

차전초의 에탄올추출물이 3T3-L1 지방세포의 지방축적 및 지질대사에 미치는 영향

전서영^{1,2#}, 박지영², 신인순², 김성옥², 안희덕³, 김미려^{1,2,4*}

1 : 한의치료기술과학화 사업팀(BK 21 Plus), 2 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실,
3 : 대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과, 4 : (재)대구TP 한방산업지원센터

Ethanol extract of *Plantago asiatica L.* controls intracellular fat accumulation and lipid metabolism in 3T3-L1 Adipocytes

Seo Young Jeon^{1,2#}, Ji Young Park², Insoon Shin²,
Sung Ok Kim², Hee Duk An³, Mi Ryeo Kim^{1,2,4*}

1 : Team for Scientification of Korean Medical Intervention (BK21 Plus),

2 : Dept. of Herbal Pharmacology, Coll. of Oriental Medicine, Daegu Haany Univ. Daegu, Republic of Korea

3 : Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, Coll. of Oriental Medicine, Daegu Haany Univ. Daegu, Republic of Korea

4 : Korean Medical Industry Support Center, Daegu Technopark, Daegu, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The effects of ethanol extract of *Plantago asiatica L.* were investigated on adipocyte differentiation, lipopogenesis, lipolysis and apoptosis using differentiated 3T3-L1 adipocytes.

Methods : *Plantago asiatica L.* was extracted with ethanol (CCE). We carried on MTT assay for cell proliferation, Oil Red O staining for determination of cell differentiation and intracellular adipogenesis, TUNEL staining assay for cell apoptosis, and Western blot analysis for measurement of pAMPK and pACC, C/EBP α , PPAR γ protein expressions were performed.

Results : The addition of CCE up to 0.2 mg/ml into cell culture media showed no cytotoxicity. Treatment of 0.2 mg/ml CCE significantly inhibited differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. Lipid accumulation of the CCE treated cells was decreased compared with that of control. Induction of cell apoptosis was increased in CCE treated cells compared with that of control. AMPK and ACC levels of the cells with 0.2 mg/ml CCE were led to phosphorylation and also expressions of C/EBP α and PPAR γ , as adipogenic transcription factors, were suppressed compared with those of control.

Conclusions : Taken together, these results provide evidence that CCE has a regulatory role in lipid metabolism that is related to differentiation into adipocytes, adipogenesis and apoptosis.

Key words : *Plantago asiatica L.*, differentiation, adipogenesis, apoptosis, anti-obesity.

서론

비만(Obesity)은 비정상적인 체내 에너지대사 조절에 의한 지방의 과다 축적으로 인한 현상으로 여러 대사성 질환의 주

요 병인으로 주목받고 있다¹⁾. 의학적인 측면에서 비만은 순환기계질환, 암, 중풍 등과 같은 성인병의 발병률을 증가시키는 데 특히 동물성 지방의 과다 섭취로 인한 고혈압, 동맥경화, 심근경색과 같은 질병²⁾의 증가가 두드러진다. 뿐만 아니라 외

*교신저자 : 김미려, 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, (재)대구테크노파크 한방산업지원센터

· Tel : 053-770-2300 · E-mail : mrkim@dhu.ac.kr

#제1저자 : 전서영, 대구광역시 수성구 상동 165번지 대구한의대학교 한의과대학 한의학과 본초약리학연구소

· Tel : 010-2548-8672 · E-mail : seoyid@naver.com

· 접수 : 2014년 6월 15일 · 수정 : 2014년 7월 16일 · 채택 : 2014년 7월 16일

관상의 문제를 일으켜 심리적, 사회적으로 개인을 위축시킬 뿐만 아니라 우울증, 수면 호흡장애 등 심각한 질환³⁻⁵⁾을 일으키기도 한다. 이러한 비만 유발의 원인으로는 과도한 지방 세포의 분화 증가, 에너지 섭취와 소비간의 불균형, 서구화된 식습관 및 유전적 요인⁶⁾ 등이 있다. 세계보건기구(WHO)는 비만으로 매년 260만 명이 사망하는 가운데 2015년 전세계 비만인구가 15억 명으로 증가하여 심각한 건강문제를 양산할 것이라고 보고⁷⁾하고 있다.

비만연구의 *in vitro* 세포 모델로 많이 사용되는 3T3-L1 세포는 생쥐의 섬유모세포에서 유래된 전지방세포(pre-adipocyte)로서 분화가 진행될수록 지방세포에서만 발현되는 다양한 전사인자들에 의해 지방축적에 관여하는 효소들이 활성을 가지게 되며, 그 결과 지방세포로서의 형태를 갖추게 되어 세포내 지방을 축적한다. 이러한 지방세포형성(adipogenesis) 과정에는 세포의 형태, 유전자 및 단백질의 발현, 호르몬 민감성의 변화 등이 동반⁸⁻⁹⁾되며, 지방세포형성의 분자적인 기전에는 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) 및 cytidine-adenosine-adenosine-thymidine (CCAAT)/enhancer binding proteins (C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ) 등과 같은 지방합성 전사인자 등이 주요한 조절자로서 관여¹⁰⁾하는 것으로 알려져 있다. C/EBP α 와 PPAR γ 는 분화 후기에 발현되어 지방세포에 특이적인 유전자의 발현을 활성화시킴으로써 분화를 더욱 촉진시켜 분화과정을 완성¹¹⁾시키고, 성숙한 지방세포 생성을 위한 인슐린 감수성에 중요한 역할을 담당한다¹²⁾. 따라서 항비만 연구 영역 중의 하나인 전지방세포의 분화감소, 지방합성 및 분해조절과 지방세포의 apoptosis 유도 등 지방세포의 지방저장 조절에 관여하는 비만 치료제의 개발을 위해 전 세계적으로 다양한 연구들이 수행¹³⁻¹⁴⁾되고 있다. 그러나 시판되는 항비만 약물들 대부분이 혈압 상승, 복통, 불안, 두통 등과 같은 심각한 부작용¹⁵⁻¹⁷⁾을 가지고 있어 안전성이 확보된 우수한 효능의 항비만 물질의 개발이 절실히 요구되고 있다.

차전초(車前草, *Plantago asiatica*)는 질경이과(Plantaginaceae)에 속하는 다년생 초본으로 전세계에 3속 300종이 분포하고 있으며 '질경이'라고도 불린다. 전국에 야생하며 일본, 사할린, 중국, 동시베리아, 말레시아 등에 분포하며 풀밭이나 길가 또는 빈터 등에서 흔히 자란다. 예로부터 거담, 항균, 진해 작용 등의 약리작용 때문에 민간요법의 약재로 많이 사용되어 왔으며 호흡중추에 작용해서 기침을 멈추고 기관 내의 점막, 소화액의 분비를 촉진시키고 천식, 위장병, 이뇨, 설사, 심장병 등 다양한 생리활성을 가지고 있음이 알려져 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 차전초의 성분으로는 aucubin, disaccharide I-IV, plantagin, plantenolic acid, adenine, choline 등이 보고되고 있으며, 렛드에서 차전초 추출물 단회와 14일, 90일 반복투여 시험을 한 결과, 일반 독성 및 유전독성에 대한 안전성이 확보되어 있다^{21,22)}.

따라서 본 연구에서는 비만 치료와 관련하여 천연물로부터 지방세포분화억제, 지방생성과 축적억제 및 apoptosis 유도 활성을 가지는 항비만제를 개발하고자 차전초 에탄올 추출물을 대상으로 생쥐 전지방세포인 3T3-L1 preadipocyte를 이용하여 지방세포로 분화 시 지방축적과 이에 관여하는 효소들의 활성을 측정하여 항비만 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재 및 추출방법

본 실험에 사용된 차전초는 믿음당 건재상(서울)으로부터 전초를 구입하여 대구한의대 본초학교실에서 감별, 염선하였으며 증류수로 깨끗하게 세척한 후 이물질을 제거하고 실험에 사용하였다. 차전초의 건조 약재 600 g에 10배의 95% 에탄올을 가하고 상온에서 2시간 침지시킨 후, 거즈로 1회 거르고 여과지(Whatman, 1440-320)로 여과하였다. 수거한 여과액을 rotary evaporator (N-1110V, EYELA, Japan)로 감압 농축한 후 동결 건조하여 8.6%의 수득율을 갖는 건조물을 얻었으며, 이를 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Dexametason (DEX), 3-[4,5-dimethyl thiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DM SO), insulin, fenofibrate, Oil-red O 시약은 Sigma Aldrich사(USA)에서 구입하였으며, high-glucose Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM), bovine calf serum (BCS), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (P/S), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), electrochemiluminescence (ECL)은 Thermo Scientific사(USA)에서 구입하였다.

AMP-activated protein kinase (AMPK), pAMPK, acetyl CoA carboxylase (ACC), pACC 항체는 cell signaling technology사(USA)에서 구입하였고, PPAR γ , C/EBP α , β -actin 1차 항체 및 2차 항체는 Santa Cruz사(USA)에서 구입하였다. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane은 MILLIPORE사(USA)에서 구입하였다. 양성대조군으로 쓰인 rosiglitazone (Rosi)은 Enzo사 (USA)에서 구입하였으며, 그 외 언급하지 않은 모든 시약들은 분석용 등급 이상으로 구입하여 본 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 3T3-L1 세포 배양 및 분화유도

3T3-L1 마우스유래 배아섬유아세포는 미국세포주은행(American Type Culture Collection; ATCC, CL-173TM)에서 구입하여 사용하였으며, 세포는 10% BCS, 1% P/S을 포함한 DMEM 배지를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(MCO-15AC, SANYO, Japan)에서 배양시킨 후 배양액을 분화유도 배양액 (0.5 mM IBMX, 2 μ M DEX, 167 nM insulin / 10% FBS)으로 바꾸고 2일간 배양한다. 2일 후 167 nM insulin / 10% FBS 배지로 교환하며 성숙한 지방세포(adipocytes)로 만들었다. 차전초 추출물(CCE)은 배지 교체시기마다 함께 처리하였다.

2) 세포독성 검사

CCE가 3T3-L1 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하

여 5 X 10⁴ cells/ml의 세포에 CCE 각 농도 (0~1 mg/ml) 별로 처리하여 MTT 검정법을 이용하여 측정하였다. ELISA reader (Tekan, Austria, Switzerland) 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 모두 3개 well의 평균값을 이용하여 평가하였다.

3) TUNEL 염색

Apoptosis 양성세포를 관찰하기 위해 TUNEL assay kit (11684795910, Roche, Manheim, Germany)을 이용하여 TUNEL 염색을 실시하였다. 세포를 4 chamber slide에 배양하여 분화시키고 분화 마지막에 시료 0.05 mg/ml, 0.2 mg/ml CCE를 각각 24시간 처리하였으며 양성대조약물로 0.5mM rosiglitazone (R2408, Sigma-Aldrich, USA)을 처리하였다. 분화가 끝난 세포를 D-PBS (SH30028.03, Thermo, USA)로 세척한 후 4% paraformaldehyde로 실온에서 1시간 고정된 후 D-PBS로 세척한 다음에 3% H₂O₂로 봉쇄(blocking)를 실시한 후 투과성 용액을 첨가하여 처리한 후 TUNEL assay kit (11684795910, Roche, Germany)을 50 µl 첨가하여 37°C 암실에서 1시간 반응시키고 DAB solution으로 염색하여 CCE 처리세포에서 세포사멸 정도를 현미경으로 관찰하였다.

4) Oil-red O 염색

3T3-L1 세포에서 지방세포 분화 및 지방 생성에 CCE가 미치는 영향을 알아보기 위하여 Oil Red-O 염색 실험을 수행하였다. 세포분화 중에 CCE를 각각 다른 농도(0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/mL)로 이들에 한번 씩 배지를 교환하며 처리하였다. 10일 후 세포배양액 제거 후 D-PBS로 세척하고 pH 7.2 Cacodylate buffer로 4°C에서 세포를 고정, 증류수로 세척하여 지방구를 Oil-red O 염색시약으로 염색한 다음 40% Isopropyl alcohol로 세척한 후 현미경(CK2, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 염색된 지방세포의 지방함량 측정을 위해 건조시킨 후, 100% isopropyl alcohol로 지방을 추출하여 510 nm 파장에서 분광광도계(Lambda UV/VIS, Perkin Elmer, USA)로 흡광도를 측정한 다음, 처리군의 지방량을 대조세포에 대한 %로 표시하였다.

5) Western blot 분석

CCE는 이들에 한번 씩 3회 처리 후, 적정량의 단백질을 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-PAGE에서 분리한 후, PVDF membrane으로 200 mA에서 2시간 동안 전이시켰다. 단백질 전이된 membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하고, 적절한 1차 항체 (pAMPK, AMPK, pACC, ACC, PPARγ, C/EBP α, β-actin)를 4°C에서 하룻밤 처리하였다. TBS-T로 세척한 후, 1시간 동안 상온에서 2차 항체와 반응시킨 후 세척하고, ECL 시약을 처리하여 X-ray film에 감광시켜 타겟 단백질 발현량을 관찰하였다.

6) 통계학적 검정

통계처리(Student's t-test)는 GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하

였고, 대조세포에 대한 유의성 검증은 p<0.05 수준에서 실시하였다.

결 과

1. 차전초 에탄올 추출물(CCE)이 세포생존율에 미치는 영향

CCE가 세포에 미치는 독성 영향을 알아보기 위해 3T3-L1 세포에 0~1 mg/ml 농도의 CCE를 각각 처리하고 MTT 분석법을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 그 결과, 95% 에탄올만 처리된 대조군에 비해CCE의 처리농도에 의존적으로 지방세포의 생존율이 감소하는 것으로 관찰되었다. 본 실험에 사용된 0.2 mg/ml 농도에서는 세포성장상에 유의적 영향을 나타 내지 않아 이후 실험들을 이 농도범위에서 진행하였다(Fig. 1).

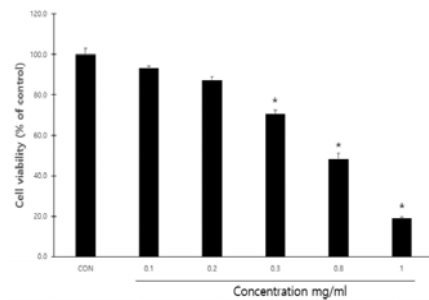


Fig. 1. Effects of CCE on cell viabilities in 3T3-L1 cells. Control was treated with 95% ethanol. Data represent the mean ± S.E. of triplicate determinations from three separate experiments.

2. 차전초 에탄올 추출물(CCE)의 3T3-L1 지방 세포에서 TUNEL 염색에 대한 효과

DMSO만으로 처리된 대조군에서는 apoptotic cell이 관찰 되지 않았으나, 양성대조약물인 0.5 mM rosiglitazone 처리 군과 CCE군에서 세포사멸 양성반응이 많이 관찰되는 것으로 보아 지방세포 사멸이 유도되는 것을 관찰하였다(Fig. 2).

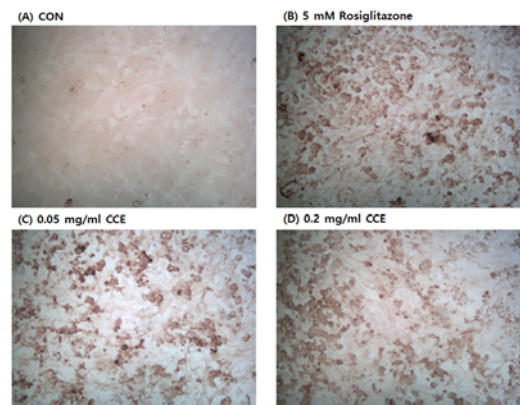


Fig. 2. Induction of apoptosis by CCE treatment in 3T3-L1 adipocytes. To investigate the morphological of change of TUNEL-positive apoptotic body formation, the cells were treated with 0.05 and 0.2 mg/ml CCE for 24 hours and stained with DAB solution. Stained apoptotic cells were then observed under light microscope. Magnification, X200.

3. 차전초 에탄올 추출물(CCE)이 3T3-L1 세포의 지방축적에 미치는 영향

CCE 처리가 지방축적의 정도에 미치는 영향을 조사하기 위해서 Oil-red O 염색법으로 세포 내 지방구의 크기를 관찰한 결과, CCE 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/ml의 농도 모두에서 대조세포에 비해 유의적으로 지방축적 감소를 나타냈다. 즉, 각 처리농도에서 86.5%, 85%, 80.7%, 71.7%로 농도의 존적으로 지방축적이 억제되었으며 0.2 mg/ml 농도에서 양성대조군인 fenofibrate의 20.2% 억제율보다 8.1% 높은 28.3%의 억제율을 보였다(Fig. 3).

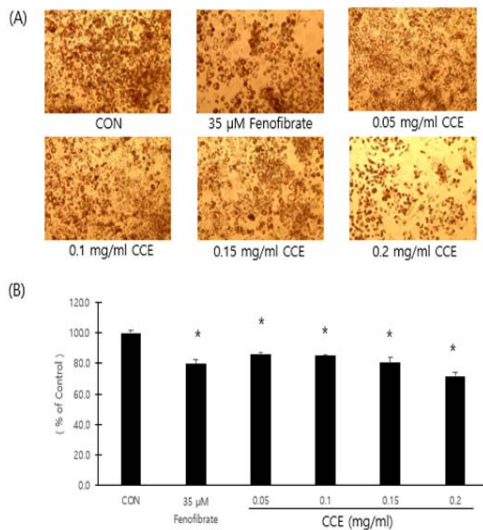


Fig. 3. Effects of CCE on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with various doses (0.05, 0.1, 0.15 and 0.2 mg/ml) of CCE ethanol extract every other day for 6 days. Control was treated with 95% ethanol. Images of representative cells captured with a microscope (A). Bars were quantified by the lipid accumulation using spectrophotometer (B). Data represent the mean \pm S.E. of triplicate determinations from three separate experiments. *, $p < 0.05$ vs CON

4. 차전초 에탄올 추출물(CCE)이 3T3-L1 지방세포에서 AMPK, ACC 단백질 발현에 미치는 영향

CCE 처리가 3T3-L1세포에서 비만관련 지표인 AMPK, ACC의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 그 결과, 3T3-L1 지방세포가 분화하는 동안 처리한 CCE는 대조세포에 비하여 세포 내의 에너지 상태와 관련 있는 AMPK 인산화 뿐 만 아니라 지방 생성 및 지방산 산화와 유관한 ACC 인산화를 유의적으로 증가시켰다(Fig. 4).

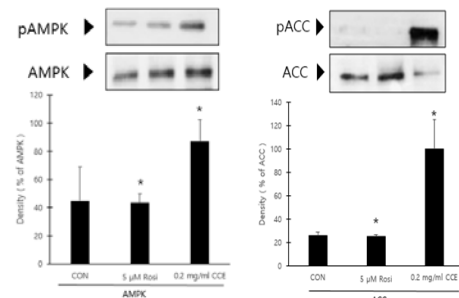


Fig. 4. Effects of CCE on AMPK and ACC phosphorylations in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with 0.2 mg/ml of CCE every other day for 6 days. Control was treated with 95% ethanol. Data represent the mean \pm S.E. of triplicate determinations from three separate experiments. *, $p < 0.05$ vs CON

5. 차전초 에탄올 추출물(CCE)이 3T3-L1 지방세포에서 PPAR γ , C/EBP α 단백질 발현에 미치는 영향

CCE가 지방세포분화에 결정적 역할을 하는 중요한 전사인자인 PPAR γ , C/EBP α 의 단백질 발현량에 미치는 영향을 확인해보기 위해서 western blot을 수행한 결과, PPAR γ , C/EBP α 모두 CCE이 대조세포에 비하여 단백질 발현량이 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 5).

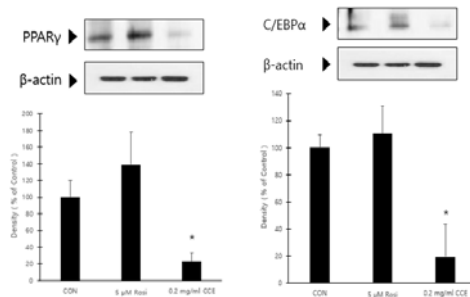


Fig. 5. Effects of CCE on PPAR γ and C/EBP α protein expressions in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with 0.2 mg/ml of CCE every other day for 6 days. Control was treated with 95% ethanol. Data represent the mean \pm S.E. of triplicate determinations from three separate experiments. *, $p < 0.05$ vs CON

고찰

서양의학에서는 비만을 치료하기 위해 행동수정요법, 운동요법, 식이요법, 수술요법, 약물치료요법 등의 방법을 실시하고 있다^{23,24}. 반면에 한의학에서 비만의 원인을 濕, 痰, 瘀血, 氣滯 등의 원인으로 발생한다고 여기고 있으며 식이요법과 행동요법 외에 주로 行氣血, 祛痰, 活血祛瘀와 같은 약물요법으로 치료하고 있다²⁵. 車前草는 위액분비와 위장관 운동 조절작용, 항염작용, 항종양작용 등이 입증되었으며 혈당저하 작용과 간 손상 회복에 유의한 효능이 있다고 보고되어져 있다²⁶. 최근 천연물을 소재로 한 항비만 치료제에 대한 연구가²⁷ 활발히진행되고 있으며 차전초는 3T3-L1 지방세포에서 지방의 분화 및 축적억제에 대한 연구가 보고되지 않았으므로

본 실험을 통한 연구결과는 항비만치료제 개발 가능성을 시사한다고 할 수 있다.

본 연구에서는 3T3-L1 세포를 생체 외에서 지방세포로 분화시키는 과정에 CCE를 첨가하여 분화억제를 통한 항비만 효과를 확인하고자 하였다.

TUNEL 염색을 통한 지방세포의 apoptotic cell 분석결과 대조세포에 비하여 0.2 mg/ml CCE 처리농도에서 TUNEL 염색에 양성으로 보이는 DNA 파괴가 상당히 많이 관찰되었으며, 추출물은 농도 증가에 따라 apoptosis 유도 효과를 보였다. 따라서 CCE가 지방세포 자멸사에 효과가 있는 것으로 보인다.

3T3-L1 전지방세포가 지방세포로의 분화과정에 나타나는 지방구 생성이 CCE처리에 의하여 억제되는지 확인하기 위해서 Oil Red O 염색 전후로 구분하여 지방구 생성정도를 위상차 현미경으로 관찰한 결과, CCE 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/ml의 처리 농도 모두에서 대조세포에 유의적으로 지방축적 감소를 나타내었다. 지단백 지방분해효소의 활성도를 증가시키는 고지혈증 환자 치료를 위한 보조제^{28,29)}로 알려진 fenofibrate 처리세포보다 0.2 mg/ml CCE 농도에서 8.1% 높은 억제율을 나타내어 고지혈증 치료제인 양성대조약물과 유사한 중성지방축적 억제를 나타내었다.

ATP생성경로와 소비경로를 조절하면서 세포 내 에너지 항상성을 유지시키는데 핵심적인 역할을 함으로써 포도당섭취 및 지방산 산화 증가, 간에서의 지방 합성 및 포도당 신생억제 및 췌장에서의 인슐린 분비를 조절하는 중요한 매개인자로 작용^{30,31)}하는 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 인산화 수준을 western blot을 통하여 관찰한 결과, 0.2 mg/ml CCE처리 세포가 대조약물 및 양성대조약물(Rosiglitazone) 처리 세포에 비해 유의적으로 AMPK 인산화 활성 증가를 보였다. AMPK의 활성화는 지방산 합성과 콜레스테롤 합성을 조절하는 acetyl-CoA carboxylase (ACC)를 인산화시킴으로써 ACC효소를 불활성화시킨다³²⁾. 또한, 본 실험에서 양성대조군으로 쓰인 Rosiglitazone은 PPAR γ 수용체와 결합하여 인슐린 저항성을 일으켜 혈중지질을 증가시키는 부작용을 가지고 있다. 따라서 본 실험에서 대조약물 및 양성대조약물 처리세포에 비해 CCE 처리세포에서 ACC의 인산화가 유의하게 증가함으로써 지방세포에서의 지방합성이 억제되는 것을 확인하였다.

지방조직 및 지방세포에서 adipogenesis 조절에 관여하는 핵심전사인자인 PPAR γ , C/EBP α 의 발현량을 분석한 결과, 0.2 mg/ml CCE 처리세포에서 대조약물 및 양성대조약물 처리 세포에 비해 위의 인자들이 유의적으로 감소하는 것으로 보아 CCE는 지방세포에서 지방분화 및 지방축적 억제활성에 관여하는 것으로 보인다.

이상의 결과로부터 CCE는 3T3-L1 전지방세포에서 지방세포로 분화되는 과정에 지방세포 분화 및 지방합성 억제와 같은 항비만 효과에 유의적인 영향을 미치는 것으로 확인되어 항비만 치료제로서의 개발 가능성을 보여준다.

결론

본 연구에서 지방세포 3T3-L1에서 차전초 에탄올 추출물

(CCE)의 지방생성 및 지방분화 억제에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CCE는 0~1 mg/ml 처리농도에서 3T3-L1 세포생존율은 감소하나 실험에 사용한 0.2 mg/ml 처리농도에서 독성을 나타내지 않는 것으로 보인다.
2. TUNEL 염색결과 대조세포에 비하여CCE는 농도의존적으로 세포사멸 양성반응을 보이는 것으로 보아, 지방세포 사멸을 유도하여 지방세포 분화억제효과를 보였다.
3. CCE의 Oil-red O 염색결과 0.2 mg/ml의 농도에서 대조세포에 비하여 28.3%의 지방축적 억제 효과를 보였다.
4. CCE는 3T3-L1 지방세포에서 대조세포에 비하여 에너지 항상성을 조절하는 AMPK/ACC의 인산화수준을 증가시켰다.
5. CCE는 3T3-L1 지방세포에서 대조세포에 비하여 지방생성의 관여에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자인 PPAR γ , C/EBP α 의 발현량을 감소시켰다.

이상의 결과에서 차전초의 에탄올 추출물은 3T3-L1 지방세포에서 지방세포사멸 유도를 보이며, 지방세포 분화 과정에서 지방축적 및 지방 억제효과에 유의적인 결과를 보였기에 천연 항비만 치료제 소재로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 '2012년도 대구한의대학교 기린연구비' 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

References

1. Bray MS. Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. *J Appl Physiol*. 1985 ; 88(2) : 788-92.
2. Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, Heiss G, Sorlie PD, Catellier D, Patsch W. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Circulation*. 2001 ; 104(10) : 1108-13.
3. Huh KB. Symposium: recent progress in obesity research: pathogenesis of obesity. *Kor J Soc Food Sci Nutr*. 1990 ; 23 : 333-6.
4. Sjostrom L, Lonn L, chowdhury B, grangard LL, Sjostrom D, Sullivan L. The sagittal diameter is a

- valid maker of the visceral adipose tissue volume, *J Progress Obes*, 1994 ; 7 : 309–19.
5. Sjostrom LV. Morbidity of severely obese subject, *Am J Clin Nutr*, 1992 ; 55 : 508–13.
 6. Bradford BL, Bruce MS. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis, *Nature*, 2000 ; 404 : 652–60.
 7. Park JA, Jin KS, Oh YN. Antiadipogenic effect of vitis amurensis root methanol extract and its solvent fractions in 3T3-L1 preadipocytes, *J Life Sci*, 2013 ; 23 : 69–78.
 8. Koutnikova H, Auwerx J. Regulation of adipocyte differentiation, *Ann Med*, 2001 ; 33 : 556–61.
 9. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000 ; 16 : 145–71.
 10. Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation, *J Nutr*, 2000 ; 130(12) : 3116–21.
 11. Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression, *J Nutr*, 2000 ; 130 : 3122–6.
 12. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity, *Mol Cell*, 1999 ; 3(2) : 151–8.
 13. Kim HJ, Kang CH, Kim SK. Anti-adipogenic effect of undaria pinnatifida extracts by ethanol in 3T3-L1 adipocytes, *J Life Sci*, 2012 ; 22 : 1052–6.
 14. Park JA, Park C, Han MH, Kim B W, Chung YH, Choi YH. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by aged black garlic extracts in 3T3-L1 preadipocytes, *J Life Sci*, 2001 ; 21 : 720–8.
 15. Choi KH. Obesity, Seoul : Shinwonmonhwaswa, 2002 : 15–44.
 16. Park YW. Supplements used for weight loss of the evidence-based prescribing, *J Korean Acad Fam Med*, 2003 ; 24(5) : 409–15.
 17. Park CY. The Update of Anti-Obesity Drug, *Med Kyunghee*, 2002 ; 18(2) : 77–85.
 18. Park BG, Lee HS, Jung SH, Gu YC, Hong CE, Lee SJ, Lee GW. Single & 14-day repeated oral toxicity study and genotoxicological safety estimate of plantamajoside isolated from *Plantago asiatica*, *J Toxicol Pub Health*, 2007 ; 23(1) : 79–86.
 19. Yook CS. Korean medicinal plants, Academy publishing, 1989 : 502.
 20. Song HJ. Healthy native grass therapy, Gookillmedia, 1994 : 142.
 21. Yang KH, Kwon TJ, Choo SY, Yun HS, Chang IM. Protective effect of Aucuba japonica against CCl₄-induced liver damage in rats, *Drug Chem Toxicol*, 1983 ; 6(5) : 429–41.
 22. Chang IM, Ryu JC, Yun HS, Yang KW. Protective activities of aucubin against CCl₄-induced liver damage in mice, *Drug Chem Toxicol*, 1983 ; 6(5) : 443–53.
 23. Kurt J. Harrison's Principles of internal medicine, New York : Isselbacher, 1994 : 446–52.
 24. Woo HC, Shin BK, Cho IJ, Kim MH, Han JH. Bioactive Materials : anti-obesity effect of carbon dioxide supercritical fluid extracts of panax ginseng ca meyer, *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2011 ; 54(5) : 738–43.
 25. Lee HY, Yoon KH, Seo BI, Park GR, Yoon MC, Shen ZB, Cui HH, Shin SS. Molecular biologic mechanism of obesity by GGEx18, *Kor J Herbology*, 2011 ; 26(1) : 65–74.
 26. Kim CM, Shin MK. Chinese herbology an unabridged dictionary, Seoul : Jungdam publishing, 1998 : 5209–13.
 27. Shin IS, Choi HM, Ku SK, Kim MR. The effect of natural mixture supplementation on histopathological and histomorphometrical aspects in high fat diet-induced obese mice, *Kor J Herbology*, 2012 ; 27(4) : 53–8.
 28. Guay DR. Micronized fenofibrate: a new fibric acid hypolipidemic agent, *Ann Pharmacother*, 1999 ; 33(10) : 1083–103.
 29. Munoz A, Guichard JP, Reginault P. Micronized fenofibrate, *Atherosclerosis*, 1994 ; 110 : 45–8.
 30. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream, *J Cell Sei*, 2004 ; 117(23) : 5479–87.
 31. Nam KC, Kim MS, Lee WJ, Jang PG, Han SM, Koh EH, Park JY, Lee KU. Hypothalamic ampk activity in diabetic rats, *J Kor Diabetes Assoc*, 2004 ; 28 : 468–77.
 32. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism, *Cell Metab*, 2005 ; 1 : 15–25.