

보중치습탕이 3T3-L1 성숙지방세포의 염증성 아디포카인의 생산 및 MAPK 신호전달에 미치는 영향

이수정 · 김원일 · 강경화^{1*}

동의대학교 한의과대학 비계내과학교실, 1: 생리학교실

Effects of Bojungchiseub-tang on the Production of Inflammatory Adipokine and MAPK Signaling in 3T3-L1 Mature Adipocytes

Soo-Jung Lee, Won-ILKim, Kyung-Hwa Kang^{1*}

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

Adipocytes are endocrine cells that release bioactive mediators called adipokines. In condition of obesity characterized by low-grade chronic inflammation, adipocytes release inflammatory adipokines, which is related to insulin resistance. Bojungchiseub-tang (BJCST) has been used in symptoms and signs of edema, dampness-phlegm, kidney failure, and so on in Korean medicine. BJCST is also expected to have anti-obesity activities. In the present study, we examined whether BJCST modulate the production of inflammatory adipokines and the activations of the mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathway related to induce adipocyte inflammation to elucidate the effects and its mechanism of BJCST on lowering the content of inflammatory adipokines in 3T3-L1 adipocytes. As a result, BJCST suppressed the production of proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF) α , interleukin (IL) 1β , IL-6, interferon (IFN) γ , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and the production of other inflammatory mediators, prostaglandin E_2 (PGE₂) and nitric oxide(NO)viadownregulationofcyclooxygenase-2(COX-2)andinducible NO synthase (iNOS) gene expressions. In addition, BJCST decreased the phosphorylation of MAPK that promotes the production of inflammatory adipokines in 3T3-L1 mature adipocytes. In conclusion, BJCST could regulate the production of inflammatory adipokines and MAPK signaling pathway related to induction of adipose inflammation.

keywords : Bojungchiseub-tang (BJCST), obesity, 3T3-L1 adipocyte, adipokines, mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling

서 론

비만은 지방세포의 증식과 비대와 관련되어 있으며, 비만에서 나타나는 지방조직의 만성적인 염증상태는 인슐린 저항성, 제2형 당뇨병, 고혈압, 심혈관계질환, 각종 암 등과 같은 비만성 대사질환의 발생에 주요위험인자로 간주되고 있다¹⁾.

지방조직을 구성하고 있는 지방세포는 아디포카인이라 불리는 다양한 생리활성물질들을 생산하는 내분비기관으로써 작용하는데²⁾, 대표적인 염증성 아디포카인은 tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)- 1β , IL-6, interferon (IFN)- γ , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF), monocyte chemoattractant protein-1

(MCP-1) 등의 전구 염증성 사이토카인/케모카인과 염증성 매개물질인 prostaglandin E_2 (PGE₂)와 nitric oxide (NO)이 포함되어 있다^{3,4)}.

염증성 아디포카인은 지방세포의 비대와 함께 분비가 증가하여 만성적인 지방조직 내 염증환경을 지속시킬 뿐만 아니라 인슐린 신호전달을 방해하는 원인이 된다⁵⁾. 그러므로 지방세포에서 분비되는 염증매개물질의 조절을 위한 전략이 비만뿐만 아니라 비만성 대사질환의 예방 및 개선을 위해 고려되고 있다.

한의학에서 비만을 일으키는 과정은 고량후미한 음식을 과식하거나 氣虛하여 비위의 운화기능이 실조하여 濕痰이 발생하고 水濕을 포함한 비정상적인 노폐물이 대사되지 못하고 쌓인

* Corresponding author

Kyung-Hwa Kang, Department of Physiology, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeongro, Busanjin-Gu, Busan, 614-851, Korea

E-mail : ghkang@deu.ac.kr Tel : +82-51-850-7423

Received : 2014/08/24 Revised : 2014/09/27 Accepted : 2014/10/09

© The Korean Society of Korean Pathology, The Korean Society of Korean Physiology

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529

Available online at www.hantopic.com

상태로, 이는 비의 운화기능 실조에 기인하여 발생한다고 인식한다⁶⁾. 《東醫寶鑑》에서도 肥人は 氣虛하고, 形盛氣衰하며, 多濕하고 痰이 많다고 하였으며⁷⁾, 《石室秘錄》에서도 “肥人多痰 乃氣虛也 虛則氣不能運行 故痰生之”라 하여 氣虛로 인한 濕痰을 비만의 원인으로 보았다⁸⁾. 또한 담음변증형 비만환자는 비만형 대사성 질환 발병과 밀접한 관련이 있는 복부내장지방형 비만과 관련이 있는 것으로 보고되었다⁹⁾.

보중치습탕은 임상에서 通治水病, 補中行濕 利水を 목표로 응용되는 처방으로 원기가 허약한 자의 腫脹에 주로 활용된다¹⁰⁾. 그러므로 보중치습탕은 氣虛로 인한 脾의 운화 기능 실조로 발생한 수습과 담음의 정제로 인한 비만에 응용해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

보중치습탕에 대한 선행연구로 腎不全 등 腎臟 기능에 대한 연구^{11,12)}와 태권도 선수의 체중감량시 신체조성, 혈액성분 및 호르몬 변화에 관한 연구¹³⁾가 있었으나, 비만 및 대사질환에 관한 연구는 미흡하였다.

이에 저자는 보중치습탕의 지방세포에서 분비되는 염증성 아디포카인 분비와 세포 내 신호전달 조절에 대하여 살펴보기 위하여, 3T3-L1 지방세포를 이용하여 분화 증식된 지방세포에서 분비되는 염증 물질 조절 및 지방세포 신호전달경로의 활성 조절에 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

補中治濕湯(Bojungchiseup-tang, BJCST)은 《東醫寶鑑》¹⁰⁾에 의거하여 한 첩의 분량은 Table 1과 같이 하였다. 약재들은 입춘제약 (김해, 한국)에서 규격품을 구입, 정선하여 5첩 분량인 146 g을 증류수로 水洗하여 1.5 l의 증류수를 가하여 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2 μm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200 ml가 되도록 감압농축하였다. 실온에서 냉각시킨 뒤 감압필터를 사용, 냉동 건조하여 33.4 g의 추출물을 획득하였다. 추출물은 -20°C에 보관하였다가 실험직전 PBS에 희석하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. The Composition of BJCST

| Herbal name | Drug name | Produce Region | Dosage(g) |
|-----------------|---------------------------|----------------|-----------|
| 人蔘 | Ginseng Radix Alba | Korea | 20 |
| 白朮 | Atractylodis Rhizoma Alba | China | 20 |
| 蒼朮 | Atractylodis Rhizoma | China | 14 |
| 陳皮 | Citri Unshii Pericarpium | Korea | 14 |
| 白茯苓 | Hoelen | China | 14 |
| 麥門冬 | Liriopis Tuber | Korea | 14 |
| 木通 | Akebiae Caulis | Korea | 14 |
| 當歸 | Angelicae Gigantis Radix | Korea | 14 |
| 黃芩 | Scutellariae Radix | China | 10 |
| 厚朴 | Magnoliae Cortex | China | 6 |
| 升麻 | Cimicifugae Rhizoma | China | 6 |
| Total amount(g) | | | 146 |

3. 세포배양 및 분화

지방세포의 분화에 관한 실험의 경우, 3T3-L1 전구지방 세포는 5% CO₂, 37°C배양기에서 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 isobutylmethylxanthine (IBMX), 1 μM dexamethasone (DEX)와 1 μg/ml insulin의 분화유도물질(MDI)이 포함된 DMEM으로 교환하여 2~3일 동안 분화를 유도하였으며, 그 후 매 2 일 마다 1 μg/ml insulin이 포함된 DMEM으로 교환하였다. 분화 8일 후 세포는 분석을 위해 사용되었다. 실험군은 3T3-L1 전구지방세포에 분화유도를 하지 않은 전구지방세포, 3T3-L1 전구지방세포에 MDI를 처리하여 8일 동안 분화를 유도한 분화유도군(MDI), 3T3-L1 전구지방세포에 8일 동안 분화 유도와 보중치습탕 추출물을 각각 4 mg/ml과 8 mg/ml의 농도로 처리한 군(BSCST)으로 나누었다.

4. 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 흔들어진 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, 1mM EDTA)를 사용하여 2% agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 30 분간 전기영동한 후 ethidium bromide 염색을 한 후 분석하였다. 각

각의 primer는 Bioneer (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 합성하였다(Table 2).

Table 2. The Primers for RT-PCR

| Target gene | | Oligonucleotide sequences (5' to 3' direction) |
|-------------|---|--|
| COX2 | F | TTG AAG ACC AGG AGT ACC GC |
| | R | GGT ACA GTC CCA TGA CAT CG |
| iNOS | F | CTG CAG CAC TTG GAT CAG GAA CCT G |
| | R | GGG AGT AGC CTG TGT GCA CCT GGA A |
| GAPDH | F | CCA CAG TCC ATG CCA TCA C |
| | R | TTC ACC ACC CTG TTG CTG TA |

F: forward, R: reverse

5. 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 dodecyl sulfate)-polyacrylamide gel에 loading하여 150 V에서 1 시간 30 분 동안 전기영동하여 단백질을 분리시켰다. 분리된 단백질을 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Amersham, Sweden)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% Tween 20)로 실온에서 1 시간 blocking시킨 다음 1차 antibody를 1:500~1:2,000 희석하여 첨가한 이후 반응시켰다. TBST buffer로 3회 세척한 후 2차 antibody를 1:2,000으로 희석하여 1 시간 이상 반응시켰다. TBST buffer로 3회 세척 후 ECL(enhanced chemiluminescent) detection kit (Amersham, Sweden)를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 현상하였다.

6. Cytokine 및 PGE₂ 측정

세포배양이 끝난 후 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kit를 사용하여 분석한 후, microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분리된 cytokine 및 PGE₂의 양을 계산하였다.

7. NO 측정

세포 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 2 분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 세포배양액 100 µl에 Griess 용액 (1:1 mixture (v/v) of 1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5% H₃PO₄) 100 µl를 넣어 5 분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, NaNO₂ standard 값을 이용하여 계산하였다.

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. 전구 염증 사이토카인/케모카인 생산에 미치는 영향

3T3-L1 성숙지방세포에서 생산이 증가하는 전구 염증 사이토카인 TNF-α, IL-1β, IL-6, INF-γ, GM-CSF와 케모카인 MCP-1의 양을 정량하였다. 그 결과 TNF-α의 양은 전구 지방세포에서 664.20±312.90 pg/ml이었으나, 성숙지방세포에서 2,232.00±56.05 pg/ml로 전구지방세포에 비해 유의한 증가를 보인 반면(p<0.01), 4 mg/ml과 8 mg/ml BJCST군은 각각 1,684.00±104.00 pg/ml과 68.98±67.65 pg/ml로 성숙지방세포에 비해 유의한 감소를 보였다(p<0.01). IL-1β의 양은 전구지방세포에서 34.85±5.35 pg/ml이었으나, 성숙지방세포에서 115.40±17.80 pg/ml로 전구지방세포에 비해 유의한 증가를 보인 반면(p<0.01), 4 mg/ml과 8 mg/ml BJCST군은 각각 39.18±9.78 pg/ml과 24.80±13.46 pg/ml로 성숙지방세포에 비해 유의한 감소를 보였다(p<0.01). IL-6의 양은 전구지방세포에서 6.64±0.93 pg/ml이었으나, 성숙지방세포에서 215.30±54.99 pg/ml로 전구지방세포에 비해 유의한 증가를 보인 반면(p<0.01), 4 mg/ml과 8 mg/ml BJCST군은 각각 33.04±28.92 pg/ml과 6.96±1.46 pg/ml로 성숙지방세포에 비해 유의한 감소를 보였다(p<0.01). INF-γ의 양은 1.59±0.25 pg/ml이었으나, 성숙지방세포에서 5.65±0.99 pg/ml로 전구지방세포에 비해 유의한 증가를 보인 반면(p<0.01), 4 mg/ml과 8 mg/ml BJCST군은 각각 2.56±0.74 pg/ml과 2.99±0.73 pg/ml로 성숙지방세포에 비해 유의한 감소를 보였다(p<0.01). GM-CSF의 양은 전구지방세포에서 1.77±0.31 pg/ml이었으나, 성숙지방세포에서 41.57±11.87 pg/ml로 전구지방세포에 비해 유의한 증가를 보인 반면(p<0.01), 4 mg/ml과 8 mg/ml BJCST군은 각각 35.07±9.24 pg/ml, 3.90±1.79 pg/ml로 성숙지방세포에 비해 8 mg/ml BJCST군에서 유의한 감소를 보였다(p<0.01). MCP-1의 양은 전구지방세포에서 44.70±17.96 pg/ml이었으나, 성숙지방세포에서 105.50±56.28 pg/ml로 전구지방세포에 비해 유의한 증가를 보인 반면(p<0.05), 4 mg/ml과 8 mg/ml BJCST군은 각각 2.50±1.08 pg/ml, 1.11±0.37 pg/ml로 성숙지방세포에 비해 유의한 감소를 보였다(p<0.01)(Fig. 1).

2. PGE₂ 생산과 COX-2 발현에 미치는 영향

3T3-L1 성숙지방세포에서 생산하는 염증성 지질매개물질인 PGE₂의 양을 정량하였다. 그 결과 PGE₂의 양은 전구지방세포에서 42.49±7.70 pg/ml이었으나, 성숙지방세포에서 484.70±49.83 pg/ml로 전구지방세포에 비해 유의한 증가를

보인 반면($p < 0.01$), 4 mg/ml과 8 mg/ml BJCST군은 각각 327.70 ± 37.56 pg/ml과 215.20 ± 35.40 pg/ml로 성숙지방세포에 비해 농도 의존적으로 유의한 감소를 보였다($p < 0.01$)(Fig. 2A). 3T3-L1 성숙지방세포에서 PGE₂생산을 촉진시키는 효소인 COX-2 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 전구지방세포를 분화시킨 후 8일째에 COX-2 mRNA와 protein 발현 정도를 측정하였다. COX-2 mRNA와 protein 발현은 분화 8일째 전구지방세포에 비해 성숙지방세포에서 발현이 증가되었으며, BJCST군에서 성숙지방세포에 비해 농도 의존적으로 발현 감소되었다(Fig. 2B and 2C).

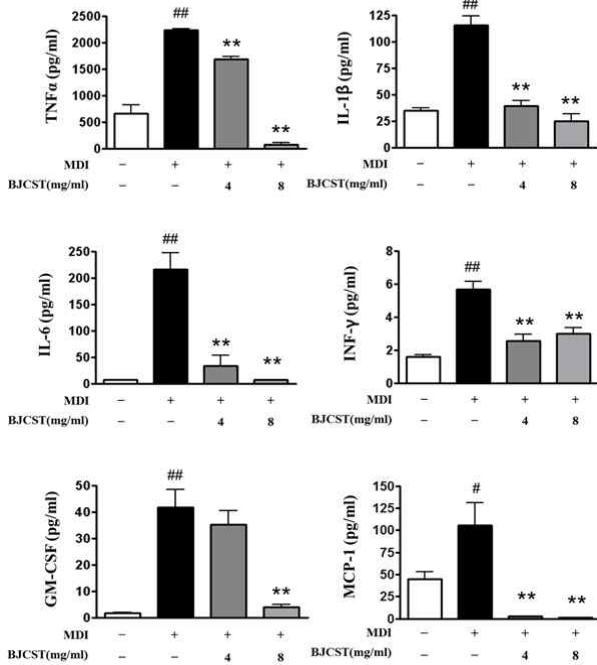


Fig. 1. Effects of BJCST on the Levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , GM-CSF and MCP-1 in 3T3-L1 Adipocytes. Cytokines were detected by ELISA. Values are expressed as mean \pm SD # $p < 0.05$ vs. undifferentiated cells. * $p < 0.05$ vs. differentiated cells. Dunnett's multiple comparison tests after one-way analysis of variance.

3. NO 생산과 iNOS 발현에 미치는 영향

3T3-L1 성숙지방세포에서 생산이 증가하는 NO의 양을 정량하였다. 그 결과 NO의 양은 전구지방세포에서 9.67 ± 7.49 μ M이었으나, 성숙지방세포에서 88.75 ± 19.91 μ M로 전구지방세포에 비해 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$). 반면 4 mg/ml과 8 mg/ml BJCST군은 각각 18.00 ± 13.03 μ M과 20.05 ± 16.61 μ M로 성숙지방세포에 비해 유의한 감소를 보였다($p < 0.01$)(Fig. 3A). 3T3-L1 성숙지방세포에서 NO 생산을 촉진시키는 효소인 iNOS 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 전구지방세포를 분화시킨 후 8일째에 iNOS mRNA와 protein 발현 정도를 측정하였다. iNOS mRNA와 protein 발현은 분화 8일째 전구지방세포에 비해 성숙지방세포에서 발현이 증가되었으며, BJCST군에서 성숙지방세포에 비해 농도 의존적으로 발현 감소되었다(Fig. 3B and 3C).

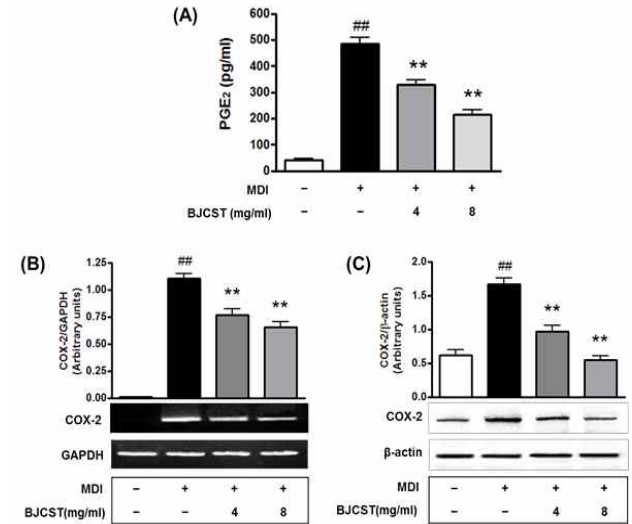


Fig. 2. Effects of BJCST on the Production of PGE₂ and the Expression of COX-2 in 3T3-L1 Adipocytes. (A) The levels of PGE₂ were detected by ELISA. Values are expressed as mean \pm SD # $p < 0.05$ vs. undifferentiated cells. * $p < 0.05$ vs. differentiated cells, Dunnett's multiple comparison test after one-way analysis of variance. (B, C) 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 and protein levels were determined by RT-PCR and western blotting as described in 'Material and Methods'. Each blot is representative of those obtained from triplicate experiments. Values are expressed as mean \pm SD # $p < 0.05$ vs. undifferentiated cells. * $p < 0.05$ vs. differentiated cells. Dunnett's multiple comparison tests after one-way analysis of variance.

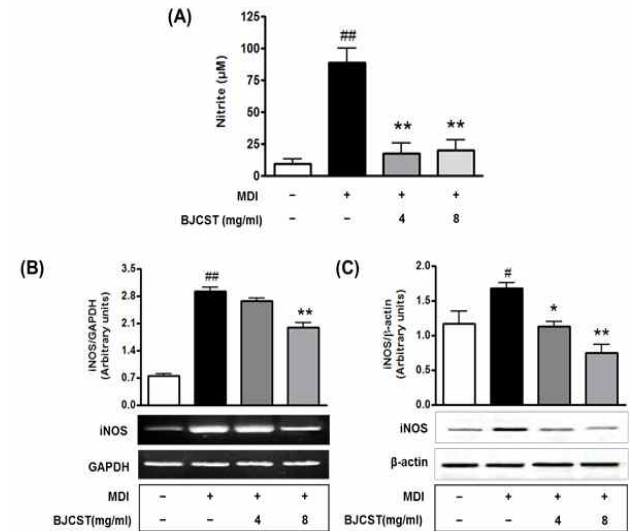


Fig. 3. Effects of BJCST on the Production of NO and the Expression of iNOS in 3T3-L1 Adipocytes. (A) The levels of NO were detected by Griess reaction, respectively. Values are expressed as mean \pm SD # $p < 0.05$ vs. undifferentiated cells. * $p < 0.05$ vs. differentiated cells, Dunnett's multiple comparison test after one-way analysis of variance. (B, C) 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 and protein levels were determined by RT-PCR and western blotting as described in 'Material and Methods'. Each blot is representative of those obtained from triplicate experiments. Values are expressed as mean \pm SD # $p < 0.05$ vs. undifferentiated cells. * $p < 0.05$ vs. differentiated cells. Dunnett's multiple comparison tests after one-way analysis of variance.

4. 지방세포 염증 관련 신호전달 및 전사인자 조절 효과

ERK1/2, JNK1/2 및 p38의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 전구지방세포의 분화자극 8일 후 ERK1/2, JNK1/2 및 p38의 단백질 발현과 인산화를 관찰하였다. ERK1/2, JNK1/2 및 p38의 단백질 발현에는 차이가 없었으며, ERK1/2의 인산화는 성숙지방세포가 전구지방세포에 비하여 현저한 증가를 보였고 4 mg/mL과 8 mg/mL BJCST군은 성숙지방세포에 비해 농도 의존적으로 감소를 보였다. JNK1/2의 인산화는 성숙지방세포가 전구지방세포에 비하여 증가를 보였으며 4 mg/mL과 8 mg/mL BJCST군은 성숙지방세포에 비해 감소를 보였다. p38의 인산화는 성숙지방세포가 전구지방세포에 비하여 현저한 증가를 보였으며 4 mg/mL과 8 mg/mL BJCST군은 성숙지방세포에 비해 현저한 감소를 보였다(Fig. 4).

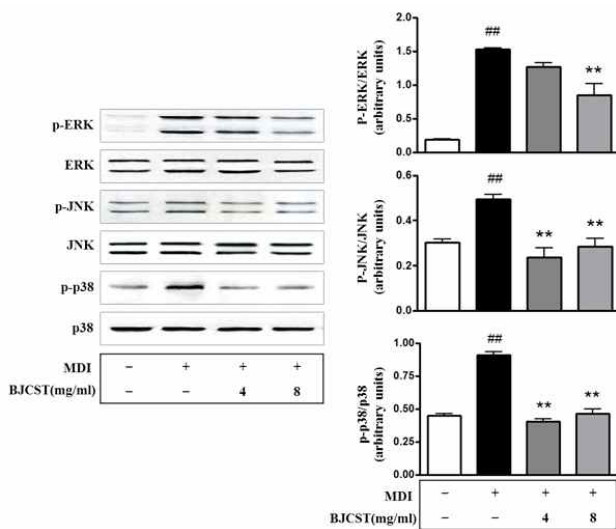


Fig. 4. Effects of BJCST on the Expression of Phosphorylated MAPK and MAPK in Protein Level. Western blotting was performed with phosphorylated ERK1/2 (Thr202/Tyr204) and total ERK1/2 antibodies, anti-phosphop-JNK at Thr183/Tyr185 and total JNK, anti-phosphop-p38 MAPK at Thr180/Tyr182 and total p38 MAPK antibodies. MAPK phosphorylation was quantified by densitometry in arbitrary units using Scion Image software, normalized to total amount of MAPK. Each blot is representative of those obtained from triplicate experiments. Values are expressed as mean \pm SD. ## $p < 0.01$ vs. undifferentiated cells. ** $p < 0.01$ vs. differentiated cells, Dunnett's multiple comparison tests after one-way analysis of variance.

고 찰

본 연구는 보충치습탕을 활용하여 비만성 대사질환에 대한 효과를 조사하기 위하여 성숙한 지방세포에서 생산되는 염증성 아디포카인과 염증 관련 신호전달기전에 대한 조절효과를 살펴 보았다. 이를 위해 3T3-L1 전구지방세포의 분화자극을 유도하고 성숙지방세포의 염증성 아디포카인의 분비와 관련신호전달에 미치는 보충치습탕의 억제효과에 대해 조사하였다.

보충치습탕은 임상에서 通治水病, 補中行濕 利水를 목표로 응용되는 처방으로, 구성약재인 인삼, 백출은 補中하고, 창출, 진피, 백복령은 行濕하고, 황금, 맥문동은 潤肺 通調水道하고,

후박은 腹脹을 消하고 목통은 利水시키고 승마는 氣가 下陷되는 것을 막는 효능이 있으므로¹⁰, 脾의 운화기능을 도와 浮腫을 해소시키고¹⁴, 기허로 인한 脾의 운화기능 실조로 인한 습담과 수액대사 장애가 원인으로 발생하는 비만 및 대사질환에 응용이 가능할 것으로 생각된다. 또한 처방 구성약재인 人蔘¹⁵, 白朮¹⁶, 蒼朮¹⁷, 陳皮¹⁸, 茯苓¹⁹, 黃芩²⁰, 麥門冬²¹ 등이 비만과 지방세포분화, 지질대사에 영향을 미친다는 연구결과도 보고되고 있어 보충치습탕이 비만으로 인한 만성 염증 조절에도 효과가 있을 것으로 가정하였다.

지방조직은 각종 단백질 호르몬들을 분비하여 지방대와 당대사를 포함한 체내에너지 대사를 조절하는 중요한 내분비 기관이며, 지방세포는 에너지 항상성 유지 및 지질대사에 중요한 역할을 한다. 비만의 경우 다양한 저분자 생리활성물질인 염증성 아디포카인을 분비하여 만성적인 염증반응을 일으키고, 비만성 대사질환의 발생과 관련하여 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²². 따라서 지방세포의 증식, 지방세포에서 분비되는 염증성 아디포카인과 세포내 조절 기전에 대한 이해가 비만 및 여러 합병증의 조절에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 저자는 선행연구를 통해 보충치습탕이 3T3-L1 전구지방세포에 1, 2, 4, 및 8 mg/mL의 농도로 48 시간 동안 처리되었을 때 대조군에 비하여 각각 112.10 \pm 6.97, 120.90 \pm 20.33, 123.90 \pm 16.51, 119.00 \pm 36.69%의 증식률을 나타내어 전구지방세포의 생존율에 영향을 미치지 않았으며, 전구지방세포의 분화 유도실험에서는 효과적으로 분화를 억제하는 것을 확인하였다²³.

지방세포에서 생산되는 염증성 아디포카인은 순환을 통해 간과 골격근을 포함하는 장기의 인슐린 민감성에 직접적인 영향을 미쳐 인슐린저항성과 만성 대사성 질환의 발병에 기여한다²². 비만인에서 관찰되는 지방세포유래 염증성 아디포카인은 염증성 사이토카인/케모카인과 염증성 지질매개물질인 PGE₂와 활성질소종인 NO가 포함된다.

TNF- α 는 지방세포에서 염증과 인슐린 저항성을 유발하는 중추적 매개자로 세포내 염증성 신호 경로의 활성화를 통해 지방세포의 기능을 손상시켜 직접적으로 인슐린 민감성을 감소시키고²⁴⁻²⁶, IL-6은 지방분해와 간중성지방 분비의 자극에 의해 고중성지방혈증을 유도한다²⁷. IFN- γ 는 지방세포에서 인슐린 유도 혈당흡수를 억제하고 당대사 이상과 인슐린 저항성을 유발하는 것으로 알려져 있는데^{28,29}, 최근 비만 마우스의 지방조직에서 IFN- γ 의 양이 증가되어 있는 반면, IFN- γ 결핍 비만 마우스에서 당내성이 향상되고 지방조직의 TNF- α 와 MCP-1의 발현감소가 보고되었다³⁰.

또한 비만인의 지방조직에서는 단핵구와 대식세포의 확산 주성인자인 MCP-1과 GM-CSF가 과발현되는데, 이들은 지방조직으로 대식세포의 침투와 인슐린저항성을 증가시키고, 전구염증 사이토카인 유전자 발현을 증가시키며 염증부위로 면역세포를 침투시켜 전구염증 사이토카인의 생산을 유도한다. 특히, 고지방식이를 투여한 마우스의 지방조직에서 전구염증 사이토카인의 전반적인 발현에 중요한 작용을 한다^{31,32}.

본 연구결과 보충치습탕은 3T3-L1 성숙지방세포에서 생

산이 증가하는 TNF- α , IL-1 β , IL-6, INF- γ , GM-CSF와 MCP-1의 양을 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

지질 매개 염증인자인 PGE₂는 COX-2에 의해 합성되는 대표적인 염증유발물질로서 다양한 염증질환을 비롯한 대사장애를 진행시킨다. 최근 성숙 지방세포에서 PGE₂는 COX-2 대사 경로에 의해 합성되어 항 지방분해 효과를 가지는 것으로 보고되었고^{33,34}, 염증반응뿐만 아니라 비만과 인슐린저항성의 발전에 관여하는 것으로 알려졌다³⁵.

본 연구결과 3T3-L1 성숙지방세포에서 생산이 증가하는 PGE₂의 농도는 보충치습탕에 의해 유의하게 감소하였고, PGE₂ 생산을 매개하는 COX-2의 mRNA와 protein 발현을 감소시켰다(Fig. 2).

NO는 활성질소종의 일종인 독성이 있는 저분자 라디칼로써 신경 전달기능, 혈액응고 및 혈압조절, 종양세포나 외부항원에 대한 면역계의 방어기능에 관여하고 있다. NO는 전구 염증성과 항염증성의 기능을 동시에 하고 있지만, 생체 내 과도한 NO의 생성은 오히려 염증반응을 촉진한다³⁶. 염증반응에서 NO는 LPS, TNF- α , IL-1 β , INF- γ 등의 자극을 받아 유도되는 iNOS에 의해 생성되는데, iNOS의 과다발현은 당대사의 손상과 인슐린 저항성을 초래한다³⁷.

본 연구결과 3T3-L1 성숙지방세포에서 생산이 증가하는 NO 농도는 보충치습탕에 의해 유의하게 감소하였고, NO생산을 매개하는 iNOS의 mRNA와 protein 발현을 감소시켰다(Fig. 3).

세포 내 신호전달 경로에서 지방세포의 염증성 아디포카인의 분비와 관련하여 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)의 활성화를 유도하는 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달 경로가 중요하다³⁸. 비만과 같은 병리적인 상황에서 ERK1/2, JNK1/2 및 p38의 만성적인 활성화는 여러 경로를 통해 인슐린저항성을 유발할 수 있으며, 특히 ERK1/2의 활성이 가장 강하게 작용한다³⁹. ERK1/2, JNK1/2와 p38은 일반적으로 인산화가 되면서 활성화되므로 이들의 활성화 정도를 알기 위해서는 인산화된 인자의 발현을 관찰하는 것이 필요하다. ERK1/2, JNK1/2 및 p38의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 성숙지방세포에서 ERK1/2, JNK1/2 및 p38의 단백질 발현과 인산화 정도를 관찰하였다.

본 연구 결과 단백질 발현에는 차이가 나타나지 않았으나, 인산화 정도는 성숙지방세포에서 증가하였고 보충치습탕에 의해서 억제되었다(Fig. 4). 이는 보충치습탕이 ERK1/2, JNK1/2 및 p38의 인산화를 억제하여 성숙지방세포의 염증성 아디포카인 및 염증매개인자의 분비를 조절하는 것으로 보인다.

본 연구결과를 종합해 볼 때 보충치습탕이 성숙지방세포에서 염증성 아디포카인의 분비를 유의하게 억제하였으며, 지방세포 내 MAPK 신호전달 경로의 억제와 관련되어 있는 것으로 나타났는데, 이는 한의학적 원리에 의하면 보충치습탕의 補氣, 行濕, 利水 효능으로 인한 水濕과 痰飲의 정체를 해소하는 작용에 의해 지방세포내 지방구의 생성과 축적을 억제할 뿐만 아니라 염증성 아디포카인의 분비를 억제하는 결과를 나타낸 것

으로 생각된다. 이러한 결과로 볼 때 보충치습탕의 비만조절 및 관련 대사질환에 대한 조절 가능성을 보여주는 것으로 의미 있는 결과라고 생각된다.

결 론

보충치습탕이 3T3-L1 성숙지방세포에서 염증 아디포카인 생산과 기전에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같았다.

보충치습탕은 성숙지방세포에서 생산되는 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, INF- γ , GM-CSF 및 MCP-1의 생산을 유의하게 감소시켰다.

보충치습탕은 성숙지방세포에서 생산되는 PGE₂와 NO의 생산과 COX-2와 iNOS mRNA 및 protein의 발현을 감소시켰다.

보충치습탕은 지방세포의 염증성 아디포카인의 분비조절과 관련된 신호전달경로인 ERK1/2, JNK1/2 및 p38의 활성화를 억제하였다.

Acknowledgements

This work was supported by Dong-eui University Foundation Grant (2014AA384).

References

1. Tateya, S., Kim, F., Tamori, Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Diabetes*. 4: 93, 2013.
2. Galic, S., Oakhill, J.S., Steinberg, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 316(2):129-139, 2010.
3. Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S., Bastard, J.-P. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab*. 34(1):2-11, 2008.
4. Murakami, M. Lipid Mediators in Life Science. *Exp Anim*. 60(1):7-20, 2011.
5. Maury, E., Brichard, S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 314(1):1-16, 2010.
6. Kim, D., Lee, K. Study on Results of Obesity Management Center's Treatments. *The Journal of Oriental Obstetrics and Gynecology*. 14(1):319-327, 2001.
7. Kim, S., Jin, S.H., Kim, T.H. A Study on etiological factors, symptoms of a disease, and treatments of obesity based on Dong-Yi Bo Gam. *J Korean Med*. 19(2):125-136, 1998.
8. Jin S.T. *Seoksilbirok*. Seoul, Haenglimseowon, p 76, 1982.

9. Lee, H.-C., Choi, Y.-M., Sim, W.-J., Kim, K.-S., Shin, S.-U., Choi, S.-M., Kang, B.-K. The Study of the Relationship with Abdominal Visceral Fat in Obese Patients Identified as Phlegm Type. *J Korean Med Obes Res.* 6: 51-59, 2006.
10. Heo J. Daeyeok Dong-Yi Bo Gam. Seoul, Beopinmunhwasa, pp 1304-1305, 1999.
11. Kang, D.G., Kim, J.G., Kim, B.H., Cho, D.K., Sohn, E.J., Ryu, D.G., Lee, H.S. Effects of Bojungchiseup-tang on Renal Expression of Water Channels, Na, K-ATPase and Nitric Oxide Synthase in Rats. *Korean journal of oriental physiology & pathology.* 16(1):72-77, 2002.
12. Kim, J.G., Kim, Y.G., Ryoo, J.H., Lee, H.S. Effects of Bojungchiseuptang on the Renal Function in Rats. *Korean journal of oriental physiology & pathology.* 15(2):296-299, 2001.
13. Oh, J.K., Lee, M.J. The Effects of BoJungChiSeub-Tang Administration on Body Composition, Blood Biochemical Factors and Hormonal Changes during 2 weeks Weight Reduction in TaeKwonDo Athletes. *J Korean Med.* 19(2):391-400, 1998.
14. Du H.G. Dong-Yi Singyehak. Seoul, Dongyangeuihak-yeonguwon. pp 7-9, 371-372, 374-375, 369, 393, 449, 1993.
15. Lee, H., Kim, M., Shik Shin, S., Yoon, M. Ginseng treatment reverses obesity and related disorders by inhibiting angiogenesis in female db/db mice. *J Ethnopharmacol.* 155(2):1342-1352, 2014.
16. Kim C.K. (The)Effects of the rhizome of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi on 3T3-L1 adipogenesis and on an obesity animal model. Kyung Hee University Doctorate thesis. 2009.
17. Kim S.Y. Effects of the Extracts from *Atractylodes Rhizoma* on obese rats and Differentiation of 3T3-L1 Cells. Wonkwang University Master's thesis. 1997.
18. Shin I.S. The mixture of Citri Pericarpium and Lonicerae Flos improves obesity through regulations of peripheral lipid metabolism and central neuroendocrine in mice fed a high fat diet. Daegu Haany University Master's thesis. 2012.
19. Hwang J.S., Suk J.M., Choi H.M., Shin I.S., Hwang S.J., Park J.Y., Kim S.O., Seo B.I., Kim M.R., Effects of Plantaginis Semen & Poria (CJB) Water Extract on Histomorphometrical Aspects and Histopathological Changes in High Fat Diet-induced Obese Rats *Kor. J. Herbology* 28(1):91-96, 2013.
20. Kim H.K., Kang E.J., Ko B.S., Effect of the various aqua-aqupuncture of Hwanggum on proliferation of preadipocyte 3T3-L1 cells. *K.O.M.S.* 19(1):358-367, 1998.
21. Rhee I.J., Kim E.J., Jeong S.W., Yang J.H., Lee I.S., Effects of Liriopis Tuber Extracts on Lipid Metabolism in Rats Fed High Cholesterol Diet. *Kor. J. Pharmacogn.* 34(1):65-69, 2003.
22. Karastergiou, K., Mohamed-Ali, V. The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol Cell Endocrinol.* 318(1-2):69-78, 2010.
23. Lee, S.J., Kim, W.I., Kang, K.H. Inhibitory Effects of Bojungchiseub-tang on Adipocyte Differentiation and Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 27(4):343-349, 2013.
24. Lobo, S.M. de V., Quinto, B.M.R., Oyama, L., Nakamichi, R., Ribeiro, A.B., Zanella, M.T., Dalboni, M.A., Batista, M.C. TNF- α modulates statin effects on secretion and expression of MCP-1, PAI-1 and adiponectin in 3T3-L1 differentiated adipocytes. *Cytokine.* 60(1):150-156, 2012.
25. Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N., Spiegelman, B.M. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 91(11):4854-4858, 1994.
26. Zhang, H.H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V.C., Greenberg, A.S. Tumor Necrosis Factor- α Stimulates Lipolysis in Differentiated Human Adipocytes Through Activation of Extracellular Signal-Related Kinase and Elevation of Intracellular cAMP. *Diabetes.* 51(10):2929-2935, 2002.
27. Nonogaki, K., Fuller, G.M., Fuentes, N.L., Moser, A.H., Staprans, I., Grunfeld, C., Feingold, K.R. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology.* 136(5):2143-2149, 1995.
28. Wada, T., Hoshino, M., Kimura, Y., Ojima, M., Nakano, T., Koya, D., Tsuneki, H., Sasaoka, T. Both type I and II IFN induce insulin resistance by inducing different isoforms of SOCS expression in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 300(6):E1112-1123, 2011.
29. Waite, K.J., Floyd, Z.E., Arbour-Reily, P., Stephens, J.M. Interferon- γ -induced Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and STATs in Adipocytes. *J Biol Chem.* 276(10):7062-7068, 2001.
30. Rocha, V.Z., Folco, E.J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A.H., Libby, P. Interferon- γ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation A Role for Adaptive Immunity in Obesity. *Circ Res.* 103(5):467-

- 476, 2008.
31. Kanda, H. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 116(6):1494-1505, 2006.
 32. Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kawatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., Yamauchi, T., Ueki, K., Oishi, Y., Nishimura, S., Manabe, I., Hashimoto, H., Ohnishi, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Nagai, R., Kadowaki, T. Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Adipose Tissues Causes Macrophage Recruitment and Insulin Resistance. *J Biol Chem.* 281(36):26602-26614, 2006.
 33. Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R.E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K.A., Hellerstein, M.K., Lee, H.-Y., Samuel, V.T., Shulman, G.I., Kim, K.-H., de Val, S., Kang, C., Sul, H.S. AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med.* 15(2):159-168, 2009.
 34. Wortman, P., Miyazaki, Y., Kalupahana, N.S., Kim, S., Hansen-Petrik, M., Saxton, A.M., Claycombe, K.J., Voy, B.H., Whelan, J., Moustaid-Moussa, N. n3 and n6 polyunsaturated fatty acids differentially modulate prostaglandin E secretion but not markers of lipogenesis in adipocytes. *Nutr Metab.* 6: 5, 2009.
 35. Schaloske, R.H., Dennis, E.A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta.* 1761(11):1246-1259, 2006.
 36. Coleman, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol.* 1(8):1397-1406, 2001.
 37. Kapur, S., Marcotte, B., Marette, A. Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 276(4):E635-641, 1999.
 38. Gil, A., María Aguilera, C., Gil-Campos, M., Cañete, R. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *Br J Nutr.* 98(Supplement S1):S121-126, 2007.
 39. Fujishiro, M., Gotoh, Y., Katagiri, H., Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Abe, M., Shojima, N., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Oka, Y., Asano, T. Three Mitogen-Activated Protein Kinases Inhibit Insulin Signaling by Different Mechanisms in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol Endocrinol.* 17(3):487-497, 2003.