

백출과 사인 추출 혼합물의 지방세포분화 억제 효과

김하림 · 권용관 · 최봉근¹ · 백동기^{2*}

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1 : ㈜뉴트라팜텍, 2 : 원광대학교 한의과대학 익산한방병원 한방내과

Inhibitory Effects of Mixture of *Atractylodes Macrocephala* and *Amomum Villosum* Extracts on Adipocyte Differentiation in OP9 Cells

Ha Rim Kim, Yong Kwan Kwon, Bong Keun Choi¹, Dong Gi Baek^{2*}

Department of Physiology, School of Korean Medicine, Wonkwang University,

1 : NutraPharm Tech Co., Ltd., 2 : Department of Korean Internal Medicine, Iksan Korean Medicine Hospital, Wonkwang University

In this study, we investigated the inhibition effects of mixtures of *Atractylodes macrocephala* (AM) and *Amomum villosum* (AV) water extracts on adipocyte differentiation. Treatment with mixtures of AM and AV extracts in a ratio of 3:1 for 24 and 48 hours did not show any cytotoxicity in OP9 cells. Mixtures of AM(3) and AV(1) extracts inhibited adipocyte differentiation, expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and CCAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP α), the major transcription factors of differentiation. It also inhibited the expression of lipoprotein lipase (LPL), adipocyte protein 2 (aP2), which are PPAR γ -target genes in adipocyte. We also checked the inhibition effects on cell proliferation during the early stage of differentiation by treatment with mixtures of AM(3) and AV(1) extracts. It markedly inhibited adipocyte proliferation after 48 hours, and also the phosphorylation of ERK1/2 and Akt after 10 min or 3 hour. These results identify a possible mechanism of action of mixtures of AM(3) and AV(1) extracts, suggesting that the mixtures of AM(3) and AV(1) extracts-induced inhibition of ERK and Akt phosphorylation suppresses adipogenesis by inhibiting other signaling cascades that include PPAR γ and C/EBP α during the process of OP9 adipocyte differentiation.

keywords : *Atractylodes macrocephala*, *Amomum villosum*, Adipocyte differentiation, OP9 cells, PPAR γ , C/EBP α

서 론

비만은 만성질환의 하나이며, 그 유병률이 전세계적으로 점차 증가하고 있는 추세이기 때문에 세계보건기구에서 장기 치료가 필요한 질병으로 규정한 이래로 현재 심각한 사회·경제적인 건강문제 중 하나로 널리 인식되고 있다. 비만이란 지방세포의 비정상적인 증가에 의해 체중이 증가된 상태로 제2형당뇨, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, 심혈관계 질환, 등 질환발병 위험을 증가시킨다¹⁾. 지방세포는 자신의 성장과 발달을 스스로 조절 할 뿐 아니라 체내 에너지 항상성 유지를 위한 다양한 기능을 수행한다. 일반적으로 지방세포로의 분화 초기에 일어나는 세포성장은 extracellular signal-related kinase(ERK)와 protein kinase B(AKT)에 의해 조절되고 지방세포 분화 후기에 일어나는 분화 및 지방축적은 C/EBP α 와 PPAR γ 등의 전사인자들에 의해 영향 받는 것으로 알려져 있다²⁾. 특히 PPAR γ 는 lipoprotein lipase(LPL), adipocyte protein 2(aP2) 등과 같은 분화 관련 유전자들의 발현을 조절하는

통합 전사인자이다³⁾. 따라서 지방세포 분화 연구는 초기의 세포 증식 억제와 후기의 분화 및 지방 축적 억제를 조절하는 전사인자의 발현 조절이 중요한 부분으로 인식되고 있다.

백출(白朮, *Atractylodis Rhizoma Alba*)은 국화과(Compositae)에 속한 다년생 초본인 삼주(*Atractylodes japonica* Koidz.) 및 당백출(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)의 뿌리 줄기(根莖)로 임상에서 주로 소화기관의 기능 개선을 목적으로 사용하고 있다⁴⁾. 당백출은 실험적으로 면역 조절 효과⁵⁾, 항비만 및 포도당 내성 개선 효과⁶⁾가 있다고 보고되었다. 사인(砂仁, *Amomi Fructus*)은 생강과(Zingiberaceae)에 속한 다년생 초본인 녹각사(*Amomum villosum* var. *xanthioides* Wall. ex Baker)와 양춘사(*Amomum villosum* Lour.)의 잘 익은 열매 또는 씨의 덩어리로⁷⁾, 임상에서 소화기관 기능부전으로 인한 구토 설사 등에 사용되고 있다⁸⁾. 양춘사는 실험적으로 염증성 장질환에 효과가 있으며⁹⁾, 비알코올성 지방간을 억제하는 것¹⁰⁾으로 알려져 있다. 최근 백출 사인 추출 혼합물이 고지방 사료에 의한 체중 증가를 유의하게 억

* Corresponding author

Dong Gi Baek, Department of Korean Internal Medicine, Iksan Korean Medicine Hospital, Wonkwang University, 60 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, Korea

E-mail : bdg124@wku.ac.kr Tel : +82-63-859-2811

Received : 2019/02/05 Revised : 2020/02/22 Accepted : 2020/02/25

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2020.02.34.1.24

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

제한다고 보고되었다¹¹⁾.

본 연구에서는 김 등이 보고¹¹⁾한 백출 사인 추출 혼합물의 항비만 효과를 바탕으로 백출 추출물과 사인 추출물을 3:1로 섞은 혼합물의 OP9세포에 대한 지방세포 분화 억제 효과 및 기전을 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 백출 및 사인 추출물의 제조

백출(*Attractylodes macrocephala* Koidz.)과 사인(*Amomum villosum* Lour.)은 ㈜광명당 제약(울산, 대한민국)에서 구입하여 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 진품 여부를 확인받았으며, 추출과정을 살펴보면 백출과 사인 100g을 3차 증류수 900ml로 3시간 가열 환류추출하고 여과한 다음 여액을 감압 농축 건조하여 백출 39.8g, 사인 9.25g의 추출물을 얻어 냉장 보관하면서 3:1로 혼합하여 실험에 사용하였다.

2. 지방세포 분화 유도

1.5×10^5 cells/ml의 OP9 세포를 2일 동안 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 MEM-α 배지에서 배양한 후 분화를 유도하였다. 분화 유도는 10% FBS, 175 nM insulin, 0.25 µM dexamethasone, 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 2 mM L-glutamine, 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 함유한 MEM-α 배지에서 2일 동안 배양한 후 10% FBS, 175 nM insulin, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 함유한 MEM-α 배지에서 3일 동안 배양하였다.

3. 세포 독성 시험

분화된 또는 분화되지 않은 OP9 세포를 2×10^5 cells/ml의 농도로 96 well plate에 이식한 후 백출과 사인 추출 혼합물을 24, 48시간동안 처리한 후 배양하였다. 정해진 시간 백출 사인 추출 혼합물을 노출 시킨 후 10 µl의 EZ-CyTox 용액 (Daeil Lab Service Co., Ltd, Seoul, Korea)을 각 well에 첨가한 후 30분 37°C를 유지하는 세포 배양기에 배양한 후 ELISA reader (Molecular Device, USA)로 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. Oil red O staining

1.5×10^5 cells/ml의 OP9 세포를 6-well plate에 이식한 후 백출 사인 추출 혼합물을 처리한 후 지방세포로 분화를 유도하였다. 5일 동안 분화를 유도한 후 세포를 10% formalin으로 20분 동안 고정시킨 후 PBS(pH 7.4)로 3번 세척하였다. 1ml Oil red O solution (Sigma, O0625)을 첨가한 후 60분 동안 염색시킨 후 PBS를 이용하여 3번 세척하고 건조시킨 후 isopropanol로 지방을 염색한 Oil red O solution를 추출하여 ELISA reader로 510nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. Western blot analysis

정해진 시간 동안 백출 사인 추출 혼합물을 OP9세포에 처리한 후, 세포내 단백질은 Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 분리하였다. 단백질의 농도는 Bradford method를 사용하여 조사하였다. 샘플 (20 µg)은 12% 아크릴아마이드와 함께 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 분리하였고, Hybond™-polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 이동하였다. 각각의 membrane은 2% bovine serum albumin 또는 5% skim milk 를 사용하여 2시간 blocking 하였고, 1 µg/ml 일차항체는 2000배 희석하여 4°C에서 overnight 처리하였다. 이차항체는 HRP-conjugated IgG (1:2000 dilution)를 사용하였다. 단백질 발현양은 image analyzer (Fuji-Film, Tokyo, Japan)를 사용하여 확인하였다.

6. Total RNA 분리

OP9 세포로부터 total RNA의 분리는 Trizol reagent (Life Technologies, UK)를 이용하여 제조회사가 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 각각의 세포를 원심분리하여 모은 후 1000 µl RNAzol B로 용해시킨 후 200 µl chloroform을 첨가하여, 실온에서 5분 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4°C에서 13,000 rpm으로 10분 원심분리하여 상층액 500 µl을 새로운 tube에 옮겼다. 위 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 섞은 후 4°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4°C에서 13,000 rpm으로 20분 원심분리하고 침전물을 75% EtOH로 2번 세척하였다. 세척된 RNA를 건조시킨 후 DEPC water 20 µl로 녹이고 분광광도계에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

7. 실시간 역전사 효소 중합반응 (Real Time PCR)

역전사 반응(reverse transcription reaction)은 2 µg total RNA와 Prime Script™ reagent kit (perfect realtime)(TaKaRa BIOINC.)를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 역전사 반응은 total RNA (2 µg), oligod(T)primer (25pmol), PrimeScript RT enzyme Mix I, 5X primeScript Buffer가 함유된 반응액으로 37°C에서 15분, 85°C에서 5시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 실시간 역전사 효소 중합 반응은 10배 희석한 cDNA에 Power SYBY Green PCR Master Mix를 이용하여 수행하였다. 발현된 각각 유전자의 mRNA 양은 LightCycler System software (Roche)를 이용하여 GAPDH에 대한 상대적인 양으로서 계산하였다. 사용된 primer의 sequence는 Table 1에 기록하였다.

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

Gene	Sequence for Primers	Accession no.
GAPDH	Forward: CGTCCCGTAGACAAAATGGT	NM_008084
	Reverse: TTGATGGCAACATCTCCAC	
LPL	Forward: GGACGGTAACGGGAATGTATGA	NM_008509
	Reverse: TGACATTGGAGTCAGTTCTCTCT	
aP2	Forward: AGCCTTTCTCACCTGGAAGA	NM_024406
	Reverse: TTGTGGCAAAGCCCACTC	

8. 통계처리

모든 실험 결과는 평균±표준편차(Mean±S.D.)로 계산하였다. 각 군 간의 통계적 유의성 검정에 따른 통계분석은 ANOVA (one-way analysis of variance test) Duncan 사후검정 비교를 실시하여 $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판정 하였다(SPSS V12., SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

결 과

1. 백출 사인 추출 혼합물의 독성

지방세포에 3:1 비율의 백출 사인 추출 혼합물을 0.1, 0.2, 0.5, 1.0mg/ml 농도로 24, 48시간 동안 처리한 후 세포생존율을 측정한 결과 처리한 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다(Fig. 1).

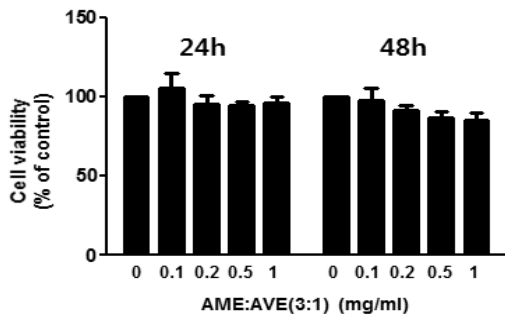


Fig. 1. Effects of mixtures of *Atractylodes macrocephala* (AM) and *Amomum villosum* (AV) extract (E) on cytotoxicity in OP9 cells. Cells were treated with various concentration of mixtures of AME and AVE in a ratio of 3:1. The cell viability was evaluated by EZ-CyTox assay as described in materials and methods. Each data represent the means \pm SD of three replicates.

2. 백출 사인 추출 혼합물의 지방세포 분화 억제 효과

3:1 비율의 백출 사인 추출 혼합물이 지방세포의 분화억제 효과를 조사하기 위해 Oilred O 염색을 통해 현미경으로 분석으로 각 세포 내에 지방구(lipid droplet) 축적된 양을 측정하였다(Fig. 2A). 지방세포 분화가 안 된 정상군에 비해 IBMX, dexamethasone, insulin 혼합액(MDI)을 처리한 군은 지방 축적이 증가하여 분화가 증가한 것을 관찰할 수 있다. 그러나 백출 사인 추출 혼합물을 0.1, 0.2, 0.5mg/ml 농도로 처리한 군의 지방 축적 정도는 처리한 농도에 비례하여 유의하게 억제되었다(Fig. 2B)

3. 백출 사인 추출 혼합물의 PPAR γ 와 C/EBP α 발현 억제 효과

3:1 비율의 백출 사인 추출 혼합물이 지방세포 분화를 조절하는 전사 인자로 알려진 PPAR γ 와 C/EBP α 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 다양한 농도의 백출 사인 추출 혼합물을 5일간 처리한 OP9세포를 수집하여 실시간 역전사 효소 중합반응을 이용하여 확인하였다.

그 결과 IBMX, dexamethasone, insulin 혼합액(MDI)을 처리한 군의 PPAR γ , C/EBP α mRNA 발현량은 정상군(1.0) 비하여 각각 7.6, 7.8배로 유의하게 증가하였다. 그러나 백출 사인 추출 혼합물을 처리한 군의 PPAR γ , C/EBP α mRNA 발현량은 MDI 처리군

과 비교하여 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

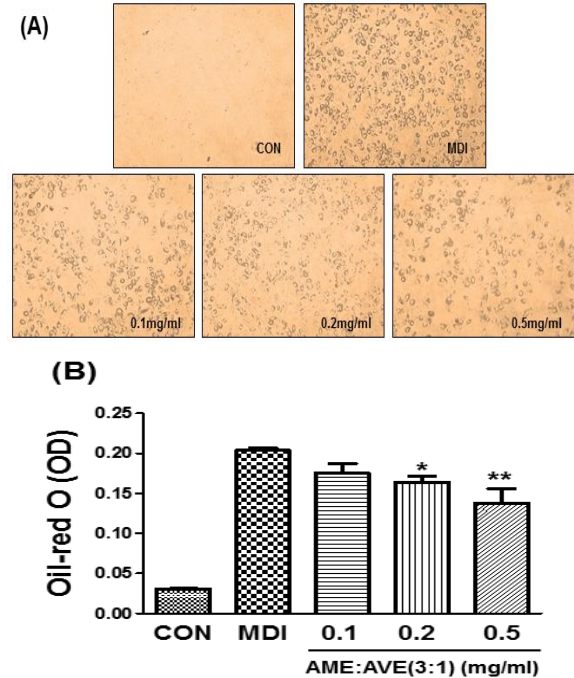


Fig. 2. Effects of mixtures of *Atractylodes macrocephala* (AM) and *Amomum villosum* (AV) extract (E) on adipocyte differentiation in OP9 cells. For differentiation of OP9 cells, cells were cultured in MEM- α medium containing 175 nM insulin, 0.25 μ M dexamethasone and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine for 2 days, and then in MEM- α medium containing 175 nM insulin for 3 days. Various concentration of mixtures of AME and AVE in a ratio of 3:1 were added at the entire period (0-5 days). After 5 days of differentiation, these cells were subjected to Oil Red O staining for quantitative(A) and qualitative(B) comparison of intracellular lipid accumulation. Data are mean \pm SD values of at least three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. MDI group. CON: no differentiation, MDI: differentiation.

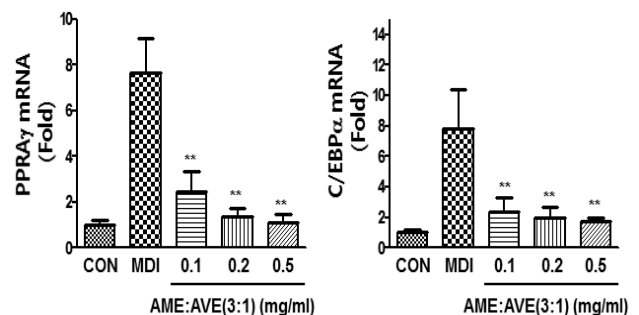


Fig. 3. Effects of mixtures of *Atractylodes macrocephala* (AM) and *Amomum villosum* (AV) extract (E) on PPAR γ and C/EBP α expression in OP9 cells. Differentiation conditions and other conditions are same as Fig. 2 legends. PPAR γ and C/EBP α mRNA expression levels were measured by real time PCR that described in Materials and Methods. Data are mean \pm SD values of at least three independent experiments. ** $p < 0.01$ vs. MDI group. CON: no differentiation, MDI: differentiation.

4. 백출 사인 추출 혼합물의 LPL과 aP2 발현 억제 효과

3:1 비율의 백출 사인 추출 혼합물이 PPAR γ 에 의해 발현이 조절되는 지방세포 특이 유전자로 알려진 LPL과 aP2 발현에 미치

는 영향을 조사하기 위하여 다양한 농도의 백출 사인 추출 혼합물을 5일간 처리한 OP9세포를 수집하여 실시간 역전사 효소 증합반응을 이용하여 확인하였다.

그 결과 IBMX, dexamethasone, insulin 혼합액(MDI)을 처리한 군의 LPL, aP2 mRNA 발현양은 정상군(1.0) 비하여 각각 4.8, 10.9배로 유의하게 증가하였다. 그러나 백출 사인 추출 혼합물을 처리한 군의 LPL과 aP2 mRNA 발현양은 MDI 처리군과 비교하여 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

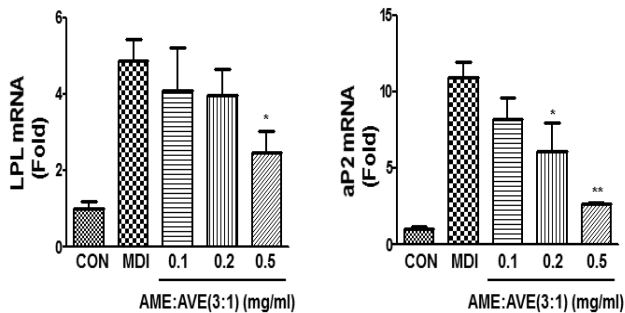


Fig. 4. Effects of mixtures of *Atractylodes macrocephala* (AM) and *Amomum villosum* (AV) extract (E) on PPAR γ and C/EBP α expression in OP9 cells. Differentiation conditions and other conditions are same as Fig. 2 legends. LPL and aP2 mRNA expression levels were measured by real time PCR that described in Materials and Methods. Data are mean \pm SD values of at least three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 vs. MDI group. CON: no differentiation, MDI: differentiation.

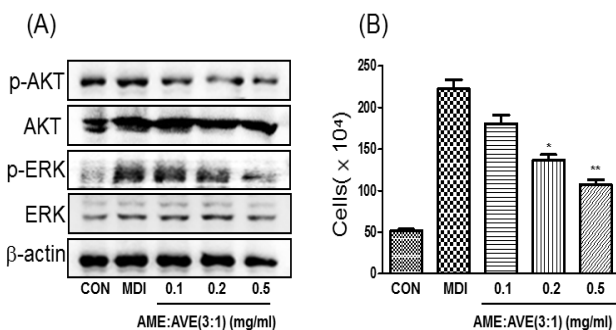


Fig. 5. Effects of mixtures of *Atractylodes macrocephala* (AM) and *Amomum villosum* (AV) extract (E) on AKT, ERK1/2 phosphorylation and cell proliferation in OP9 cells. (A) OP9 cells treated with various concentration of mixtures of AME and AVE in a ratio of 3:1 for 10 mins were harvested, and the lysates were subjected to western blot analysis for ERK and AKT. (B) The number of cells treated with various concentration of mixtures of AME and AVE in a ratio of 3:1 for 48 h was determined using a hemocytometer. Data are representative of triplicate experiments, and are mean \pm SD values of at least three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 vs. MDI group. CON: no differentiation, MDI: differentiation.

5. 백출 사인 추출 혼합물의 세포 증식 억제 효과

3:1 비율의 백출 사인 추출 혼합물이 지방세포 분화 초기의 세포 증식에 관여하는 인자로 알려진 EKR와 AKT의 발현에 미치는 영향과 세포 증식에 미치는 효과를 조사하기 위하여 각각 IBMX, dexamethasone, insulin 혼합액(MDI)을 10분, 48시간 처리한 후에 OP9세포를 수집하여 Western blotting과 hemocytometer를

이용하였다.

그 결과 MDI를 처리한 군의 인산화된 AKT(p-AKT)와 ERK(p-ERK)의 발현양은 정상군과 비교하여 증가하였으나, 백출 사인 추출 혼합물을 처리한 군은 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 5A). 또한 MDI에 의한 세포 증식 효과도 백출 사인 추출 혼합물의 처리에 의해 유의하게 억제되었다(Fig. 5B).

고찰

현재의 비만은 단순히 살이 찌는 것을 넘어 질병의 차원으로서 호르몬의 분비의 변화나 유전적 요인 및 다양한 요소 등의 복합작용이 무너진 상태로, 단순한 체중과다가 아닌 대사장애를 동반한 체내 지방이 과잉 축적된 상태를 의미한다. 최근 비만연구는 한의학 이론에 근거한 항비만제 개발을 위해 다양한 연구가¹²⁻¹⁵⁾ 시도되고 있다.

본 실험에 사용된 백출(*Atractylodes macrocephala*)⁶⁾과 사인(*Amomum villosum*)¹⁰⁾은 고지방 사료에 의해 유도되는 체중 증가와 지방간 형성을 유의하게 억제하였다고 보고되었으며, 최근에 실험적으로 다양한 비율의 백출 사인 추출 혼합물이 항비만 효과를 나타냈으며, 백출과 사인 추출물이 3:1로 혼합되었을 때, 그 효과가 우수한 것으로 보고되었다¹¹⁾. 김 등의 결과¹¹⁾를 바탕으로 백출과 사인 추출물 3:1 혼합물이 지방세포 분화과정에 미치는 효과 및 기전을 조사하였다.

비만은 지방세포의 숫자와 크기가 증가하는 것과 밀접한 관계가 있으며, 실험적으로 지방세포 분화 억제 효과와 고지방 사료에 의한 체중증가를 억제하는 한약재를 포함한 천연물의 탐색 등¹²⁻¹⁶⁾은 비만 치료 및 예방에 중요한 부분이다. 비만연구에 가장 널리 사용되는 지방세포는 3T3L1 세포주이다. 하지만 3T3L1 세포주는 지방세포로의 분화까지 8일 이상의 기간이 필요하고, 긴 분화 기간 동안의 분화 잠재력이 감소되는 문제가 생길 수 있기 때문에 본 연구에서는 3T3L1 세포에 비해 분화 과정도 짧고, 손쉽게 분화되는 장점이 있는 OP9세포를 사용하였다¹⁷⁾. OP9세포는 총 분화기간이 5일로 분화유도물질 처리 후 5일 이내로 지방세포로 분화할 수 있으며, 빠른 분화로 성숙한 OP9지방세포에서 일시적으로 발현된 유전자를 검출할 수 있다¹⁷⁾.

본 연구에서 백출 사인 추출 혼합물의 지방세포 분화 억제 효과 및 기전을 조사하기 위하여 지방세포 분화억제, 지방세포 분화 관련 전사인자와 유전자 발현조절 및 지방세포 분화 초기의 세포증식과정에 미치는 영향에 관한 실험을 조사하였다.

Fig. 1에서 보여주듯이 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/ml의 3:1 백출 사인 추출 혼합물의 세포 독성은 나타나지 않았다. 지방세포로의 분화는 분화와 동시에 세포내에 지방을 축적하므로 축적된 지방의 정도를 비교하여 지방세포 분화과정을 측정하는 것이 보편적인 방법으로 알려져 있다. 백출 사인 추출 혼합물은 처리한 농도 의존적으로 지방세포 분화를 유의하게 억제하였다(Fig. 2). 최근 김 등의 보고¹¹⁾에서 3:1 백출 사인 추출 혼합물이 고지방 식이에 의한 체중 증가를 억제한다고 보고하였다. 백출 사인 추출 혼합물의 지방세포 분화 억제 효과가 김 등이 보고¹¹⁾한 체중 증가 억제 효과를 설명할

수 있는 하나의 근거가 될 것으로 사료된다.

지방세포 분화과정에는 insulin 등과 같은 호르몬의 자극뿐만 아니라, 지방세포 분화 조절에 관여하는 전사인자들의 활성화가 필요하다^{18,19)}. 지방세포 분화과정에 필요한 전사인자는 peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) 및 cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine (CCAAT)/enhancer binding proteins (C/EBP α , C/EBP β 및 C/EBP δ) 등으로 알려져 있다²⁰⁻²²⁾. PPAR γ 는 지방세포 분화 전체 과정을 조절하는 전사인자로 lipoprotein lipase(LPL), fatty acid synthase(FAS), adipocyte protein 2(aP2) 등과 같은 지방세포에 특이적으로 발현하는 유전자들의 발현을 조절하며, 또한 지방세포 분화를 조절하는 다른 주요 전사인자인 C/EBP α 를 활성화시킨다²³⁻²⁶⁾. 3:1 백출 사인 추출 혼합물은 PPAR γ 와 C/EBP α mRNA 발현을 처리한 농도에 비례하여 유의하게 억제하였다(Fig. 3). 또한 PPAR γ 에 의해 발현이 조절되는 LPL과 aP2 mRNA 발현량도 백출 사인 추출 혼합물에 의해 유의하게 억제되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 백출과 사인 추출 혼합물의 지방세포 분화 억제 효과는 유전자 수준에서 조절됨을 시사하며, 특히 왕 등이 보고²⁷⁾한 C/EBP α 결핍 마우스 등과 같은 모델에 적용함으로써 주요 타겟 유전자를 알아내는 과정이 필요할 것으로 사료된다.

지방세포로의 분화를 위해선 초기에 2배 정도의 세포 증식이 일어나는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 세포 증식 과정에 MAPK/ERK, AKT 신호전달이 활성화 되고 이는 분화 초기를 주관하는 전사인자인 C/EBP β 를 활성화를 유도한다^{3,29-31)}. Fig. 5는 백출 사인 추출 혼합물이 지방세포 분화 유도 물질에 의한 세포 증식을 유의하게 억제하였으며, 이는 분화 초기에 AKT와 ERK 인산화 억제 효과가 관여함을 나타낸다.

이러한 결과는 3:1 백출 사인 추출 혼합물은 지방세포 분화를 유전자 수준에서 유의하게 억제하였으며, 그 이전에 분화 초기 세포 증식 억제 효과가 있음을 시사한다.

종합해보면, 3:1 백출 사인 추출 혼합물은 in vivo 체중 감소 효과¹¹⁾와 본 연구의 in vitro 지방세포 분화 억제 효과를 기반으로 항비만 효과가 있는 한약제제를 개발하는 기초자료가 될 것으로 사료된다.

결 론

3:1 백출 사인 추출 혼합물의 지방세포 분화 억제 효과를 조사하고자 다양한 농도의 추출 혼합물을 OP9세포에 처리한 후 세포독성 및 세포내 지방의 축적량과 지방세포 분화 억제 효과, 지방세포 분화와 관련된 유전자의 발현을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

백출 사인 추출 혼합물은 세포독성을 나타내지 않았다.

백출 사인 추출 혼합물은 지방세포 분화과정에서 축적되는 지방의 양을 유의하게 감소시키고, 지방세포 분화를 유의하게 억제하였다.

백출 사인 추출 혼합물은 지방세포 분화과정에서 PPAR γ , C/EBP α , LPL, aP2 mRNA 발현을 유의하게 억제하였다.

백출 사인 추출 혼합물은 지방세포 증식과 ERK 및 AKT 인산

화를 유의하게 억제하였다.

이상의 결과는 백출 사인 추출 혼합물이 지방세포 분화 억제를 통한 항비만 관련 건강기능식품 및 한약제제 개발의 한 후보 물질이 될 수 있는 실험적 근거를 제시한 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 원광대학교 교비지원에 의해서 수행되었습니다.

References

- Peng Y, Yu S, Li H, Xiang H, Peng J, Jiang S. MicroRNAs: Emerging roles in adipogenesis and obesity. *Cell Signal*. 2014;26(9):1888-96.
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev*. 2002;16(1):22-6.
- White UA, Stephens JM. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *2010;29:318(1-2):10-4*.
- The whole country a college of Oriental medicine The joint textbook publish commission compilation. *Herbalogy*. seoul:Younglimsa. 2007:578-80.
- Kwak TK, Jang HS, Lee MG, Jung YS, Kim DO, Kim YB, Kim JI, Kang H. Effect of Orally Administered *Atractylodes macrocephala* Koidz Water Extract on Macrophage and T Cell Inflammatory Response in Mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. 2018;7:2018:4041873.
- Song MY, Lim SK, Wang JH, Kim H. The Root of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi Prevents Obesity and Glucose Intolerance and Increases Energy Metabolism in Mice. *Int. J. Mol. Sci*. 2018;17:19(1):E278.
- Ministry of Food and Drug Safety(MFDS). *The Korean Pharmacopoeia 11th ed*. Seoul : Ministry of Food and Drug Safety. 2014:1815-6.
- Herbology Editorial Committee of Korean Medicine schools. *Boncho-hak[Herbology]*. Seoul: Yeonglimsa. 2007:336-8.
- Chen Z, Ni W, Yang C, Zhang T, Lu S, Zhao R, Mao X, Yu J. Therapeutic Effect of *Amomum villosum* on Inflammatory Bowel Disease in Rats. *Front Pharmacol*. 2018;20:9:639.
- Lu S, Zhang T, Gu W, Yang X, Lu J, Zhao R, Yu J. Volatile Oil of *Amomum villosum* Inhibits Nonalcoholic Fatty Liver Disease via the Gut-Liver Axis. *Biomed. Res*.

- Int. 2018;19:2018:3589874.
11. Kim HR, Choi BK, Jung HJ. Anti-Obesity Effects of Mixture of *Atractylodes macrocephala* and *Amomum villosum* Extracts. *J. Physiol. & Pathol. Korean. Med.* 2019;33(5):282-7.
 12. Kim EJ, Kim GY, Kim YM, Choi KH, Jang SJ. Anti-obesity Effect of Mulberry Leaves Extraction in Obese Rats High-fat Diet. *J. Physiol. & Pathol. Korean. Med.* 2009;23(4):831-6.
 13. Yoo EJ, Seo BK, Nam SS, Kang SK. Anti-obesity Effect of *Rhizoma Atractylodis* Herbal Acupuncture in High Fat Diet-induced Obese ICR Mouse. *Journal of Korean acupuncture & moxibustion medicine society* 2010;27(6):31-42.
 14. Jeong HS. Efficacy of *Alismatis Orientale Rhizoma* on Obesity induced by High Fat Diet. *The Korea Journal of Herbology* 2013;28(3):95-106.
 15. Song MY, Shambhunath Bose, Kim HJ. Anti-Obesity Effects of Fermented Samjung-hwan in High Fat Diet Rats. *Journal of Society of Korean Medicine for Obesity Research* 2013;13(1):17-23.
 16. Shon MS, Kim GN. Anti-oxidant and anti-obeseactivities of turmeric (*Curcuma longa* L.) extract in 3T3-L1 Cells. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 2014;12(2):169-5.
 17. Wolins NE1, Quaynor BK, Skinner JR, Tzekov A, Park C, Choi K, Bickel PE. OP9 mouse stromal cells rapidly differentiate into adipocytes: characterization of a useful new model of adipogenesis. *J. Lipid Res.* 2006 ;47(2):450-60.
 18. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2010;316:129-39.
 19. Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch. Med. Res.* 2008;39:715-28.
 20. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2000;16:145-71.
 21. White UA, Stephens JM. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2010;318:10-4.
 22. Wu Z, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999;11(6):689-94.
 23. El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PE, Farmer SR. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR γ and C/EBP α . *J. Biol. Chem.* 1999;274(12):7946-51.
 24. Fox KE, Fankell DM, Erickson PF, Majka SM, Crossno Jr JT, Klemm DJ. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) α , C/EBP β , or PPAR γ 2. *J. Biol. Chem.* 2006;281(52):40341-53.
 25. Bernlohr DA, Bolanowski DM, Kelly Jr TJ, Lane MD. Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 1985;260(9):5563-7.
 26. Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 1976;7(1):105-13.
 27. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GI. Impaired energy homeostasis in C/EBP α knockout mice. *Science* 1995;269(5227):1108-12.
 28. Bernlohr DA, Bolanowski MA, Kelly TJ Jr, Lane MD: Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 1985;260:5563-7.
 29. Tang QQ, Otto TC, Lane MD: Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003;100: 44-49.
 30. Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR: Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 2002;277:46226-32.
 31. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA: Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 1996;271:31372-8.