

보중치습탕이 3T3-L1 지방전구세포의 분화 및 지방생성 억제에 미치는 영향

이수정 · 김원일 · 강경화^{1*}

동의대학교 한의과대학 비계내과학교실, 1: 동의대학교 한의과대학 생리학교실

Inhibitory Effects of Bojungchiseub-tang on Adipocyte Differentiation and Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes

Soo Jung Lee, Won IL Kim, Kyung Hwa Kang^{1*}

Department of Internal Medicine, 1: Department of Physiology, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

Bojungchiseub-tang (BJCST) has been used in symptoms and signs of edema, dampness-phlegm, kidney failure, and so on. BJCST is also expected to have strong anti-obesity activities. However, little is known about the mechanisms of its inhibitory effects on adipocyte differentiation and adipogenesis. In the present study, we examined the effects and mechanism of BJCST on transcription factors and adipogenic genes of 3T3-L1 preadipocytes to understand its inhibitory effects on adipocyte differentiation and adipogenesis. Our results showed that BJCST significantly inhibited differentiation and adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes in a dose-dependent manner. To elucidate the mechanism of the effects of BJCST on lowering lipid content in 3T3-L1 adipocytes, we examined whether BJCST modulate the expressions of transcription factors to induce adipogenesis and adipogenic genes related to regulate accumulation of lipids. As a result, the expression of steroid regulatory element-binding protein (SREBP)1, cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine (CCAAT)/enhancer binding proteins α (C/EBP α), C/EBP β , C/EBP δ , and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) genes, which induce the adipose differentiation, liver X receptor (LXR) α and fatty acid synthase (FAS) genes, which induce lipogenesis and adipose-specific aP2, Adipsin, lipoprotein lipase (LPL), CD36, TGF- β , leptin and adiponectin genes, which compose fat formation were decreased. BJCST also reduced the expression of acyl CoA oxidase (ACO) and uncoupling protein (UCP) genes related to lipid oxidation. In conclusion, BJCST could regulate transcript factor related to induction of adipose differentiation and inhibited the accumulation of lipids and expression of adipogenic genes.

Key words : Bojungchiseub-tang(BJCST), obesity, 3T3-L1 preadipocyte, adipocytes differentiation, adipogenic genes

서 론

비만이란 단순히 과잉체중의 상태를 말하는 것이 아니라 대사 장애로 인해 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 말한다. 즉 칼로리 섭취가 신체 활동과 성장에 필요한 에너지보다 초과되어 중성지방의 형태로 지방조직에 과잉 축적된 영향 불균형의 상태

* To whom correspondence should be addressed at : Kyung Hwa Kang,
Department of Physiology, College of Korean Medicine, Dong-eui
University, 52-57, Busanjin-gu, Busan, 614-851, Korea

· E-mail : ghkang@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7423

· Received : 2014/04/24 · Revised : 2014/05/26 · Accepted : 2014/06/12

를 비만증이라 한다¹⁾.

비만은 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 정상적인 지방세포의 이상발달이 일어난다. 지방세포로의 과잉분화와 지방세포 내 지방의 축적은 지방세포의 수나 크기를 증가시키고 그에 따라 비만 증상이 더욱 심해지는 것으로 알려져 있다^{2,3)}.

지방세포는 전구지방세포의 증식과 분화과정을 통해 성숙되어 형성되는데, 전구지방세포에서 형태학적으로나 생화학적으로 성숙된 지방세포로 분화되는 과정에는 인슐린 등을 포함한 호르몬 자극과 지방세포 유전자의 조절부위에 중요한 전사인자가 활성화되어야 한다⁴⁾. 그러므로 지방전구세포의 유전자 조절과 이와 관련된 전사인자의 활성을 조절하는 것이 비만의 조절에 중

요하다고 할 수 있다.

서양의학에서는 비만과 제2형 당뇨와 같은 질환에 대한 약물 치료 시 체지방의 감소를 목표로 Sibutramine, Orlistat, Rimonabant 등이 사용되고 있으나, 불면증, 두통, 구강 건조, 변비, 메스꺼움, 무른 변, 헛배 부름, 복부통증, 위염, 공황장애, 약몽과 같은 다양한 부작용이 보고되었다^{5,6)}.

한의학에서는脾胃의氣運이虛하여運化無力해져濕痰이 발생하고, 이로 인한水液代謝失調가 비만의 한 원인이 될 수 있다고 본다^{7,8)}. 보중치습탕은 “通治水病, 補中行濕”⁹⁾ 하여浮腫 치료에 사용하는 처방으로脾胃의運化機能 실조로 발생한 부종과 함께 체중이 증가한 비만증에도 응용해 볼 수 있다.

임상에서 보중치습탕을 복용한 환자들에게 부종의 감소와 함께 체중감량의 효과가 나타났고, 이러한 약물의 효과가 지방전구세포의 조절을 통한 비만조절과 관련이 있는지에 대한 검증의 필요가 있었다. 그러나 보중치습탕의 선행 연구로 김 등¹⁰⁾, 강 등¹¹⁾, 김 등¹²⁾의利尿作用에 의한腎不全 등腎臟 기능에 미치는 영향에 대한 연구와 조¹³⁾의肝 및腎臟의 손상에 미치는 영향에 관한 연구가 있었지만 비만과 지방세포에 미치는 영향에 관련된 연구는 찾기 어려웠다.

이에 저자는 보중치습탕의 지방세포 증식과 지방세포에서 분비되는 물질과 그 분화 기전 조절에 대하여 살펴보기 위하여, 3T3-L1 전구지방세포를 이용하여 지방세포 분화억제, 지방세포 분화 관련 전사인자와 유전자 발현조절에 관한 효과를 실험하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

3T3-L1 mouse preadipocytes는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였고, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), bovine calf serum (BCS), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin mixture 및 dimethylsulfoxide (DMSO)는 GibcoBRL (USA)로부터 구입하였다. Insulin, isobutylmethylxanthine (IBMX), dexamethasone (DEX), tetrazolium bromide salt (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), bovine serum albumin (BSA)는 Sigma (USA)로부터 구입하였다.

2. 시료의 준비

보중치습탕(Bojungchiseup-tang, BJCST)은 『東醫寶鑑』⁷⁾에 의거하여 한 첩의 분량은 Table 1과 같이 하였다. 약재들은 입춘 제약 (김해, 한국)에서 규격품을 구입, 정선하여 5첩 분량인 346 g을 증류수로 水洗하여 1.5 ℓ의 증류수를 가하여 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상청액을 분리하고, 0.2 μm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200 ml가 되도록 減壓濃縮하였다. 실온에서 냉각시킨 뒤 감압필터를 사용, 냉동 건조하여 33.4 g의 추출물을 획득하였다. 추출물은 -20℃에 보관하였다가 실험직전 PBS에 희석하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. The Composition of BJCST

Herbal name	Drug name	Produce Region	Dosage(g)
人蔘	<i>Ginseng Radix Alba</i>	Korea	20
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	China	20
蒼朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	China	14
陳皮	<i>Citri Unshii Pericarpium</i>	Korea	14
白茯苓	<i>Hoelen</i>	China	14
麥門冬	<i>Liriois Tuber</i>	Korea	14
木通	<i>Akebiae Caulis</i>	Korea	14
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	Korea	14
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	China	10
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>	China	6
升麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	China	6
Total amount(g)			346

3. 세포배양 및 분화

지방세포의 분화에 관한 실험의 경우, 3T3-L1 전구지방세포는 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 DMEM (10% FBS, 100 unit/ml of penicillin G sodium, 100 μg/ml of streptomycin sulfate)으로 배양하였다. 100% confluent 해졌을 때 0.5 mM IBMX, 1 μM DEX와 1 μg/ml insulin의 분화유도물질(MDI)이 포함된 DMEM으로 교환하여 2~3일 동안 분화를 유도하였으며, 그 후 매 2일 마다 1 μg/ml insulin이 포함된 DMEM으로 교환하였다. 분화 8일 후 세포는 분석을 위해 사용되었다. 실험군은 3T3-L1 전구지방세포에 분화유도를 하지 않은 미분화군, 3T3-L1 전구지방세포에 0.5 mM IBMX, 1 μM DEX와 1 μg/ml insulin을 처리하여 8일 동안 분화를 유도한 분화유도군(MDI), 3T3-L1 전구지방세포에 8일 동안 분화 유도와 補中治濕湯 추출물을 각각 4 mg/ml과 8 mg/ml의 농도로 처리한 군(BSCST)으로 나누었다(Fig. 1).

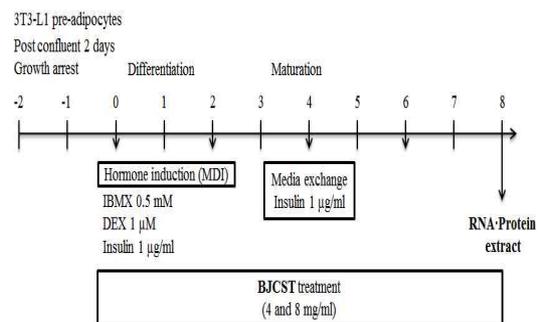


Fig. 1. The Experimental Scheme of Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. The 2-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes were treated with MDI (0.5 mM IBMX, 1 μM DEX and 1 μg/ml insulin) for 48 hrs. Cells were then replaced with maintenance media containing 1 μg/ml insulin every 2 days for 8 days. To investigate effect of BJCST on adipogenesis, the differentiating 3T3-L1 cells were treated every 2 days with BJCST for 8 days.

4. MTT Assay

3T3-L1 전구지방세포에 대한 생존율에 미치는 補中治濕湯의 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 시행하였다. 24 well plate (Corning, USA)에 5 × 10⁴ cells/well의 농도로 세포를 DMEM 배양액에 분주하여 24 시간동안 안정화시킨 후, BJCST를 농도별 (0, 1, 2, 4 및 8 mg/ml)로 처리하여 48 시간동안 반응시켰

다. 배양액을 제거한 후 5 mg/ml의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어준 후 최대 4 시간 37°C incubator에서 배양한 후 tetrazolium bromide salt를 제거하고 각 well에 DMSO를 100 µl 씩 분주하여 생성된 formazan이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 ELISA (Molecular Devices, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 control에 대한 %비율을 구하였으며, 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 편차를 구하였다.

5. Oil Red O 염색 및 정량

세포내 지방구 생성을 확인하기 위하여 Oil red O 염색을 실시하였다. 배양된 세포는 phosphate-buffered saline(PBS)으로 세척한 후 3.7% formalin으로 10 분간 고정하고 deionized water로 세척하여 Oil red O를 처리한 후 실온에서 30 분간 염색하였다. 그 후 염색액을 제거하고 deionized water로 3회 세척하여 염색된 세포를 microscopic image (Olympus, Japan)로 관찰하였다. 또한 정량을 위해 DMSO를 가하여 지방을 추출한 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. RNA 추출 및 RT-PCR

세포에 TRizol을 넣고 2분간 방치하였다가 세포를 떼어낸 후 chloroform을 넣고 10 초간 강하게 vortexing하고 4°C에서 14,000 rpm으로 15 분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들어준 후 실온에 10 분간 방치하였다. 그 후 4°C에서 14,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 75% ethanol을 넣고 섞어준 후 4°C에서 7,500 rpm으로 5 분간 원심분리하였다. RNA pellet은 10 분간 실온에서 건조시키고 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-DW에 녹여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 계산하였다. 각 1 mg의 RNA를 취하여 RT-PCR kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 45°C에서 30 분, 94°C에서 5 분간 반응시킨 후 94°C에서 30 초간 denaturation시키고, 55-62°C에서 30 초간 annealing시킨 다음, 72°C에서 1 분간 extension시키는 cycle을 30-35 회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72°C에서 5 분간 PCR machine (GeneAmp, PCR system 9700, USA)에서 수행하였다. 각 PCR products는 0.5×TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)를 사용하여 2% agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 30 분간 전기영동한 후 ethidium bromide 염색을 한 후 분석하였다. 각각의 primer는 Bioneer (Korea)에 의뢰하여 합성하였다(Table 2).

7. Protein 추출 및 Western blot

Cold PBS로 세척하여 수거한 세포에 protease cocktail을 첨가한 RIPA lysis buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl, 2.5% deoxycholic acid, 10% NP-40, 10 mM EDTA)를 첨가하여 매 5 분간 vortex하여 얼음에 30 분간 방치하였다. 그 후 12,000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 회수하여 단백질 양을 정량하였다. 각 lysate 50 µg을 취하여 SDS loading buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 200 mM β

-mercaptoethanol, 10% SDS, 0.2% (w/v) bromophenol blue)와 섞어 10% SDS(sodium dodecil sulfate)-polyacrylamide gel에 loading하여 150 V에서 1 시간 30 분 동안 전기영동하여 단백질을 분리시켰다. 분리된 단백질을 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Amersham, Little Chalfont, UK)에 1 시간 transfer시킨 후 10% skim milk가 첨가된 TBST(tris-buffered saline tween) buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20)로 실온에서 1 시간 blocking시킨 다음 1차 antibody PPARγ와 C/EBPα (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 1:500~1:2,000 희석하여 첨가한 이후 반응시켰다. TBST buffer로 3회 세척한 후 2차 antibody HRP-conjugated secondary antibody (1 : 1000 dilution)를 1 시간 이상 반응시켰다. TBST buffer로 3회 세척 후 ECL(enhanced chemiluminescent) detection kit (Amersham, Little Chalfont, UK)를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 현상하였다.

Table 2. The Primers for RT-PCR

Target gene	Oligonucleotide sequences (5' to 3' direction)	Target gene	Oligonucleotide sequences (5' to 3' direction)
SREBP-1	F AGCTCAAAGACCTGGTGGTG	Adipsin	F CTGCTGGACGAGCAGTGG
	R TCATGCCCTCCATAGACA CA		R GATGACACTCGGGTATAGACGC
C/EBPβ	F GTTTCGGGAGTTGATGCAATC	LPL	F GGCCAGATTCATCAACTG
	R AACAAACCCCGCAGGAACAT		R GCTCCAAGGCTGTACCCCTAAG
C/EBPδ	F GATCTGCACGGCCTGTTGTA	CD36	F TTGTACTATACTGTGGCTAAATGAGA
	R CTCCACTGCCACCTGTCA		R CTTGTGTTTTGAACATTTCTGCTT
PPARγ	F CGCTGATGCACTGCCTATGA	TGF-β	F ATGGAGCTGGTAAACGGAA
	R TGCGAGTGGTCTCCATCAC		R ACTGCTTCCCGAATGTCTGA
C/EBPα	F GTGTGCACGCTATGCTAAACCA	Adiponectin	F GGAGATGCAGGCTCTTCTTGGT
	R GCCGTTAGTGAAGAGTCTCAGTTTG		R TCCTGATACTGGTGTAGGTGAA
LXRα	F AGGAGTGTGCGACTTCGCAAA	Leptin	F CCAAAACCTCATCAAGACCA
	R CTCTTCTGCGCCTTCAGTTT		R CTCAAAGCCACACCTCTGT
FAS	F TGGTGGGTTTGGTGAATTGTC	ACO	F CGCCAGCTCTGAATCAAGAGA
	R GCTTGTCTGCTCTAACTGGAAGT		R ACTTCTTGTCTTCTCTGTG
αP2	F CCAATGAGCAAGTGCCAA GA	UPC2	F AACAGTTTACACCAAGG GC
	R GATGCCAGGCTCCAGGATAG		R AGCATGGTAAGGGCACAGTG
GAPDH	F CCACAGTCCATGCCATCAC		
	R TTCACCACCCTGTTGCTGTGA		

8. 통계분석

통계분석은 SPSS 12K for Windows 통계 프로그램 패키지를 사용하여 평균치 ± 표준편차로 나타내었고 유의수준은 p < 0.05로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 One way-ANOVA와 Dunnett's Multiple Comparison Test 검정을 실시하였다.

결 과

1. 지방세포 분화억제 효과

1) 지방전구세포 증식에 미치는 영향

3T3-L1 전구지방세포에 0, 1, 2, 4 및 8 mg/ml의 補中治濕湯을 48시간동안 처리하여 지방전구세포 증식에 미치는 영향에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 대조군에 비하여 1, 2, 4, 및 8 mg/ml의 補中治濕湯을 처리한 군에서 각각 112.10±6.97, 120.90±20.33, 123.90±16.51, 119.00±36.69%의 비율을 나타내어 補中治濕湯의 농도에 따라 세포의 증식이 저해되지 않았음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

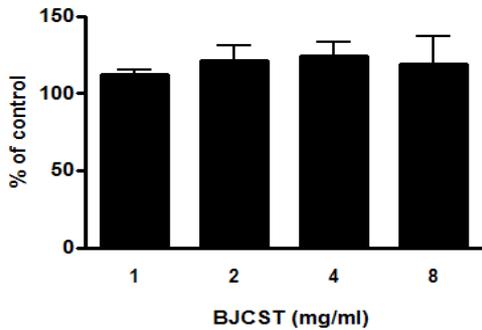


Fig. 2. Effects of BJCST on the Cell Viability in 3T3-L1 Cells. 3T3-L1 preadipocytes were treated with the indicated concentrations of BJCST for 48 hrs. Cell viability was evaluated using a colorimetric assay based on MTT assay. Values are means ± SD of three independent experiments.

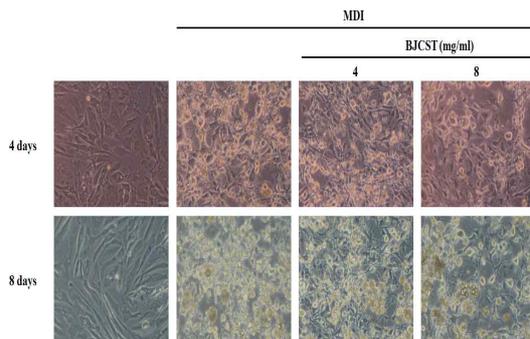


Fig. 3. Effects of BJCST on the Microscopic Morphological Changes of 3T3-L1. Preadipocytes Differentiation. The 2-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes(day 0) were treated with MDI (0.5 mM IBMX, 1 μM DEX and 1 μg/ml insulin) for 48 hrs in the absence or presence of indicated concentrations of BJCST. Cells were then replaced with maintenance media containing 1 μg/ml insulin and BJCST for every 2 days. Accumulated lipid droplets in adipocytes were observed 4 days and 8 days after the initiation of differentiation and morphological changes associated with adipogenesis were photographed using Inverted Microscope (Carl Zeiss, Germany).

2) 지방세포의 형태학적 변화에 미치는 영향

100% 가득 찬 3T3-L1을 2일 동안 분화를 유도하고 분화 양상을 현미경으로 관찰하여 세포 형태의 변화를 관찰한 결과, 전구지방세포의 세포밀도가 100% confluent된 세포형태는 길게 뻗은 섬유아세포의 형태를 보여주었으나, 지방세포로 분화 유도한 4일과 8일째 세포의 형태는 시간이 지남에 따라 세포 모양이 둥그러지고 세포질 내 지방구들이 점차 많이 형성됨을 현미경으로

관찰할 수 있었다. 반면 BJCST군은 농도에 의존적으로 세포내 지방구의 생성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

3) 지방세포내 중성지방 생성에 미치는 영향

Oil red O를 이용하여 세포 염색을 시행하여 지방세포의 형태를 관찰하고 세포내 중성지방의 양을 정량하였다. 관찰한 결과, 분화군에 비해 4 mg/ml과 8 mg/ml의 BJCST군에서 지방세포내 지방구의 형성이 억제되어 있는 것으로 관찰되었다. 또한 지방세포내 염색된 중성지방의 양을 정량한 결과, 미분화군의 흡광도는 0.05±0.01로 나타났으며, 분화군에서의 흡광도는 1.20±0.15로 나타났다. 4 mg/ml과 8 mg/ml BJCST군의 흡광도는 각각 0.61±0.21와 0.32±0.06으로 지방생성을 유의하게 억제하였다 (p<0.05)(Fig. 4).

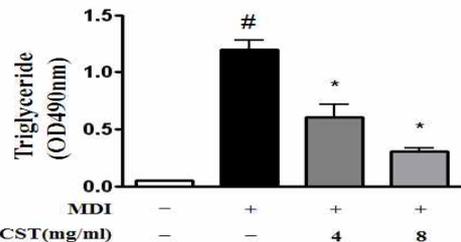
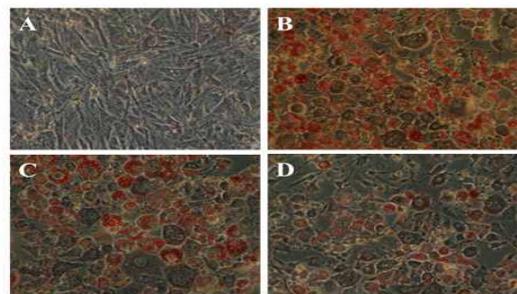


Fig. 4. Effects of BJCST on the Adipogenesis and Lipid Accumulation of 3T3-L1. Adipocytes. The 2-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were differentiated into adipocytes in the absence or presence of indicated concentrations of BJCST. Adipocytes were stained with Oil red O to determine the degree of adipocyte differentiation. Stained intracellular lipid was solubilized in isopropanol and absorbance was measured to evaluate lipid content. Values are means ± SD # p<0.05 vs. undifferentiated cells, * p<0.05 vs. control. (A) Undifferentiated cells, (B) Control with MDI to induce differentiation, (C and D) MDI and 4 mg/ml and 8 mg/ml of BJCST were treated.

2. 지방세포 분화 관련 전사인자 및 유전자 발현 조절 효과

1) 지방분화 초기 전사인자 발현에 미치는 영향

SREBP-1, C/EBPβ, C/EBPδ, C/EBPα와 PPARγ의 발현 양상을 살펴보면 SREBP-1, C/EBPβ, C/EBPδ, C/EBPα와 PPARγ mRNA는 분화군은 미분화군에 비하여 발현이 증가하였고, BJCST군은 분화군에 비해 농도 의존적으로 발현 감소를 보였다 (Fig. 5).

2) 지방합성 유전자 발현에 미치는 영향

LXRα와 FAS의 발현 양상을 살펴보면 LXRα와 FAS mRNA는 분화군은 미분화군에 비하여 발현이 증가하였고 BJCST군은 분화군에 비해 농도 의존적으로 발현 감소를 보였다(Fig. 5).

3) 지방세포 특이적 유전자 발현에 미치는 영향

aP2, Adipsin, LPL, CD36, TGF-β, Leptin, 그리고

Adiponectin의 발현 양상을 살펴보면 aP2, Adipsin, LPL, CD36, TGF- β , Leptin, 그리고 Adiponectin mRNA의 경우 분화군은 미분화군에 비하여 발현이 증가하였고 BJCST군은 분화군에 비해 농도 의존적으로 발현 감소를 보였다(Fig. 7).

4) 지방산화 관련 유전자의 발현에 미치는 영향

ACO와 UCP-2 mRNA의 경우 미분화군에 비해 분화군에서 발현 증가를 보였으며, BJCST군에서 분화군에 비해 발현 감소를 보였다(Fig. 8).

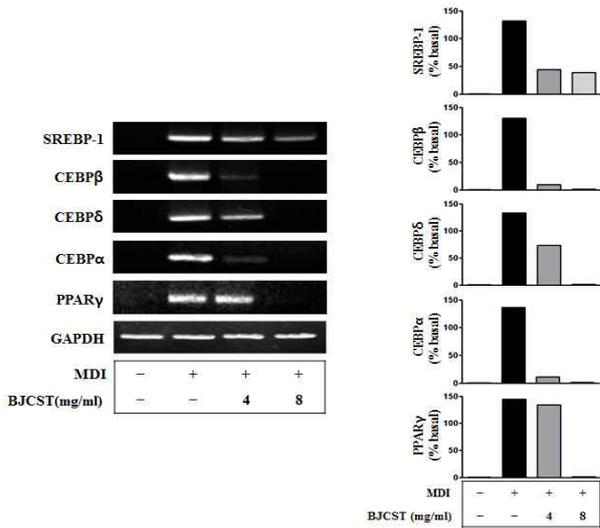


Fig. 5. Effects of BJCST on the Expression of SREBP-1, C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP α , and PPAR γ in mRNA Level. The 2-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were differentiated into adipocytes in the absence or presence of indicated concentrations of BJCST for 8 days. The mRNA levels were determined by RT-PCR as described in 'Material and Methods'.

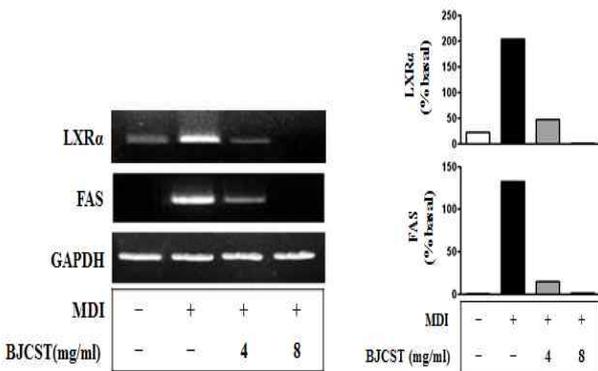


Fig. 6. Effects of BJCST on the Expression of LXR α and FAS in mRNA Level. The 2-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were differentiated into adipocytes in the absence or presence of indicated concentrations of BJCST for 8 days. The mRNA levels were determined by RT-PCR as described in 'Material and Methods'.

3. 지방세포 분화 전사인자 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현에 미치는 영향

지방세포 분화관련 주요 조절 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 전구지방세포의 분화자극 8일 후 C/EBP α 와 PPAR γ 의 단백질 발현을 관찰하였다. PPAR γ 단백질 발현은 분화군이 미분화군에 비하여 발현 증

가를 보였고, BJCST군은 분화군에 비해 농도 의존적으로 발현 감소를 보였으며, C/EBP α 단백질 발현은 분화군이 미분화군에 비하여 발현 증가를 보였고 BJCST군은 분화군에 비해 농도 의존적으로 발현 감소를 보였다(Fig. 9).

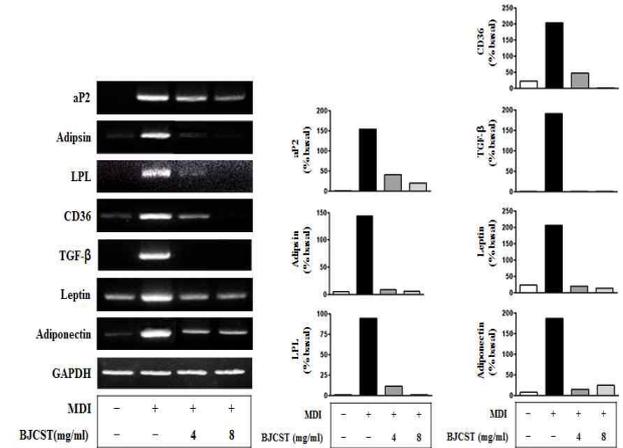


Fig. 7. Effects of BJCST on the Expression of aP2, Adipsin, LPL, CD36, TGF- β , Leptin and Adiponectin in mRNA Level. The 2-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were differentiated into adipocytes in the absence or presence of indicated concentrations of BJCST for 8 days. The mRNA levels were determined by RT-PCR as described in 'Material and Methods'.

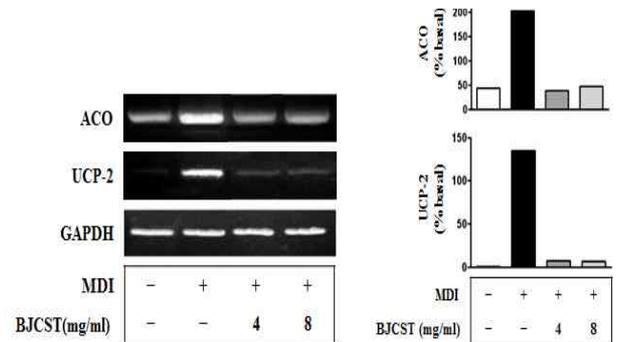


Fig. 8. Effects of BJCST on the Expression of ACO and UCP-2 in mRNA Level. The 2-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were differentiated into adipocytes in the absence or presence of indicated concentrations of BJCST for 8 days. The mRNA levels were determined by RT-PCR as described in 'Material and Methods'.

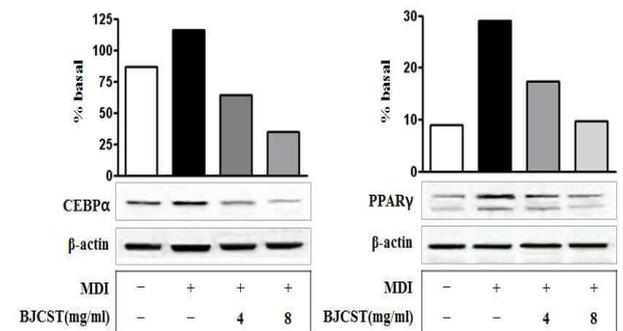


Fig. 9. Effects of BJCST on the Expression of C/EBP α and PPAR γ in Protein Level. The 2-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were differentiated into adipocytes in the absence or presence of indicated concentrations of BJCST for 8 days. The protein levels were determined by western blotting as described in 'Material and Methods'.

고찰

전 세계적으로 급증하고 있는 비만 인구나 그로 인한 대사성 질환의 발병률은 심각한 보건문제로 떠오르고 있다. 최근 WHO의 보고¹⁴⁾에 의하면 약 10억의 인구가 과체중이며, 그 중 한국인은 서구인에 비해 BMI(체질량지수)를 기준으로 한 비만도는 낮지만 당뇨, 대사질환 발병률은 상대적으로 높은 수준으로 나타나 비만 및 대사질환의 관심이 높아지고 있다.

비만은 단순한 과잉체중과는 달리 체내 지방의 과잉축적이며 이러한 비만에는 지방세포의 수에 변화 없이 세포가 비후되는 세포 비대형 비만(hypertrophic obesity)과 지방 세포의 수와 크기가 증가한 세포 과다 증식 및 세포 비대형 비만(hyperplastic-hypertrophic obesity) 등이 있어, 비만은 지방세포의 이상과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

한의학에서는 비만을 肥, 肥胖, 肥人, 肉人, 肥貴人 등으로 표현하고 있으며, 그 원인에 대하여 《黃帝內經》에서는 過食肥甘膏粱厚味, 久臥, 久坐, 少勞, 素稟之體 및 外感濕邪와 內傷七情 등으로 인한 氣滯, 痰濁, 水濕, 瘀血 등이 비만을 유발한다고 기록되어 있다^{16,17)}. 비만의 기본적 생리는 脾胃의 기능실조로 氣虛를 초래하고 氣虛하면 不能運行으로 인하여 濕, 痰, 瘀 등의 병리적 산물을 만들어내어 각종 질환을 유발시킨다고 볼 수 있는데^{16,17)}, 근본적으로는 臟腑의 氣運이 虛하여 運化無力해져 濕痰이 발생함과 동시에 水液代謝失調가 유발된 것이 비만의 원인이 된다고 하였다^{7,8)}.

補中治濕湯은 왕²⁰⁾의 《醫林集要》에 최초로 수록된 방제로 “水腫由脾虛濕勝癱閉 滲泄水道妄行 故通身面目手足皆浮面腫”이라는 한의학적인 浮腫의 발생기전에 입각하여 脾의 기능을 도움으로써 浮腫을 해소시키는 효능을 가지며¹⁹⁾, 《東醫寶鑑》⁹⁾에서도 “治腫脹大法, 宜補中行濕利小便 以人蔘白朮爲君, 蒼朮陳皮茯苓爲臣, 黃芩麥門冬爲使, 以制肝木, 少加厚朴, 以消腹脹, 氣不運 加 木通, 氣下陷, 加 升麻”하여 浮腫을 치료한다고 기록되어 있다. 따라서 비만이 脾의 운화기능 실조로 인한 수액대사 장애가 원인인 경우, 비만치료에 보중치습탕을 응용해 볼 수 있으며, 또한 처방내용 중 白朮²⁰⁾, 蒼朮²¹⁾, 陳皮²²⁾, 茯苓²³⁾, 黃芩²⁴⁾, 麥門冬²⁵⁾ 등이 비만과 지방세포분화, 지질대사에 영향을 미친다는 연구결과도 보고되고 있어 비만치료에 補中治濕湯의 투여가 의미 있음을 보여주고 있다.

이를 바탕으로 저자는 임상에서 中焦가 虛하고 水濕으로 유발된 비만환자에게 보중치습탕을 복용하게 하여 양호한 체중감량 효과를 얻었고, 補中治濕湯이 비만이나 지방세포에 미치는 영향에 관한 선행 기전연구나 실험적 연구를 확인하였으나 찾지 못하였다. 이에 저자는 脾의 水濕代謝를 도와 中焦를 補하여 濕을 조절하고 배출하는 보중치습탕이 실험적으로 비만에 어떠한 효과가 있는지 알아보고자 3T3-L1 전구지방세포를 이용하여 지방세포의 증식과 분화에 미치는 영향에 대해 연구하였다.

본 실험에서 사용한 3T3-L1 세포주는 분화된 3T3-L1 adipocytes가 in vivo adipocytes의 생화학적 형태학적 성질들과 사실상 동일하다는 보고²⁶⁾에 따라 지방 대사를 연구하는데 적절

하다고 판단되어 3T3-L1 전구지방세포를 분화시켜 사용하였다.

세포수준에서 비만은 지방조직에서 섬유아 지방전구세포(preadipocytes)의 지방세포(adipocytes) 분화에 의한 지방세포 수와 크기의 증가가 원인으로 작용한다. 지방조직은 단순한 에너지의 저장고가 아니라, 내분비 기관으로서 각종 단백질 호르몬들을 분비하여 지방대사와 당대사를 포함한 체내에너지 대사를 조절하는데 중요한 역할을 한다²⁷⁾. 따라서 지방세포의 증식, 지방세포에서 분비되는 물질과 생체 내 분화 조절 기전에 대한 이해가 비만 및 여러 합병증을 효과적으로 치료할 수 있을 것으로 생각된다.

실험은 지방세포 분화억제, 지방세포 분화 관련 전사인자와 유전자 발현조절 및 지방세포 분화관련 신호전달경로의 활성 조절에 관한 실험으로 크게 세가지 방법으로 나누어 진행하였다.

보중치습탕의 농도 설정은 MTT법을 사용하여 세포증식반응을 관찰하여 결정하였다. 3T3-L1 전구지방세포에 48시간동안 1, 2, 4, 8 mg/ml 농도별로 처리 후 관찰한 결과 모든 농도에서 전구지방세포의 생존률에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이결과로부터 BJCST 4와 8 mg/ml 농도에서 세포에 독성반응이 없는 것으로 판단하여 실험에 사용하였다.

전구지방세포의 분화과정에서 형태학적 변화를 관찰한 결과, 전구지방세포의 세포밀도가 100% confluent된 세포형태는 길게 뻗은 섬유아세포의 형태를 보여주었으나, 분화 유도 후 4일과 8일째 세포의 형태는 시간이 지남에 따라 세포 모양이 둥글어지고 세포질 내 지방구들이 점차 많이 형성되었으나, BJCST군은 농도에 비례하여 세포내 지방구의 생성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

분화된 지방세포 내 중성지방 생성에 대한 영향을 관찰하기 위해 Oil red O를 이용하여 염색을 시행하여 지방세포의 형태를 관찰하고 세포내 중성지방의 양을 관찰한 결과 분화군에 비해 4 mg/ml와 8 mg/ml의 BJCST군에서 지방세포의 형성이 억제되어 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 4). 이러한 결과를 통해 보중치습탕이 지방세포 분화를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

지방세포의 분화는 confluence, hormonal induction, growth arrest, mitotic clonal expansion, terminal differentiation의 4가지 단계로 진행되며 이 단계들은 유기적인 전사인자의 cascade 반응에 의해 조절된다. 지방세포 분화를 조절하는 전사인자에는 PPARs, C/EBPs 그리고 SREBP family 등이 있으며²⁸⁻³¹⁾, 분화가 시작되면 insulin, dexamethasone 등과 같은 hormonal induction에 의해 분화 초기에 C/EBPβ가 발현되고, C/EBPβ가 활성화되어 이후 분화 후기에는 지방세포 분화의 핵심적인 전사인자인 C/EBPα와 PPARγ의 발현이 유도된다³²⁻³⁴⁾. 분화초기 hormonal induction에 의해 발현되는 C/EBPβ와 C/EBPδ는 clonal expansion을 유발할 뿐만 아니라 C/EBPα와 PPARγ의 발현을 활성화시키는 역할도 알려져 있다. 또한 C/EBPβ가 제거된 마우스에서 지방세포가 형성되지 않았다는 연구에 의하면 지방세포의 형성에서 C/EBPβ의 중요성을 확인할 수 있다³⁵⁾. SREBP1은 전구지방세포 분화초기에 매우 빠르게 유도되어 PPARγ와 함께 지방세포 분화를 촉진시키는 역할을 하며 지방대

사에 관련된 많은 유전자의 발현을 증가시킴으로써 지방대사를 촉진한다^{36,37}). C/EBP α 는 여러 지방조직 특이성 유전자들이 발현되기 전에 증가하여 에너지 항상성을 조절하며³⁸) PPAR γ 의 발현을 유도하는데³⁹), PPAR γ 는 adipogenesis의 주요 조절자로서 Leptin, FAS 및 aP2 등의 adipogenic gene들의 발현을 조절하고, 지방분화에 관여하여 지방대사 관여 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다⁴⁰).

지방세포 분화 초기에 조절 작용하는 전사인자의 발현 양상을 관찰한 결과 補中治濕湯은 분화 8일째 SREBP-1, C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP α 와 PPAR γ mRNA의 발현 증가를 감소시켰다 (Fig. 5). 이러한 전사인자들의 발현양상은 補中治濕湯이 지방세포의 분화과정에서 지질 생성에 미치는 영향과 일치하여 분화 관련 전사인자들의 발현을 조절하여 지방합성을 조절하고 있음을 알 수 있다.

지방합성에 관련된 유전자의 발현에 대한 영향을 살펴보기 위해 지방합성에 핵심역할을 하는 핵수용체로 지방생성과 축적에 관여하는 LXR α 과 지방산 합성효소인 FAS의 발현 양상을 관찰한 결과 보충치습탕은 분화 8일째 LXR α mRNA와 FAS mRNA의 발현 증가를 감소시켰다(Fig. 6).

C/EBP α 와 PPAR γ 의 활성화로 인해 실질적인 지방세포의 표현형을 결정하는 adipose-specific 유전자인 aP2, Adiponectin, LPL과 같은 terminal marker들의 발현이 유도된다. 이러한 전사인자들의 조절을 통해 지방세포분화가 진행되며 그 결과로 중성 지방의 lipid droplet이 세포질에 나타나게 되어 점점 커지고 합쳐져 지방세포 분화가 완료된다³²⁻³⁴). 이러한 지방세포 특이적 유전자의 발현에 미치는 영향에 대해 살펴보기 위해 aP2, Adipsin, LPL, CD36, TGF- β , Leptin 그리고 Adiponectin의 발현 양상을 관찰한 결과 보충치습탕은 분화 8일째 aP2, Adipsin, LPL, CD36, TGF- β , 그리고 Adiponectin mRNA의 발현을 감소시켰다(Fig. 7).

3T3-L1 지방세포에서 발현되어 지방산화를 조절한다고 알려진 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 지방산화 효소인 ACO와 에너지 소비 단백질인 UCP-2의 발현 정도를 관찰한 결과 보충치습탕은 분화 8 일째 ACO와 UCP-2 mRNA의 발현을 감소시켰다(Fig. 8). UCP-2는 거의 모든 조직과 세포에 존재하며 미토콘드리아 내막에 존재하는 주로 근육이나 갈색지방조직과 같은 열을 발생하는 조직에 많이 발현되는 단백질로써 섭취된 에너지를 저장하지 않고 열로 발산하는 역할을 한다⁴¹). 따라서 ACO와 UCP-2 mRNA의 발현의 감소는 보충치습탕이 지방산화를 통해 에너지 소비를 증가시키고 열을 발산하는 효과는 없는 것으로 생각된다.

지방세포 분화관련 주요 조절 전사인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 분화자극 8 일 후 PPAR γ 와 C/EBP α 단백질 발현을 관찰한 결과 BJCST군에서는 PPAR γ 와 C/EBP α 단백질 발현이 감소되었다(Fig. 9). PPAR γ 와 C/EBP α 는 지방세포 분화에 핵심적인 전사인자로 단백질 발현의 감소는 지방 세포 분화를 감소시킨 것을 보여준다.

본 연구결과를 종합해 볼 때 보충치습탕이 지방세포분화와 생성을 유의하게 억제하는 것으로 나타났는데, 이는 한의학적 원

리에 의한 水濕代謝의 조절뿐 아니라 이로 인해 비만환자의 치료 가능성을 보여주는 것으로 향후 임상연구를 통하여 적절한 투여량 및 투여방법에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

보충치습탕이 3T3-L1 세포에서 지방세포 분화기전에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같았다.

보충치습탕은 농도에 따라 지방분화와 중성지방의 축적을 유의하게 억제하였다. 보충치습탕은 지방분화 전사인자인 SREBP1, C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP α 와 PPAR γ mRNA의 발현을 억제하였다. 보충치습탕은 지방합성에 관여하는 LXR α 와 FAS mRNA와 지방특이 단백질인 aP2, Adipsin, LPL, CD36, TGF- β , Leptin과 Adiponectin mRNA의 발현을 억제하였다. 보충치습탕은 지방세포의 산화를 유도하는 ACO와 UCP-2 mRNA의 발현을 증가시키지 않았다. 보충치습탕은 지방세포 분화관련 주요 조절 전사인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 활성화를 억제하였다.

References

1. 한방재활의학회. 한방재활의학회. 서울, 군자출판사, pp 349-362, 2003.
2. Kopelman, P.G. Obesity as a medical problem. *Nature*. 404(6778):635-643, 2000.
3. Spiegelman, B.M., Flier, J.S. Adipogenesis and Obesity. *Rounding Out the Big Picture Cell* 87: 377-389, 1996.
4. Ahima, R.S., Flier, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 11(8):327-332, 2000.
5. Padwal, R.S., Sumit, R.M. Drug Treatments for Obesity: Orlistat, Sibutramine, and Rimonabant. *The Lancet* 369(9555):71-77, 2007.
6. Souza, C., Angeliki, A.M., Constantinos, C.F., Eleni, T.P., Stella S.D. Effect of antiobesity medications in patients with type 2 diabetes mellitus *Diabetes, Obesity and Metabolism* 11(7):641-664, 2009.
7. 김동환, 이경섭. 비만관리센터 치료 성과에 대한 연구. *대한한방부인과학회지* 14(1):319-327, 2001.
8. 신동길, 김덕근, 이진용. 비만아 9례에 대한 광항정기산 가미방의 치료효과에 대한 임상적 고찰. *대한한방소아과학회지* 15(1):183-194, 2001.
9. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 법문문화사, pp 1304-1305, 1999.
10. 김종균, 김유겸, 유장현, 이호섭. 補中治濕湯의 백서 신장기능에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 15(2):296-299, 2001.
11. 강대길, 김종균, 김복해, 조동기, 손은진, 유도근, 이호섭. 補中治濕湯의 백서 신장 수분채널 Na, K-ATPase, 산화질소 합성효소 발현에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 16(1):72-77, 2002.

12. 金仁仙, 曹東鉉, 杜鎬京. 壯原湯加味方 및 補中治濕湯加味方이 Gentamicin Sulfate로 誘發된 白鼠의 急性 腎不全에 미치는 效果. 경희의학 7(2):168-212, 1991.
13. 조창섭. 보충치습탕이 간 및 신장의 손상에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문, 1980.
14. WHO. Obesity: preventing and mang-ing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO technical report series 894. Geneva, World Health Oeganization, 2000.
15. Bray,G.A. Obesity. In Encyclopedia of Human Biology 5. pp 517-521, 1991.
16. 洪元植. 精校黃帝內經. 서울, 동양의학연구원출판부, pp 61, 94, 219-220, 275, 1991.
17. 김정연. 비만에 대한 동서의학적 고찰. 한방재활의학과학회지 3(1):299-314, 1994.
18. 汪認庵. 醫方集解. 臺北:文光圖書有限公司. pp 227-231, 1986.
19. 杜鎬京. 東醫腎系學. 서울, 동양의학연구원출판부, pp 7-9, 371-372, 374-375, 369, 393, 449, 1993.
20. 김창근. 백출의 비만세포증식과 고지방식이 동물모델에서의 항비만 효과. 경희대학교 석사학위논문. 2009.
21. 김수영. 蒼朮 抽出液이 肥滿白鼠와 3T3-L1의 脂肪細胞分化에 미치는 影響. 원광대학교 석사학위논문. 1997.
22. 신인순. 진피와 금은화 추출물이 고지방식으로 유도한 비만 생쥐에서 지질대사 및 신경내분비 조절의 영향. 대구한의대학교 석사논문. 2012.
23. 황정수, 석장미, 최혜민, 신인순, 황수정, 박지영, 김성욱, 서부일, 김미려. 차전자, 복령 복합 추출물(CJB)이 고지방사료로 유도된 비만 생쥐의 조직형태 및 조직병리학적 변화에 미치는 영향. 대한본초학회지 28(1):91-96, 2013.
24. 김호경, 강은정, 고병섭. 多樣한 黃芩藥鉞製劑가 前脂肪細胞 3T3-L1의 增殖에 미치는 影響. 대한한의학회지 19(1):358-367, 1998.
25. 김은정, 정성운, 양준호, 이인선, 이인자. 맥문동 엑스가 고콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. 한국생약학회 34(1):65-69, 2003.
26. MacDougald, O.A., Hwang, C., Fan, H., Lane, M.D. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 92(20):9034-9037, 1995.
27. Frühbeck, G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and Metabolic disorders. Method Mol Biol. 456: 1-22, 2008.
28. Brun, R.P., Kim, J.B., Hu, E., Altiock, S., Spiegelman, B.M. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory. Curr. Opin. Cell. Biol. pp 826-832, 1996.
29. Gregoire, F.M., Smas, C.M. Understanding adipocyte differentiation. Physiol. Rev. 78: 783-809, 1998.
30. Saitoa, T, Abea, D and Sekiya, K. Flavanone exhibits PPAR γ ligand activity and enhanced differentiation of 3T3-L1 adipocyte. Biochem. Biophys. Res. Commun. 308: 281-285, 2009.
31. Tontonoz, O, Hu, E. and Spiegelman, B.M. Regulation of adipocyte of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 571-576, 1995.
32. El-Jack, A.K., Hamm, J.K., Pilch, P.F., Farmar, S.R. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR gamma and C/EBP alpha. J. Biol. Chem. 274: 7946-7951, 1999.
33. Fox, K.E., Fankell, D.M., Erickson, P.F., Maika, S.M., Crossno, J.T. Klemm, D.J. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT.enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C.EBP beta, or PPAR gamma 2. J. Biol. Chem. 286: 40341-40353, 2006.
34. Hamm, J.K., Park, B.H., Farmar, S.R. A role of C/EBP beta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocyte. J. Biol. Chem. 276: 18464-18471, 2001.
35. Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S. Defective adipocyte differentiation in micelacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene. The EMBO Journal. 16: 7432-7443, 1997.
36. KIM, J.B., Spiegelman, B.M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. Genes Dev. 10: 1096-1107, 1996.
37. KIM, J.B., Spotts G.D., Halvorsen, Y.D., Shih, H.M., Ellenberger, T., Towle, H.C., Spiegelman, B.M. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. Mol. Cell. Biol. 15: 2582-2588, 1995.
38. 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.
39. Cao, Z., Umek, R.M., McKnight, S.L. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. Genes Dev. 5: 1538-1552, 1991.
40. Hwang, C.S., Loftus, T.M., Mandrup, S., Lane, M.D. Adipocyte differentiation and leptin expression. Annual review of cell and developmental biology. 13: 231-259, 1997.
41. Horton, T.J., Geissler, C.A. Post-prandial thermogenesis with ephedrine. Caffeine and aspirin in lean. pre-disposed obese and obese women. Int J Obese. 20(2):91-97, 1996.