



Original Article / 원저

부자(附子)와 오가피(五加皮) 물 추출물의 골수유래 지방세포와 파골세포 분화 억제 효과

이경선^{1#} · 최은식^{1#} · 한상용^{1,2} · 김윤경^{1,3*}

¹원광대학교 약학대학 한약학과 방제학교실 · ²원광대학교
한의학전문대학원 한약자원개발학과 BK 21 Plus Team · ³원광한약연구소

Inhibitory Effect of Water Extracts of Aconiti Lateralis Preparata Radix and Acanthopanax Cortex on Differentiation of Bone Marrow-Derived Adipocytes and Osteoclasts

Kyung-Seon Lee^{1#} · Eun-Sik Choi^{1#} · Sang-Yong Han^{1,2} · Yun-Kyung Kim^{1,3*}

¹Department of Herbal Medicine, College of pharmacy, Wonkwang
University · ²Department of Herbal Resources, Professional Graduate
School of Oriental Medicine, BK 21 Plus Team, Wonkwang University
³Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to evaluate the efficacy of Aconiti Lateralis Preparata Radix (AP) and Acanthopanax Cortex (AT) extracts in bone-derived adipocyte OP9 cell, osteoclast and osteoblast-like MG63 cells.

Methods : MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of AP and AT extracts on OP9, osteoclast and MG63 cells. OP9 cells were treated with AP and AT, and the alterations in fat storage in the cells were determined by the Oil red O. To explain effects of RANKL-induced osteoclast differentiation in bone

marrow macrophages, we performed the TRAP staining. The protein level of CAAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) as a adipocyte differentiation marker, and adiponectin was examined using western blot in differentiated OP9 cells. Effects of related genes were confirmed by luciferase assay using reporter assay.

Results : AP and AT was not toxic on OP9 and MG63 cells, but AT was a little cytotoxic to osteoclast at the dose of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. They could inhibit differentiation of OP9 cells and osteoclast with results of oil red O staining and TRAP staining. By western blot, AP and AT decreased the expression of PPAR γ and C/EBP α which is the key transcription factor in adipogenesis and adiponectin secretion. AT also inhibited the BMP-4 activity in luciferase assay. AP also inhibited BMP-4 and Wnt3a activity, stimulated ER- β activity but inhibited androgen receptor activity.

Conclusions : These results show AP and AT can be useful in osteoporosis and obesity via inhibition of osteoclast and adipocyte differentiation.

Keyword : Osteoclast, Adipocyte, Aconiti Lateralis Radix Preparata, Acanthopanax Cortex, PPAR γ , BMP

I. 서 론

비만이란 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 나타나는 대사성 질환으로 신체활동의 감소 및 과도한 칼로리 섭취로 인해 비만 인구는 급속도로 증가하고 있다^{1,2)}. 비만은 단순히 체중 증가현상만을 의미하는 것이 아니라 고혈압, 고지혈증, 제2형 당뇨병 등과 같은 대사성 질환들과 밀접한 연관이 있어 이러한 질병들의 발병률을 증가시킨다고 보고된 바 있다. 이러한 이유로 비만은 전 세계적으로 심각한 질환으로 여겨지고 있다^{3,4)}.

비만과 더불어 의학의 발달로 노령화 사회가 급속하게 진행되면서 골다공증에 대한 사회적 관심 또한 크게 증가하였는데⁵⁾ 최근에는 젊은 연령층에서도 골다공증이 증가하고 있다⁶⁾. 골은 흡수와 생성의 재조합 과정을 거치는 조직으로 골 흡수를 야기하는 파골세포와 골 생성 기능을 가진 조골세포간의 균형이 중요하다⁷⁾. 특히 파골세포가 비정상적으로 항진된 경우 골 파괴가 증가되어 골다공증이 야기되며 이런 현상은 류마티즘 관절염 같은 골 소실과 밀접한 연관이 있다⁸⁾.

골아세포와 지방세포는 중배엽줄기계의 세포로서 분화할 수 있는 능력을 가진 미분화세포인 인

간 골수 유래 간엽세포로부터 분화되었다는 공통점을 갖는다⁹⁾. 골 질환이 비정상적인 파골세포의 분화와 관련된 것처럼 비만과 관련해 지방세포의 분화가 지방축적에 가장 결정적인 역할을 한다고 알려져 있다. 이러한 지방세포는 지방 전구세포로 존재하는데 다양한 호르몬과 전사인자에 의해 지방세포로 분화하여 지방을 생성한다^{10,11)}. 지방세포는 일반적으로 에너지 항상성 유지, 지방의 합성 및 저장, 호르몬 분비 등의 다양한 역할을 하는 중요한 내분비 조절인자이다. 하지만 지방세포의 비대 및 과형성은 각종 성인병의 원인이 되는 비만을 유발한다^{12,13)}. 따라서 이러한 인자를 억제할 수 있는 방법을 연구한다면 비만의 예방 및 치료에 도움을 줄 것이다. 또한 우리나라 여성인구의 평균수명이 82.3세로 남성에 비해 월등히 증가함에 따라 폐경 이후 여성의 건강문제가 여성노인의 건강문제로 이어지며, 폐경기는 신체적, 생리적, 신경내분비적 변화가 진행되는 시기로 폐경 전 에스트로겐의 골 대사, 지질대사 및 혈관 보호효과가 약화되면서 폐경 후 여성에게 비만, 골다공증 및 심혈관계질환의 건강문제 발생률이 높아지고 있다¹⁴⁾.

이미 양방에서는 비만 개선 약물로는 phentermine,

Authors contributed equally.

* Corresponding author : Yun-Kyung Kim, Department of Herbal Medicine, College of pharmacy, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, 570-749, South Korea.

· Tel : 82-63-850-6803

· E-mail : hestia@wku.ac.kr

• Received : May 21, 2014 / Revised : June 10, 2014 / Accepted : June 15, 2014

Table 1. Extraction yield of medicinal herbs used in this study.

No.	Pharmaceutical name	Korean name	Place of production	Extraction yield (%)
1	Aconiti Lateralis Radix Preparata (AP)	부자	China	20.0
2	Acanthopanax Cortex (AT)	오가피	Korea	7.5

orlistat (Xenical®)과 같은 약품들을 많이 사용하고 있고¹⁵⁾ 골 질환 치료 약물로는 골 흡수 억제제로 bisphosphonates, calcitonin, 부갑상선호르몬제제가 많이 사용하고 있다¹⁶⁾. 하지만 이러한 약물들은 부작용으로 인해 판매중지된 sibutramine (Reductil®)처럼 사용에 주의를 해야 하기 때문에 최근에는 천연물로부터 비만과 골질환 치료에 효과가 있는 소재들을 찾아내고 이들의 작용기전을 밝히는 연구들이 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 저자는 비만과 골 질환에 이중 치료 효과가 있는 한약재에 대해 탐구하던 중 氣味가 맵고 쓰며, 기는 따뜻하며, 心腹 산기와 복통을 치료하며, 기를 북돋아서 다리에 힘이 없거나 소아가 걷지 못하는 증상을 치료하는 데 사용한다고 기재되어 있고¹⁷⁾ 혈압강하, 진정작용, 항 피로 작용, 진해(鎮咳)작용, 관상동맥 확장 작용 등 많은 효능이 기존의 연구들을 통해 밝혀진^{18,19)} 오가피와 전통적으로 신양(腎陽)을 온보(溫補)하는 작용이 뛰어나며, 경구투여 및 족삼리(足三里) 약침이 체중을 감소시킨다²⁰⁾고 보고된 부자가 골수에서 유래한 지방세포 분화와 파골세포 분화에 대한 억제효능과 관련 전사인자에 대한 효과가 있어 이를 보고하고자 한다.

II. 실험재료 및 실험방법

1. 한약재 구입 및 추출

부자 (附子: Aconiti Lateralis Radix Preparata) 와 오가피 (五加皮: Acanthopanax Cortex)는 경북 경산에 위치한 옴니허브에서 구입하여 사용하였다. 한약재의 추출물을 만들기 위해 한약재를 절편으로 잘게 자른 뒤 각 무게의 10배의 3차 증류수에 30분 동안 팽윤하였고, Glas-Col (Terre Haute, IN, USA) Heating mantle을 이용하여 2

시간 동안 환류추출하였으며, 추출액을 여과지 (Advantec No.2 110mm filterpaper)로 여과한 후 여액을 감압농축기 (Rotavapor R-124, Buchi, Switzerland)로 60°C에서 감압농축한 후 동결건조기 (IIShin Freeze Dryer, Bondiro)로 건조하여 최종적으로 파우더 형태로 각각의 실험약물을 얻었다 (Table 1).

2. 시약

OP9 세포와 MG63 세포는 American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA)로부터 구입하였다. Minimum Essential Medium-alpha (MEM-α), Fetal bovine serum (FBS), Penicillin-streptomycin, 0.25% Trypsin/EDTA, Phosphate buffered saline (PBS)은 Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였다. 분화 유도제인 Insulin, Dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 과 Dimethyl sulfoxide (DMSO), Oil red O, Protease inhibitors와 Phosphatase inhibitors는 Sigma-Aldrich Co. (St.Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. XTT kit는 Roche Molecular Diagnostics (Mannheim, Germany)로부터 구입하였다. PPARγ, C/EBPα, β-actin는 Santa cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Adiponectin 은 Cell signaling Tec (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다.

3. 실험동물

실험동물은 수컷 5주령 ICR mice를 오리엔트 바이오로부터 제공받아 온도 24.5±2°C, 습도 50±5%로 조절되는 동물실에서 물과 식이를 자유롭게 섭취할 수 있는 환경에서 사육하였다.

4. 세포 독성검사

세포의 독성검사는 밀집세포의 미토콘드리아

탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 세포를 96well plate에 이식하여 각 추출물의 농도와 시간에 따라 처리한 후 실험이 끝난 세포에 100 μ l의 MTT용액을 넣어 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C를 유지하는 배양기에 배양하였다. 반응이 끝난 후 MTT희석액을 조심스럽게 제거하고 각 well에 100 μ l의 DMSO를 첨가하여 15-20분간 plate shaker로 흔들어 준 후 ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

5. MG63 세포 배양 및 증식

MG63세포는 Minimum Essential Medium- α (MEM- α)에 10%의 fetal bovine serum (FBS), 1%의 penicillin-streptomycin을 첨가하여 배양하였으며, 세포 증식 효과는 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포를 96well plate에 이식하여 부자와 오가피 물 추출물을 농도별로 처리하여 세포의 증식 효과를 분석하였다.

6. OP9 세포 배양 및 분화

지방전구세포인 OP9세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 환경에서 Minimum Essential Medium- α (MEM- α)에 20%의 fetal bovine serum (FBS), 1%의 penicillin-streptomycin을 첨가하여 배양하였다. 지방전구세포인 OP9 세포를 2일 동안 20% FBS, 2mM L-glutamine, 100U/ml Penicillin-Streptomycin이 포함된 α -MEM 배지에서 배양한 후 분화를 유도하였다. 분화유도는 10% FBS가 포함된 α -MEM 배지에 1 μ g/ml insulin, 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-methylxanthine이 포함된 배양액에 2일 동안 배양한 후 10% FBS가 포함된 α -MEM 배지에 1 μ g/ml insulin 포함되어 있는 배양액에 2일 동안 배양한 후 10% FBS가 포함된 α -MEM 배지에 3일 동안 배양을 하여 분화를 유도한다. 부자와 오가피 물 추출물은 분화를 유도하는 0day부터 농도별로 처리하였으며, 배양 9일 후 세포 내 지방생성량을 측정하기 위하여 Oil Red O 용액을 사용하여 염색하였다. 정량분석을 위해

염색된 세포를 세척 후 건조한 다음 isopropanol로 지방을 염색한 Oil red O solution를 추출하여 ELISA reader로 500nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

7. 파골 세포 배양 및 분화

골수세포는 수컷 5주령 ICR mice를 경추 탈골로 희생시킨 후 넓적다리골과 정강골을 분리한 후 1ml 주사기를 이용하여 골의 속질을 수세하여 얻었다. 얻어진 골수세포를 10% FBS, antibiotics, M-CSF (30 ng/ml)가 포함된 α -MEM배지에서 3일간 배양하고 3일 후 plate에 부착된 세포를 포식세포 (bone marrow macrophage, BMM)로 사용하여 실험하였다. 포식세포에 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL (100 ng/ml)을 처리하고, 파골세포 분화 영향을 확인하기 위하여 부자와 오가피 물 추출물을 포식세포에 농도별로 처리하였다. 배양 4일 후, 배양한 세포를 TRAP 용액 (Sigma Aldrich, USA)으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포를 성숙된 파골세포로 간주하고 정량분석하였다.

8. Luciferase assay

한약재의 각각 다른 특징을 규명, 분석하기 위해 luciferase assay를 수행하였다. Luciferase gene 과 estrogen receptor α 또는 β gene, ERE (estrogen responsive element) gene을 넣어 제조한 vector를 293T세포에 transient transfection 시킨 후 stable cell line을 제작하였다. 세포를 2% charcoal로 처리하고 dextran으로 코팅한 FBS (CD-FBS)를 추가한, 페놀레드가 없는 RPMI 배지 100 μ l로 96well plate에 well마다 2 \times 10⁴개를 이식하였다. 24시간 후 한약재 추출물을 다양한 농도로 E2 (17 β -estradiol), DHT (dihydrotestosterone), Gu (glucuronidase)를 처리하거나 처리하지 않고 중복하여 처리하였다. 24시간 후에 배지를 제거하고 세포를 20 μ l lysis buffer로 용해하여 luminometer를 이용하여 luciferase 활성을 측정하였다. Table 2.에는 각 추출물의 EC50, IC50을 계산하여 표시하였다.

9. Western Blot Analysis

실험이 끝난 후 세포를 Scrapper를 이용하여 세

Table 2. Relationship of another factor by luciferase assay.

Receptor	Estrogen receptor β (ER- β)				Androgen receptor (AR)				Wnt3a				BMP4			
	-		E2(1nM)		-		DHT(10nM)		-		Gu		-		Gu	
Ligand	EC50 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)	EC50 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)	EC50 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)	EC50 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)	EC50 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)	EC50 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)	EC50 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)	EC50 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)
Aconit Lateralis Preparata Radix	-	-	>410	-	-	-	-	910	-	530	-	-	-	680	-	450
Acanthopanax Cortex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	-	160

ER binds E2 (17 β -estradiol), AR binds DHT (dihydrotestosterone), GU stands for glucuronidated herbs.
 EC50 = half maximal activation effective concentration.
 IC50 = half maximal activation inhibitory concentration.
 '-' indicates no effect.

포를 모은 후 잔류물질을 제거하기 위하여 1×PBS 를 사용하여 2-3번 세척한다. Radio Immuno Precipitation Assay lysis Buffer (RIPA lysis Buffer, 1% Nonidet P-40, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15M NaCl, 0.01M Sodium phosphate pH 7.2, 2mM EDTA)로 세포를 용해시킨 후 Sonic & Materials INC에서 구입한 Ultrasonic Processor (VC-130PB)로 분쇄 후 12000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 취하여 사용 전까지 -70°C에 보관한다. 분리된 단백질은 Bradford 방법에 따라 정량하고 SDS-PAGE에 전기영동하여 단백질을 분리한 후 Transfer Buffer를 이용하여 PVDF-membrane에 분리된 단백질을 전사시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 T-TBS로 실온에서 1시간 동안 충분히 흔들면서 방치하였다. 반응이 끝난 후 Blocking buffer에 1:1000으로 희석된 1차 항체를 넣고 4°C에서 반응시켰다. 반응 후 T-TBS로 7분 간격으로 3번 세척하고 blocking buffer에 1:5000으로 희석한 2차 항체를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응을 시켰다. TBS-T로 10분 간격으로 3번 세척한 후 ECL kit를 사용하여 발색을 시켜 단백질의 발현정도를 확인하였다.

10. 통계분석

결과는 평균값 \pm 표준편차로 표현하였다. 통계 분석은 Student's *t*-test와 One-way ANOVA를 통해 $p < 0.05$ 인 것을 유의하다고 판정했다.

III. 실험결과

1. 한약재 추출

한약재의 추출물은 실험재료 및 실험방법 1.에 명시되어 있는 방법으로 수행되었으며, 각 한약재의 수율은 부자는 20.0%, 오가피는 7.5%을 수득하였다(Table 1). 완성된 시료는 실험에 사용하기 전까지 -15°C 냉동고에 보관하였으며, 사용하기 전 3차 증류수로 용해 후 사용하였다.

2. OP9세포, 파골세포에 대한 세포독성

지방전구 세포인 OP9과 bone marrow macrophage (BMM)을 파골세포로 분화시켜 각 약물을 농도별로 처리하여 MTT assay에 의해 탐색한 결과 부자 물 추출물의 100 μ g/ml이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았음을 확인하였으나 파골 세포에서 오가피 물 추출물이 100 μ g/ml 의 농도에서는 세포 개체수가 대조군에 비해 20.9%가 감소하였다 (Fig. 1A-B).

3. MG63세포에 대한 세포독성

조골세포인 MG63에서의 세포독성을 확인하기 위해 각 약물을 농도별로 처리하여 MTT assay에 의해 탐색한 결과 50, 100 μ g/ml의 농도에서 세포 독성이 확인되지 않았으며, 부자와 오가피 물 추출물에 의한 조골세포의 증식효과도 확인되지 않았다 (Fig. 2).

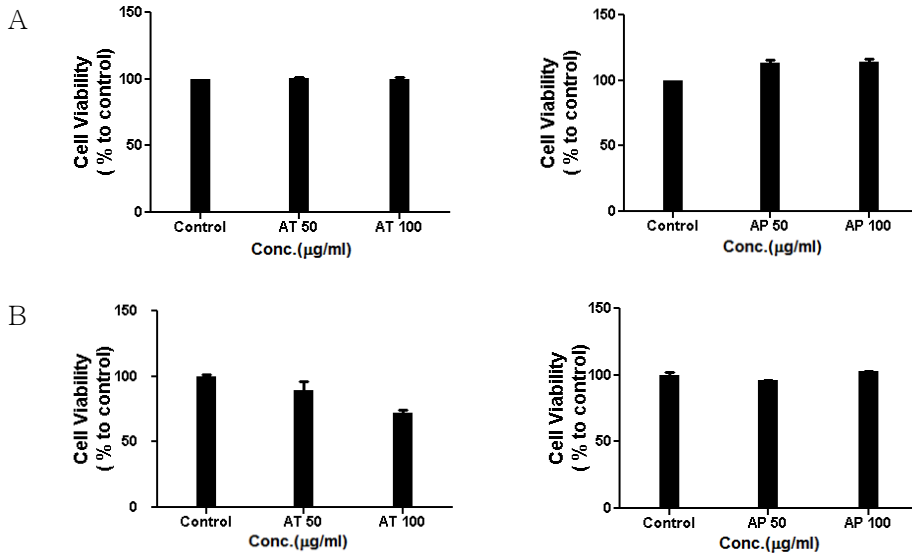


Figure 1. Effect of *Acanthopanax Cortex*(AT) and *Aconiti Lateralis Radix Preparata*(AP) on cell cytotoxicity. (A) OP9 Cells were treated with various concentration of AT and AP. (B) BMMs were cultured 3 days with M-CSF (30 ng/ml) in the presence or absence of AT and AP. The cell viability was evaluated by MTT assay as described in materials and methods. Values are means \pm SD of duplicate.

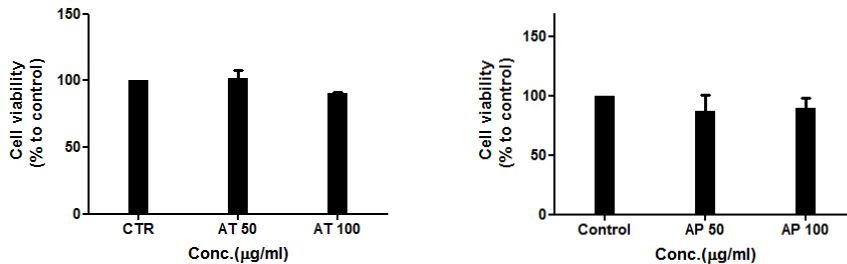


Figure 2. Effect of *Acanthopanax Cortex*(AT) and *Aconiti Lateralis Radix Preparata*(AP) on cell cytotoxicity in MG63 cell. MG63 Cells were treated with various concentration of AT and AP. The cell viability was evaluated by MTT assay as described in materials and methods. Values are means \pm SD of duplicate.

4. OP9세포, 파골세포 분화에 미치는 영향

OP9세포에서 부자와 오가피 물 추출물의 지방 세포분화 억제효과를 확인하기 위하여 OP9세포를 10일 동안 분화유도를 한 후 Oil red O Staining 을 통하여 축적된 지방을 확인하였다. 그 결과 오가피 추출물은 50 μg/ml의 농도에서는 대조군에 비해 41.78%, 100 μg/ml의 농도에서는 45.56% 억제하는 효과를 확인하였으며 부자의 경우 50 μg/ml의 농도에서는 39.98%, 100 μg/ml의 농도에서는

56.96% 억제하는 효과를 확인하였다 (Fig. 3).

파골세포는 골 흡수를 하는 세포로 부자와 오가피 물 추출물로 인한 파골세포의 분화 억제효과를 확인하기 위하여 BMM에 M-CSF와 RANKL 을 처리한 후에 부자와 오가피 물 추출물을 농도 별로 처리하여 배양한 결과 M-CSF와 RANKL만 처리한 대조군에 비하여 부자와 오가피 물 추출물을 처리한 실험군에서 농도 의존적으로 유의성 있게 TRAP 양성 파골세포의 형성 및 다핵의 성

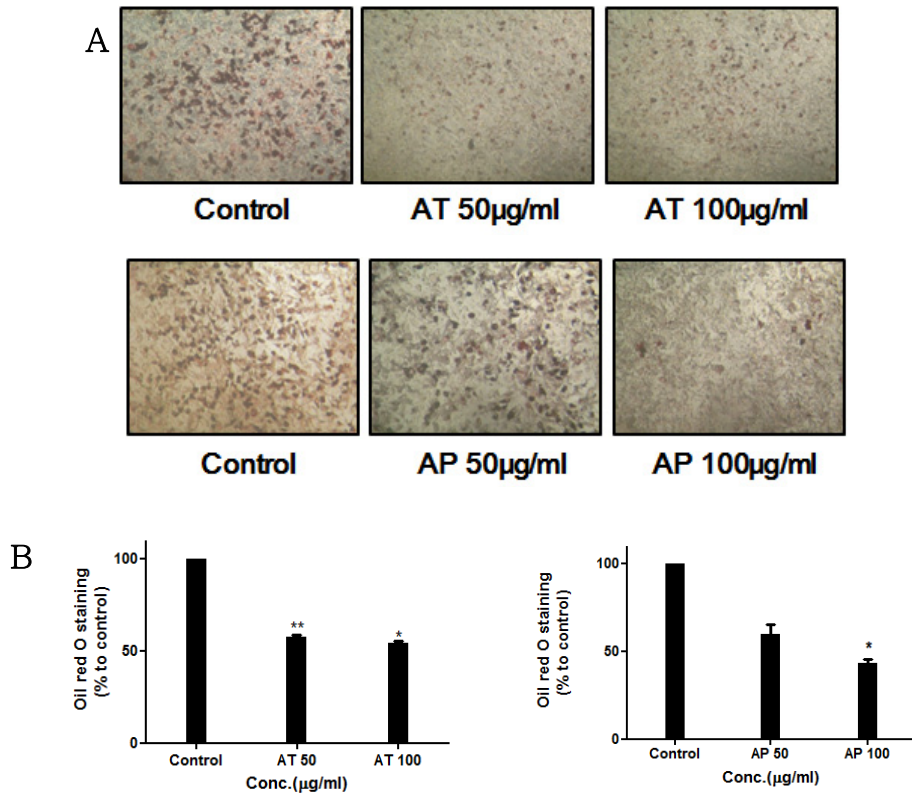


Figure 3. Effect of Acanthopanax Cortex and Aconiti Lateralis Radix Preparata on fat accumulation in OP9 cells adipocyte differentiation.

Cells were incubated with 50 µg/ml and 100 µg/ml concentration of each extractions. For OP9 cells differentiation into adipocyte, Cells were cultured in α-MEM medium containing 1 µg/ml insulin, 1µM dexamethasone and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine for 2 days, and then in α-MEM medium containing 1µg/ml insulin for 2 days. After then α-MEM medium for 3 days. After 10 days, cells were fixed in 10% formalin and stained for Oil red O. Values are means ± SD of duplicates. Significance; * indicates significance for the difference between control and extraction treatment group (* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001).

숙된 파골세포로서의 분화가 억제되었음을 확인하였다 (Fig. 4).

5. 주요 전사인자에 대한 luciferase assay 결과

부자와 오가피 물 추출물의 각기 다른 특징들을 규명, 분석하기 위하여 luciferase assay를 수행하였으며, NFκB, AP-1, ERα (esbone morphogenetic protein trogen receptor α), ERβ (estrogen receptor β), PRE (Progesterone Response Element), AR (androgen receptor), MR (mineralocorticoid receptors), VDRE (Vitamin D response element), TLR 2, 4 (Toll-like receptor 2, 4), Wnt3a, TGF-β, BMP4

(bone morphogenetic protein 4)과의 관련성을 확인하였다. 실험 결과는 luminometer를 이용하여 luciferase 활성을 통해 확인하였으며, Table. 2에는 위의 다양한 인자들 중 부자와 오가피의 효능이 나타나는 것만 명시하였다. 오가피의 경우 Gu를 처리하거나 처리하지 않았을 경우 BMP4 인자의 IC50값이 각각 60, 160 µg/ml로 억제효과가 나타났으며, 부자의 경우 estradiol을 처리 시 ERβ의 EC50값이 410 µg/ml로 나타났으며, DHT 처리 시 AR은 IC50값이 910 µg/ml, Wnt3a는 그 자체로 IC50값이 530 µg/ml, Gu를 처리하거나 처리하지 않았을 경우 BMP4의 IC50값이 각각 680 µg/

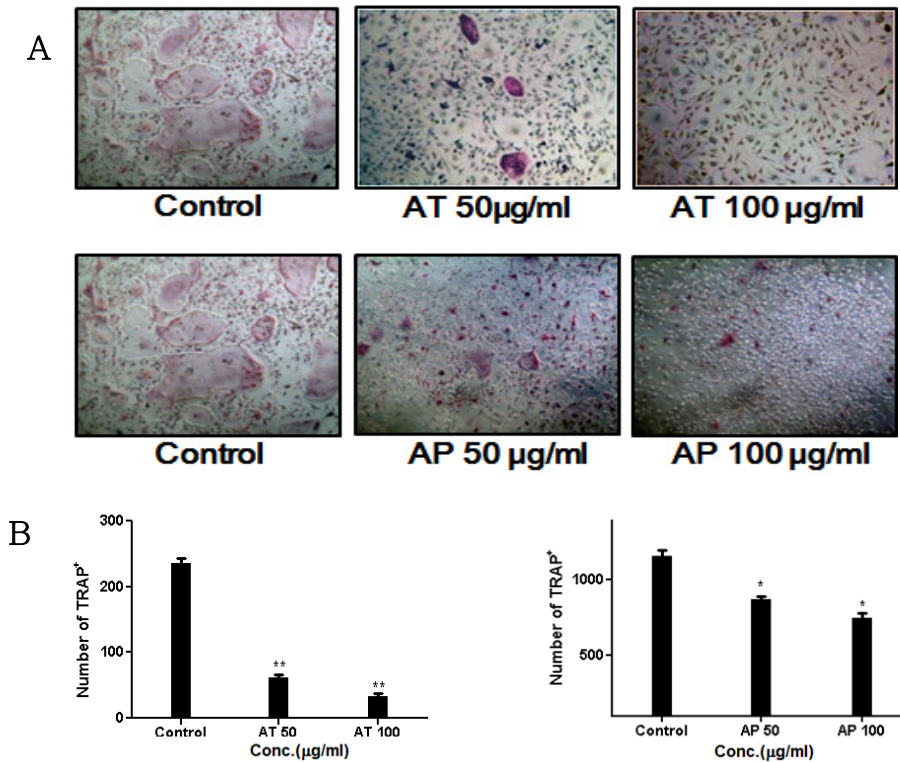


Figure 4. Acanthopanax Cortex and Aconiti Lateralis Radix Preparata inhibits osteoclast differentiation. Bone marrow macrophages (BMMs) were cultured for 4 days with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml) in the presence or absence of Acanthopanax Cortex and Aconiti Lateralis Radix Preparata. After 4 days, cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized in 0.1% Triton x-100, and stained for TRAP. Values are means \pm SD of duplicates. Significance; * indicates significance for the difference between control and extraction treatment group (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

ml, 450 µg/ml로 나타났다.

6. 부자와 오가피 물 추출물의 지방세포 분화 전사인자에 미치는 영향

지방전구세포가 성숙된 지방세포로 분화되는 과정에서 오가피 물 추출물의 억제효과를 확인한 바 지방세포 분화에 있어서 관련된 단백질의 발현을 western blot analysis를 통하여 확인하였다. 성숙한 지방세포의 분화에 있어 지방세포 유전자의 조절부위에 중요한 전사활성인자가 활성화되어야 하는데 이들 중 가장 잘 알려진 두 가지는 C/EBP (CCAAT enhancer-binding proteins)과 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)로

이들은 지방세포 유전자 조절부위와 상호작용하여 지방세포 분화를 촉진시킨다. 지방세포에 Dexamethasone, IBMX, insulin과 같은 분화유도제를 처리하여 분화를 유도한 후 분화를 유도하지 않은 normal군과 비교하였을 때 지방세포 분화의 관련인자인 PPAR γ , C/EBP α 그리고 Adiponectin의 발현이 증가됨을 확인하였으며, 이에 부자와 오가피 물 추출물 처리군에서는 PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin의 단백질 발현이 분화군보다 감소됨을 확인한 결과 부자와 오가피 물 추출물이 지방세포의 분화에 억제 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 5).

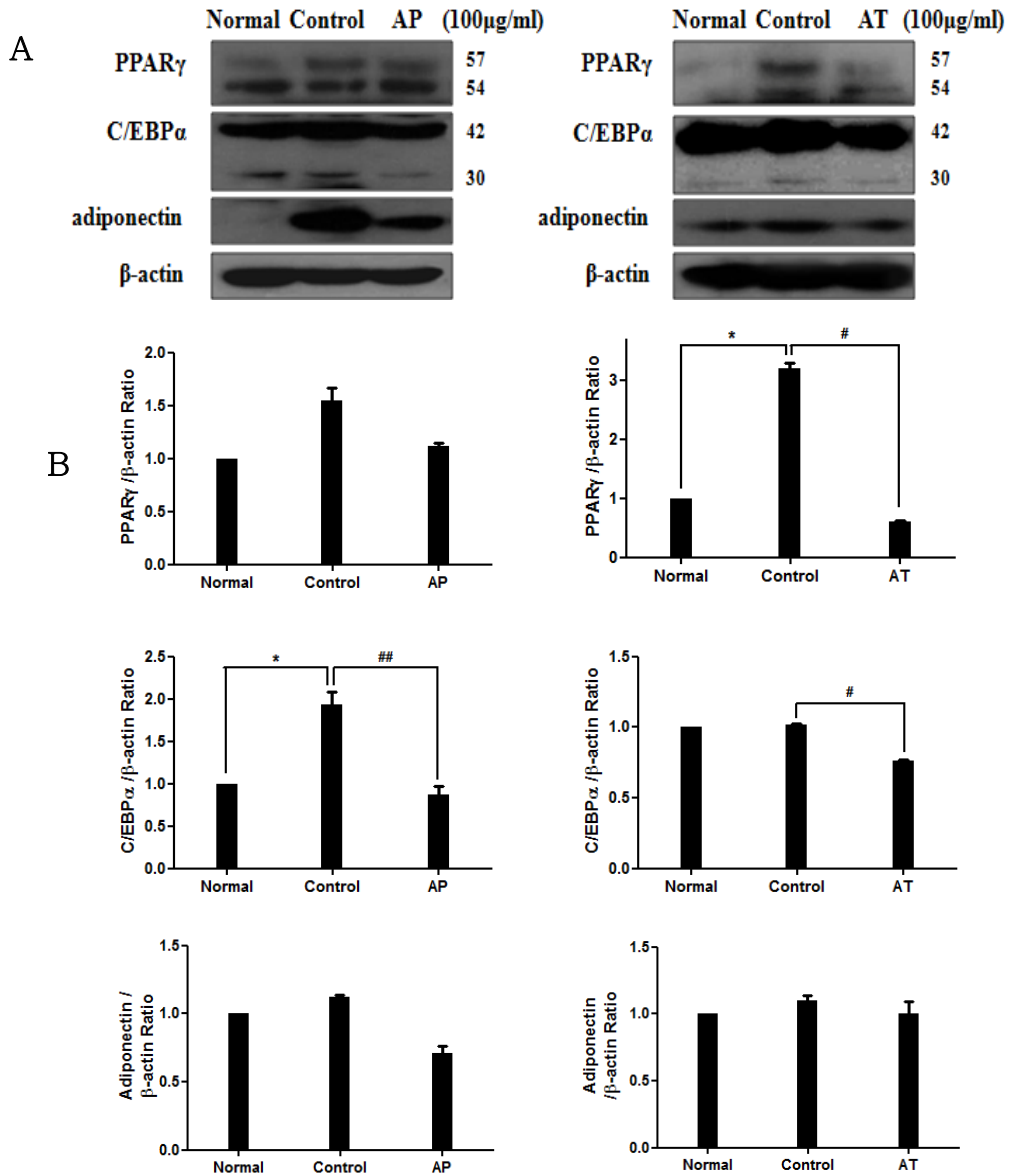


Figure 5. Effect of water extractions on protein expression in OP9 cell. (A) Level of protein expression in OP9 cell by western analysis. (B) Quantitative analysis by Image J Program. Significance; * indicates significance for the difference between normal and control group (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). # indicates significance for the difference between control and extraction treatment group (# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001). Error bars indicate SDs; N=3.

IV. 고찰

오가피(五加皮)는 두릅나무과에 속한 낙엽관목으로 오갈피나무의 뿌리, 줄기 및 가지의 껍질이

거풍습(祛風濕) 강근골(強筋骨)하기 때문에 각종의 관절염을 치료하고 온신화습(溫腎化濕) 하기 때문에 습(濕)으로 인한 수종을 다스리며, 보간신(補肝腎)하기 때문에 간신흔손(肝腎虧損)으로 인

한 근골무력(筋骨無力) 및 위약(痿弱)을 다스린다. 성분으로는 정유 성분인 4-methylsailcyl aldehyde, tannin, plamitin 산, linolen 산, vitamin A·B가 함유되고, sesamin, savinin, syringaresinol, monoglucoside, diglucoside 등의 lignan류도 함유되어 있으며, daucosterol, 강심배당체, saponin 등이 함유되어 있다²¹⁾.

다양한 성분의 함유와 효능을 갖고 있는 오가피를 이용한 연구로는 본 연구와 관련하여 TRAP 및 matrix metalloproteinase-9 유전자 발현을 억제하여 골골세포 형성억제효과²²⁾, 항산화 효과 및 조골세포의 세포생존력과 증식률, alkaline phosphatase (ALP) 활성 효과²³⁾, 지방세포에서 lipoprotein lipase (LPL) 활성을 증가시키고 부분적으로는 Tumour necrosis factor- α 에 의해 lipoprotein lipase 억제를 역전시켜 혈장내 triglyceride를 제거하는 조력자로서의 작용 가능성이 확인되었으며²⁴⁾, 섬오갈피나무의 잎에서 분리된 혼합물이 골아세포의 세포성장과 분화를 촉진하여 골형성에 직접적인 영향을 주어 골다공증 예방에 효과적임이 보고된 바 있다²⁵⁾.

이외에도 당뇨유발 억제 및 신장보호 활성에 미치는 효과²⁶⁾, 류마티드 관절염에 미치는 효과²⁷⁾ 등이 있으며 항암, 면역, 비만 등 인체의 생리활성에 미치는 영향에 대한 보고는 아직 미비한 실정이다.

부자(附子)는 중국원산인 *Aconitum carmichaeli* Debeaux (Ranunculaceae, 미나리아재비과) 및 그 동속 식물의 괴근으로서 예로부터 한방에서 강심, 이뇨, 및 진통제 등으로 널리 쓰여 온 생약으로 주요성분은 diterpene alkaloid로 aconitine, hypaconitine, mesaconitine 등의 독성을 가진 성분을 포함하고 있다²⁸⁾. 관련 연구로는 신세포암의 증식억제 및 세포사멸에 미치는 효과²⁹⁾와 부자약침과 경구 투여시 2형 당뇨 동물 모델인 db/db mice에서 항당뇨 효과³⁰⁾가 있다고 보고되었으며, 갑상선호르몬의 합성을 촉진하면서 부자로 인해 간과 신장에 심각한 독성을 유발시키지 않았으며, 혈당과 지질 대사에도 영향을 미치지 않는³¹⁾ 등 다양한 분야에서 연구가 되고 있지만 아직 부족한 상태이다.

현재 비만과 골 질환은 전 세계적으로 단순히 개인적인 문제를 넘어 사회적인 문제가 되고 있으며²⁵⁾, 2010년 국민건강영양조사 결과에 따르면 골다공증유병률 (만50세이상)은 여자 34.9%, 남자 7.8%로 50세 이상 여자 3명 중 1명은 골다공증을 앓고 있는 것으로 나타나며, 비만유병률 (만 19세 이상, 표준화)은 남자의 경우 1998년 25.1%에서 2007년 36.2%로 증가하여 2010년까지 3년간 36%정도를 유지하고 있으며, 여자의 경우 1998년부터 2010년까지 26% 수준으로 유지되고 있다. 또한 전체 31.4%, 남자 36.5%, 여자 26.4%로 남자가 여자보다 10%정도 높았으나, 60대 이후 여자의 비만유병률이 남자보다 높아져 70대 이상에서는 여자의 유병률이 남자보다 10% 높게 나타난다³²⁾ 고 한다. 이 결과로 골다공증과 비만의 유병률이 50대 이상의 여자에게서 높게 나타나므로 여성노인의 건강문제에 대한 관심이 높아지고 있다. 이는 폐경 후 에스트로겐의 골 대사, 지질대사 및 혈관 보호효과가 약화되면서 비만, 골다공증 및 심혈관계질환의 발생률이 높아지는 것으로 파악된다. 폐경기이후 체중 증가의 기전은 폐경 후 신체에 콜레스테롤이 에스트로겐으로의 전환율이 감소하면서 혈중 콜레스테롤 수치가 상승하고, 지방조직의 증가는 내장 지방량을 증가시켜 복부비만이 많아지게 된다³³⁾고 알려져 있다. 폐경기 비만과 함께 동반되는 또 다른 문제는 골다공증으로, 폐경 후 여성은 에스트로겐 호르몬의 골 흡수 억제효과가 사라지면서 골 흡수가 증가되고 장에서 칼슘의 흡수가 감소되어 현저한 골 소실이 초래되어 여성의 골절 위험을 크게 증가시킨다³⁴⁾.

골다공증이 있는 노인의 뼈는 지속적으로 골량이 감소하고 동시에 골수에서 지방세포가 증가한다고 보고된 바 있다. 기존 연구결과에 의하면 골수 기질세포에서 지방세포분화와 조골세포분화가 역 상관관계에 있어, 결과적으로 지방세포 분화억제 시 골형성을 촉진시킬 수 있다는 개념이 제시되었다³⁵⁾. 또한 중배엽줄기세포 운명을 지방세포에서 조골세포로 효율적으로 전환하는 것은 bone morphogenic protein(BMP)으로, 주요 골형성 유

도인자로서 작용하며 또한 지방세포 분화에 영향을 줄 수 있다³⁶⁾.

중배엽줄기세포 분화 중 근골격계의 발생에 관여하는 중요한 신호전달체계는 크게 TGF (transforming growth factor)- β / BMP (bone morphogenetic protein), Wnt/ β -catenin, FGF (fibroblast growth factor), Hedgehog, Notch 등을 들 수 있다. 이들은 각자 특정한 역할이 있으며 서로 상호작용을 하면서 골형성을 조절한다. 이에 BMP는 이소성으로 골형성을 하는 특징으로 명명되었으나 이들의 더욱 중요한 역할은 개체 발생에서 세포의 증식, 분화, 이동을 조절하여 장기 발생을 유도하는 것이라 볼 수 있으며, BMP 중에서 BMP-2, BMP-4, BMP-7이 강력한 골유도 인자로서 작용이 있는 것으로 알려져 있으며³⁷⁾, *in vitro* 와 *in vivo* 연구를 통해 BMP-2, -4, -6, -7, -13인자가 중간엽줄기세포에서 지방세포분화와 골형성에 유도한다고 알려져 있다³⁸⁾.

Wnt는 지질이 결합된 여러 당단백의 그룹으로서 세포 운명의 결정, 극성, 분화, 이동 등 여러 현상에 관여하며 발생에 있어 체간과 사지의 축형성에 중요한 신호를 보내는 작용을 한다³⁷⁾. Wnt pathway는 지방 형성을 유도하는 PPAR γ 와 CCAAT/enhancer binding protein α 의 발현을 억제하며 골형성과 관련된 Runx2, Dlx5 와 Osterix 상승 조절에 관여되며 Wnt pathway의 다른 메카니즘에는 골형성을 유도하는데 관여되어 있다³⁹⁾.

중배엽줄기세포 분화에 있어서 작용기작과 파골세포 분화와 지방세포 분화, 조골세포의 분화 중 관여된 조절인자를 확인하여 부자와 오가피가 이들의 분화에 미치는 영향을 알아보았다. 이들 인자 중 오가피의 경우 BMP4 에 억제 효과가 있었으며, 부자의 경우 Wnt3a, BMP4에 억제효과가 있음을 luciferase assay를 통해 확인하였다.

또한 지방세포의 분화에 있어 유전자의 조절부위에 전사활성인자가 활성화 되는데⁴⁰⁾, 지방생성에 관여하는 전사인자에는 peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs), CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) 그리고 sterol regulatory element binding protein (SREBP) family 등이

있으며⁴¹⁻⁴⁴⁾, 분화초기에 insulin, dexamethasone 및 cAMP 등과 같은 hormonal cocktail에 의하여 일시적이고 빠르게 발현되는 C/EBP β 및 C/EBP δ , 분화후기에 발현되어 adipose-specific 유전자 발현을 활성화함으로써 분화를 촉진하여 분화과정을 완성하는데 관여하는 PPAR γ 와 C/EBP α 가 있다⁴⁵⁻⁴⁷⁾. Adiponectin은 지방 세포에서 분비되는 cytokine으로 혈중 유리지방산을 줄여주고 인슐린의 작용을 도와주며 포도당의 이용을 자극하고 간의 지방산 산화를 증가시키며 간의 지방산 합성을 감소시키는 작용을 통하여 인슐린 민감도를 개선시킨다. 또한 포도당을 잘 흡수되게 하여 대사가 활발해지도록 하므로⁴⁸⁾ adiponectin은 지방 생성에서 중요한 역할을 하는데, 골수유래 OP9세포에서 부자와 오가피가 지방의 생성을 억제하고 부자와 오가피 추출물이 그와 관련된 단백질인 PPAR γ , C/EBP α 그리고 adiponectin의 발현량을 감소시킴을 확인하였다.

파골세포인 BMM의 분화에 있어서는 RANK와 RANKL이 결합되면서 c-Fos와 NFATc1의 발현이 증가되고 tartrate-resistant acid phosphate (TRAP), osteoclast-associated receptor (OSCAR)의 발현 또한 상승시킨다고 알려져 있다⁴⁹⁾. 부자와 오가피로 인해 TRAP 형성이 억제됨을 확인하였으며, 조골세포의 분화에 있어서는 영향을 주지 못하였다.

이상의 결과로 BMM의 파골세포 분화과정, 지방세포인 OP9, 조골세포인 MG63 세포를 통해 부자와 오가피가 지방세포의 분화에 있어 지방 생성을 억제하며 지방세포 분화에 관여되어 있는 단백질인 PPAR γ , C/EBP α 그리고 adiponectin의 발현 또한 억제효과를 확인하였으며 파골세포의 분화억제 효과를 확인하여 노년기 골다공증과 비만 치료효과를 보일 수 있다고 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서 부자와 오가피의 물 추출물이 골수에서 유래된 지방세포, 파골세포, 조골세포의

분화의 억제효과를 살펴보고자 하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 골수유래 OP9세포에서 부자와 오가피의 물 추출물로 인한 세포 독성은 없었으며, 지방세포의 분화에 있어 지방 생성 억제 효과를 oil red O 염색을 통해 확인하였다.
2. 골수유래 OP9세포에서 부자와 오가피의 물 추출물이 지방세포 분화와 관련된 단백질인 PPAR γ , C/EBP α 그리고 adiponectin의 발현 억제효과를 확인하였다.
3. Bone marrow macrophage를 파골세포로 분화 시킴에 있어 오가피의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 약간의 세포 독성이 있었으며, 부자의 경우 세포 독성이 없었다. 부자와 오가피는 파골세포의 분화 억제효과가 있음을 TRAP 염색을 통해 확인하였다.
4. 부자의 경우 ER β (estrogen receptor β) 수용체 활성화에 상승효과가 있으며, AR (androgen receptor), Wnt3a, BMP4 수용체에 억제효과가 있음을 확인한 바 이 중 Wnt3a 수용체의 경우 Wnt pathway로 지방형성을 유도하는 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현을 억제하는 작용인자로 지방세포 분화 억제 효과에 연관되어 있음을 확인하였으며, BMP4 수용체의 경우 지방세포의 분화와 골형성에 유도에 작용하는 인자로 골형성보다는 지방세포분화의 억제에 관여하였음을 확인하였다. 오가피의 경우 BMP4 수용체에 억제 효과가 있음을 Luciferase assay를 통하여 확인하였다.

이러한 결과들을 종합해 볼 때 부자와 오가피 추출물이 노년기 골다공증과 비만 치료효과를 보일 수 있다고 생각되며 향후 추가적인 연구가 더 필요하다.

감사의 글

이 논문은 한국연구재단 일반연구지원사업

NRF-2012R1A1A3013455의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Park JA, Park C, Han MH, Kim BW, Chung YH, Choi YH. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by aged Black Garlic Extracts in 3T3-L1 preadipocytes. *J Life Sci.* 2011; 21(5): 720-728.
2. Park SJ, Lee IS, Lee SP, Yu MH. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by supercritical Fluid Extracts and Marc from *Cinnamomum verum*. *J Life Sci.* 2013; 23(4): 510-517.
3. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature.* 2000; 404(6778): 635-643.
4. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001; 104: 531-543.
5. Parfitt AM. Bone remodeling: Relationship to the amount and structure of bone the pathogenesis and prevention of fractures. In: Osteoporosis, Etiology, Diagnosis and Management. Melton L,J(ed). New York: Reven Press. 1988; 45-93.
6. Stein GS, Lian JB, Wijnen AJ, Montecchino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol.* 1996; 76: 593-629.
7. Rodan GA, Marti TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 2000; 289(5484): 1508-1541.
8. Okamoto K, Takayanagi H. Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011; 13(3):219. Review.
9. Qiao C, Xu W, Zhu W, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol int.* 2008; 32: 8-15.
10. Darlington GJ, Rose SE, MacDougald OA. The

- role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 1998; 273: 30057-30060.
11. 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: 22-26.
 12. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 316: 129-139.
 13. Alessi MC, Lijnen HR, Bastelica D, Juhan-Vague I. Adipose tissue and atherothrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003; 33: 290-297.
 14. Masse PG, Tranchant CC, Dosy J, Donovan SM. Coexistence of osteoporosis and cardiovascular disease risk factors in apparently healthy, untreated postmenopausal women. *Int J Vitam Nutr Res.* 2005; 75(2): 97-106.
 15. Apfellbaum M, Vague P, Ziegler O, Ilanotin O, Thomas F, Leu-tenegger E. Long-term maintenance of weight loss after a very low calorie diet; Efficacy and tolerability of sibutramine. *Am J Med.* 1999; 106: 179-184.
 16. Pole HAP, Felsenberg D, Hanley DA, Stenpan J, Munoz-Torres M, Wolkins TJ, Qui-Sheng G, Galich M, Vandormael K, Yates AJ. Multinational placebo-controlled, randomised trial of the effects of alendronate on bone density and fracture risk in postmenopausal women with low bone mass: Results of the FOSIT. *Osteoporosis Int.* 1999; 9: 461-468.
 17. Chu J. Bon-Kyung-So-Jeung. Seoul: Daeseong medical publishers, 2001: 565-566.
 18. S Nishibe, H Kinoshita, H Takeda, G Okano. Phenolic compounds from stem bark of *Acanthopanax senticosus* and their pharmacological effect in chronic swimming stressed rats. *Chem Pharm Bull.* 1990; 38(6): 1763-1765.
 19. T Fujikawa, A Yamaguchi, I Morita, H Takeda, S Nishibe. Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. *Biol Pharm Bull.* 1996; 19(9): 1227-1230.
 20. Lee GM, Kim KS, Jang JD, Kim KY. Study of Aconiti tuber on normal Rats : change of body weight, transaminase. *The journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society.* 1999; 16(1): 269-282.
 21. Professors of Herbology, College of Oriental Medicine. Herbal medicine. Seoul: Yeongnim publishers, 1999: 283-284.
 22. Lee SM. Inhibitory effects of acanthopanax cortex on the osteoclast formation. Dept. of Herbal Medicine. Semyung University Graduate School. 2007.
 23. Im SY, Im JY, Lee CS, Jang YJ, Park JY, Yun S. Antioxidant and cell proliferation effects of *Acanthopanax senticosus* for extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. *Korean J FOOD SCI. TECHNOL.* 2007; 39(6): 694-700.
 24. Yang JY, Lee KS, Kim MK, Moon SK, Kang MK, Park BH, Kim JS, Park JW. Effect of *Acanthopanax senticosus* on lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res.* 2004; 18(2):160-3.
 25. Park SH, Nhiem NX, Kiem PV, Choi EM, Kim JA, Kim YH. A new norlupane triterpene from the leaves of *Acanthopanax koreanum* increases the differentiation of osteoblastic MC3T3-e1 cells. *Arch Pharm Res.* 2010; 33(1): 75-80.
 26. Jeoung JH, Lee YH, Kang SG. Preventive effect on development of diabetes and renoprotective Effect of *Acanthopanax Senticosus* aqua-acupuncture in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic rats. *The Acupuncture.* 2003; 20(3): 1-14.
 27. Kim HC, Lee SI, Ahn DK. Effect of

- Acanthopanax Cortex on the IL-8 production in human monocyte as a rheumatoid arthritis remedy. *The Korea Journal of Herbology*. 1995; 10(1): 49-58.
28. Han DS. *Pharmacognosy*. Gyeonggi-do: Dongmyeong publishers, 1997: 156.
29. Kim JH, Choi YH, Hwang WD. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by methanolic extract of Aconiti Tuber in human renal cell carcinoma cells. *The Journal of Korean Oriental Internal Medicine*. 2008; 29(1): 42-66.
30. Jeong HS. Effects of Cinnamomum Cassia and Aconitum Carmichaeli 's phamacopuncture and oral administration on blood sugar in Type II diabetic mice. *Woosuk University Graduate School*, 2009: 37-39.
31. Lee SH, Lee BC, Ahn YM, Doo HK, Ahn SY. The Effects of Aconiti Radix on thyroid function in hypothyroidism rat model induced by 6-propyl-2-thiouracil (PTU). *The Journal of Korean Oriental Internal Medicine*. 2007; 28(2): 275-283.
32. Ministry of Health and Welfare. 2010 National Health Statistics. 2011: 52, 68.
33. Broussard DL, Magnus JH. Coronary heart disease risk and bone mineral density among U.S. women and men. *J Womens Health*. 2008; 17(3): 479-490.
34. So HY, Ahn SH, Song RY, Kim HL. Relationships among obesity, bone mineral density, and cardiovascular risks in post-menopausal women. *Korean J Women Health Nurs*. 2010; 16(3): 224-233.
35. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci*. 1992; 102: 341-351.
36. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66: 236-253.
37. Im KI. Intracellular signal transduction pathways and transcription factors for osteogenesis. *Korean College of Rheumatology*. 2008; 15(1): 1-10.
38. Quan Kang, et al. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009; 18(4): 545-558.
39. Jeong Hwan Kim, et al. Wnt Signaling in Bone Formation and Its Therapeutic Potential for Bone Diseases. *Ther Adv Musculoskel Dis*. 2013; 5(1): 13-31.
40. Wellman NS, Friedberg B. Causes and consequences of adult obesity: health, social and economic impacts in the united States. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2002; 11 Suppl 8: S705-S709.
41. Wyatt SB, Winters KP, Dubbert PM. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health prolem. *Am J Med Sci*. 2006; 331: 166-174.
42. Choi WH. Differentiation of adipocyte. *Korean J Obes*. 1999; 8(1): 3-7.
43. Burns RP, Kim JB, Hu E, Altiock S, Spiegelman BM. Adipocyte differentiation; a transcriptional regulatory. *Curr Opin Cell Biol*. 1996; 8: 826-832.
44. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998; 78: 783-809.
45. Saitoa T, Abea D, Sekiya K. Flavanone exhibits PPAR γ ligand activity and enhances differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 380: 281-285.
46. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Regulation

- of adipocyte of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev.* 1995; 5: 571-576.
47. Freytang SO, Paielli DL, Gilbert JD. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev.* 1994; 8: 1654-1663.
48. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000; 14: 293-307.
49. Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Hata K, Reddy SV, Yoneda T. Activation of NFAT signal in vivo leads to osteopenia associated with increased osteoclastogenesis and bone-resorbing activity. *J Immunol.* 2006; 177(4): 2384-2390.