의 항산화 및 간보호 효과. *상지대학교 축산학과 대학원 학위논문*, pp 1-73, 2000.
- 차배친, 임태진, 이광희, 이승배. 오배자 성분이 항산화 및 간보호 효과. *韓國藥用作物學會誌* 8(2):157-164, 2000.
- 하영애. 오배자(오미자)에서 추출한 물질에 의한 세포보호와 염증억제 효과에 관한 연구. *원광대학교 화학과 대학원 학위논문*, pp 1-46, 2008.
- 김태철. 오미자(Rhus japonica Linne) Methanol 추출물의 항산화효과에 관하여. *경북대학교 식품공학과 대학원 학위논문*, pp 1-31, 1991.
- 송규영, 박병준, 김성훈, 오배자의 항혈전 효과. *생약학회지* 33(2):120-123, 2002.

28. Kim, S.H., Park, H.H., Lee, S., Jun, C.D., Choi, B.J., Kim, S.Y., Kim, S.H., Kim, D.K., Park, J.S., Chas, B.S., Shin, T.Y., The anti-anaphylactic effect of the gall of *Rhus javanica* is mediated through inhibition of histamin release and inflammatory cytokine secretion. *Int Immunopharmacol.* 5(13-14):1820-1829, 2005.
29. 김창민 외. 중약대사전. 서울, 정담출판사, pp 2319-2327, 1998.
30. 이정복. 장수학. 서울, 과학백과사전출판사, pp 455-456, 439-442, 456, 1987.
31. 강정원 등. 10대 여학생들의 우울성향과 체중의 관계. 가정의 학회지, pp 15-640, 1994.
32. Korean Intellectual Property Office, 2008.
33. 박용우. 체중조절에 사용되는 건강기능식품의 근거중심 처방. 가정의학회지 24(5):409-415, 2003.
34. 박철영. 비만의 최신 약물치료제. 경희의학, 18(2):77-85, 2002.
35. 朱震亨. 丹溪心法(上). 서울,大成出版社, p 66, 67, 70, 156, 1982.
36. 劉河濶. 劉河濶傷寒三十六書. 서울, 成輔社, pp 273-285, 1976.
37. 李東垣. 東垣醫書十種. 脾胃論, 서울, 대성문화사, p 70, 1993.
38. 李仲梓. 醫宗必讀. 서울, 대남종합출판사, p 120, 210, 1976.
39. 傅青主, 葉天士. 新編傅青主男女科·葉天士女科. 서울, 大星文化社, p 106, 193, 1984.
40. 전국한의학대학교재활의학교실. 동의재활의학과학, 서울, 서원당, pp 570-571, 1995.
41. 王光權. 減肥法初探. 浙江省, 浙江中醫雜誌, p 128, 1985.
42. 塗建中. 肥滿症的中醫藥治 近況. 上海, 上海中醫雜誌, p 33, 1989.
43. 江幼李. 肥滿的中醫治療. 北京. 北京中醫學院學報, p 26, 1985.
44. 陳貴廷, 楊思澍. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京, 中國醫藥科技出版社, pp 682-689, 1991.
45. 金貞娟, 宋勇善. 肥滿에 대한 東西醫學의 考察. 來醫物理療法科學會誌 3(1):299-314, 1993.
46. 趙洪健, 金炳卓. 肥滿症의 原因과 病機 및 治法에 關한 文獻的 考察. 大田大論文集. 1(2):61-71, 1992.
47. Camp, H.S., Ren, D., Leff, T. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine.* 8(9):442-447, 2002.
48. Long, S.D., Pekala, P.H, Lipid mediators of insulin resistance: ceramide signalling down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical Journal.* 319: 179-184, 1996.
49. Hwang, C.S., Lotus, T.M., Mandrup, S., Lane, M.D. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annual review of cell and developmental biology.* 13: 231-259, 1997.