

오적산 (五積散)의 고지방식이 마우스 지방축적억제 및 3T3-L1지방세포에서의 비만 조절 기전에 관한 연구

최혜민[#], 문성옥, 이희현, 이화동^{*}

한국한방산업진흥원 한약제형개발팀

Inhibitory effect of by Ojeok-san lipid accumulation in high fat diet-induced obesity mice and 3T3-L1 adipocytes

Hye-Min Choi[#], Sung-Ok Moon, Hee-Hyun Lee, Hwa-Dong Lee^{*}

Korean Traditional Medicine Agency, Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry (KOTMIN)

ABSTRACT

Objectives : Ojeok-san (OJS), an oriental herbal formula, has been used in Asian countries including Korea, China and Japan to treat the common cold and illnesses including fatigue and gastrointestinal disorders. The purpose of this study was to examine the anti-obesity effect and molecular mechanism of OJS, on adipogenesis in 3T3-L1 cells. Also, the effects of OJS in obese mice fed a high-fat diet on adiposity were examined.

Methods : Preferentially, we analyzed the component of OJS and measured the stability of its component in OJS according to study periods using high performance liquid chromatography (HPLC). In vitro, 3T3-L1 cells were treated with OJS (50 to 200 µg/mL) during differentiation for 8 days. The accumulation of lipid droplets was determined by Oil Red O staining. The expressions of genes related to adipogenesis were measured by RT-PCR and Western blot analyses. For anti-obesity effect in vivo, we experimented for 8 weeks with four group (normal diet (CON), high-fat diet (HF), high-fat diet with OJS (HF+OJS) and high-fat diet with Bang-pung-tong-sung-san (HF+BTS) in comparison group HF+OJS).

Results : OJS showed inhibitory activity on adipocyte differentiation at 3T3-L1 preadipocytes without affect cell toxicity as assessed by measuring fat accumulation and adipogenesis. In addition, OJS significantly reduced the expression levels of several adipocyte marker genes including proliferator activated receptor-γ (PPAR-γ) and CCAAT/enhancer-binding protein-α (C/EBP-α). Also OJS-administered mice showed significant inhibitory of body weights and abdominal adipose tissue weights.

Conclusions : This study showed that traditional medicine OJS has an anti-obesity effect in vitro and in vivo. Thus, OJS could be developed as a supplement for reduction of body weight gain induced by an obesity.

Key words : Ojeok-san, Traditional medicine, Anti-obesity, 3T3-L1 preadipocyte, High-fat diet

서론

오늘 날 국내 및 세계 각국에서는 급속한 경제성장에 따른 서구화에 과다한 음식물 섭취와 운동 부족으로 에너지 사용의

불균형을 초래하여 비만이 증가하고 있다¹⁾. 비만은 당뇨병, 고혈압과 죽상동맥경화증 등 심각한 질병을 유발하여 전 세계적인 문제가 되고 있다. 따라서 최근에는 비만의 예방과 치료를 위한 연구가 많이 이루어지고 있는데, 이에 부작용이 적고

*Corresponding author : Hwa-Dong Lee, Korean Traditional Medicine Agency, Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry

· Tel : +82-53-810-0332 · Fax : +82-53-810-0245 · E-mail : lee00003@hanmail.net

#First author : Hye-Min Choi, Korean Traditional Medicine Agency, Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry

· Tel : +82-53-810-0358 · Fax : +82-53-810-0245 · E-mail : addaassa@nate.com

· Received : 23 June 2015 · Revised : 20 July 2015 · Accepted : 22 July 2015

항비만 효과가 있는 한약재나 천연소재를 이용한 연구보고 및 제품의 개발 등도 증가하고 있다. 그 예로, 한약처방 중에서 방풍통성산 (防風通聖散, BTS)이 여러 약품으로 시판되고 있어, 한약의 비만 예방 및 치료에 대한 관심과 이용이 증가되고 있는 추세이다²⁻³⁾.

오적산 (五積散, OJS)은 1107년 전후 陳師文 등이 修訂 발간한 太平惠民和劑局方 傷寒門에 처음으로 수록된 處方으로⁴⁾ 일반적으로 腰痛이나 肩臂痛, 心腹痛, 外感과 內傷이 겸해진 傷寒陰症에 활용하여 오고 있는 處方이며, 寒濕氣血痰이 적체되어 발생하는 五積을 치료하기 위하여 창안한 方劑로서 특히 外感 內傷의 基本方으로 널리 활용되어온 處方이다⁵⁻⁶⁾. 한방 56처방 심사 실적에 따르면 국민건강보험 급여 한약제제 56종중에 가장 활용 빈도가 높은 처방으로 2001년부터 건강보험 Electronic Data Interchange (EDI) 청구분 기준 약제비 순위에서 청구금액과 청구건수가 가장 많은 1위를 차지하기도 하여 한방임상에서 널리 사용되고 있는 處方이다⁷⁾.

현재까지 OJS의 약리 효능에 관한 연구 논문으로서는 진통, 소염 및 천식, 항알러지, 항산화 등에 대한 여러 방면 연구들이 보고되었고⁸⁾, 항비만을 비롯하여 대사성 질환에 이루어진 연구 또한 있으나⁹⁾ 그에 대한 정확한 작용기전은 이루어진 바 없었다. 이에 본 연구에서는 OJS의 품질관리를 위하여 주요성분에 대한 HPLC 분석을 실시하고, OJS의 비만조절 작용이 어떠한 작용기전을 통하여 발휘되는 지를 밝혀 보고자 고지방식이로 유도한 마우스의 체중감소 효과와 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 지방 세포분화 및 지방 대사 관련 인자들에 대한 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 한약재

본 연구에 사용된 오적산 및 방풍통성산 처방 구성 약재들은 (주)휴먼허브 (경북 경산, 한국)와 (주)옴니허브 (대구, 한국)에서 각각 구입하였다.

2) 성분분석 시약 및 기기

표준물질인 naringin, neohesperidin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, honokiol, liquiritin은 Sigma 제품 (USA)에서, paeoniflorin, atractylenolide III, atractyloidin은 Ava-chem Scientific사 (USA), decursinol an-gelate는 (주)천연물화학에서 구입 사용하였으며, nodakenin, poncirin, hesperidin, decursin, magnolol은 식품의약품안전처에서 분양 받아 사용하였으며 각 표준물질의 순도는 98% 이상이었다. 시료 전처리 및 HPLC 분석을 위한 methanol, acetonitrile은 J.T. Baker사 (USA)에서 구입하였고, phosphoric acid는 Junsei (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 성분분석을 위한 HPLC는 Agilent 1200 HPLC system (USA)을 사용하였으며, 분석 data 처리에는 Agilent Open LAB CDS ChemStation(A,02,08)을 이용하였다.

3) 세포실험 분석 시약

Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Penicillin-streptomycin, Phosphate buffered saline (PBS)는 Hyclone사 (USA)제품, 세포배양 플레이트와 100mm 페트리 접시는 Nunc Inc사 (USA)로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약 중 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Dexamethasone (DEX), Oil red O 시약들은 Sigma Aldrich사 (USA), Bovine calf serum (BCS), Insulin 시약은 Thermo Scientific사 (USA), 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.

2. 방법

1) 처방 구성 및 추출방법

본 연구에 사용한 OJS과 BTS는 표 1과 표 2와 같이 한국의 공정에 표기된 처방 약재를 각 구성 비율로 배합한 후 약탕기 (대웅약탕기, 서울, 한국)로 10배의 정제수와 100℃에서 3시간동안 추출한 후, Whatman filter paper (No. 4)로 여과하고 감압동결건조기를 사용하여 분말을 얻었다 (수율 OJS : 21.87%/ BTS : 23.70%).

Table 1. The contents and dosage of Ojeok-san.

Pharmacognostic name (OJS)	Country of Origin	Pharmacopoeia (g)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	China	0.67
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	China	0.67
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	Vietnam	0.67
<i>Platycodon grandiflorum</i> A. De Candolle	China	0.67
<i>Angelica gigas</i> Nakai	Kyong Puk, Bong Hwa	0.67
<i>Zizyphus jujuba</i> Miller var.	Kyong Puk, Chung song	0.67
<i>Ephedra sinica</i> Stapf	China	0.67
<i>Pinellia ternata</i> Breitenbach	China	0.67
<i>Angelica dahurica</i> Benth. et Hooker	Chung Nam, Tae An	0.67
<i>Poria cocos</i> Wolf	China	0.67
<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	China	0.67
<i>Poncirus trifoliata</i> Rafinesqu	Kyong Puk, Kyoung Ju	0.67
<i>Citrus unshiu</i> Markovich	Je Ju	0.67
<i>Atractyloides chinensis</i> Koidzumi	China	1.33
<i>Cnidium officinale</i> Makino	Kyong Puk, Young Yang	0.67
<i>Cyperus rotundus</i> Linne	Kyong Puk, Go Ryeong	0.4
<i>Magnolia officinalis</i> Rehder et Wilson	China	0.67

Table 2. The contents and dosage of Bang-pung-tong-sung-san.

Pharmacognostic name (BTS)	Country of Origin	Pharmacopoeia (g)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	China	0.67
<i>Platycodon grandiflorum</i> A. De Candolle	China	0.67
<i>Angelica gigas</i> Nakai	Kyong Puk, Bong Hwa	0.4
<i>Rheum tanguticum</i> Maximowicz	China	0.5
<i>Ephedra sinica</i> Stapf	China	0.4
Sodium sulfate	China	0.5
<i>Mentha arvensis</i> Linne var. piperascens Malinvaud	Kyong Puk, Go Ryeong	0.4
<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schischkin	China	0.4
<i>Actyolodes macrocephala</i> Koidzumi	China	0.67
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Chung Nam, Seo San	0.4
Gypsum Fibrosum	China	1
<i>Forsythia suspensa</i> Vahl	China	0.4
<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	China	0.4
<i>Cnidium officinale</i> Makino	Kyong Puk, Young Yang	0.4
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	China	0.4
<i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briquet	China	0.4
Talcum	China	1.67
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	China	0.67

2) 표준액의 조제

Atractylenolide III, Atractylodin, Cin-namaldehyde, Cinnamic acid, Decursin, Decursinol angelate, Hesperidin, Hono-kiol, 6-gingerol, Glycyrrhizic acid, Liqu-ritin, Magnolol, Naringin, Neohesperidin, nodakenin, paeoniflorin 및 poncirin 17종의 표준품에 대한 표준원액은 무게를 정확히 측정 후 methanol로 녹여 모두 1 mg/mL의 농도로 조제한 후 냉장 보관하여 사용 전 표준용액으로 희석하여 사용하였다.

3) 검액의 조제

OJS 1g을 정제수에 10 mL에 녹여 완전히 녹인 다음 메탄올을 첨가하여 10배 희석 혼합 후 원심분리하여 상층액을 검액으로 하였다.

4) HPLC 분석조건

HPLC는 Agilent 1200 HPLC system을 사용하여 측정하였으며, 분석에 사용 된 컬럼은 Kinetex C18 (2.6 µm, 3.0×150 mm, USA) 컬럼을 사용하였으며, 컬럼온도는 30°C로 하여 유속 0.2 mL/min으로 흘려주었으며 10 µL 주입하였다.

이동상은 0.05% phosphoric acid in water (A)와 0.05% phosphoric acid in acetonitrile (B)을 사용하여 기울기 용매조건 (0-20분, 18-40% B, 20-25분, 40-45% B, 25-40분, 45-80% B, 41-50분, 80-18% B)이며, 검출파장은 230 nm에서 검출하였다.

5) 실험동물

중앙실험동물 SLC사 (서울, 한국)에서 분양 받은 ICR계 체중 25-26 g내외의 5주령 암컷 생쥐를 각각 한 cage당 한 마리씩 넣고 온도 22±2°C, 습도 53.3%, 12:12 light-dark cycle로 일반사료 (퓨리나사료)로 일주일 적응시킨 후, 난괴법

으로 4개 실험군 (정상식이군:CON, 고지방식이군:HF, 고지방식이+OJS투여:HF+OJS, 고지방식이+BTS투여:HF+BTS)으로 나누어 8주간 실험하였다. 물과 실험식은 자율섭식 하도록 하였다.

6) 고지방식이 및 약물 투여

실험에 사용한 식이는 표 3와 같이 AIN-76A 조성을 정상식이군 (Normal Diet, CON)에게 제공하고, 고지방식이군 (High fat Diet, HF)은 AIN-76A 조성을 바탕으로 한 40% Beef tallow 함유 식이를 제공하였다. 실험군은 그룹 당 6마리씩 4그룹으로

나누었고, CON, HF군은 각각 정상식이 및 고지방 식이와 생리식염수를 제공하고, 실험군에는 고지방식이와 OJS (HF+OJS)과 실험대조군 BTS (HF+BTS) 복합 물추출물을 각각 500 mg/kg 씩 경구 투여하여 8주간 사육하였다. 체중은 일주일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다.

Table 3 Composition of the experimental diet.

Component (g/kg)	CON ⁽¹⁾	HF ⁽²⁾
Casein	200	200
DL-Methionine	3	3
Corn starch	150	150
Sucrose	500	150
Cellulose	50	50
Corn oil	50	
Beef Tallow		400
Mineral-mix	35	35
Vitamin-mix	10	10
Choline bitartrate	2	2
Total	1000	1000

diets : (1) AIN-76A diet, #100000, Dyets Inc, USA

(2) AIN-76A Based Rodent Diet with 40%Kcal Fat, #101556, Dyets Inc., USA

7) 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 µM DEX, 167 nM insulin / 10% FBS)으로 바꾸고 2일간 배양한다. 2일 후 167 nM insu-lin / 10% FBS 배지로 교환하며 성숙한 지방세포(adipocytes)로 만들었다. 실험군 OJS 및 대조 실험군 BTS는 배지 교체시기마다 함께 처리하였다.

8) 세포독성평가

OJS의 3T3-L1 세포에 대한 독성정도를 알아보기 위하여 3-[4,5-dimethyl thiazolyl]-2,5-diphenyltetra zolium bromide (MTT)assay를 수행하였다. 먼저, 3T3-L1 세포 (1X10⁴ cell / 96well)에 OJS를 100, 200, 500, 1000 µg/mL 농도별로 처리하여 24시간 배양 후, MTT 시약을 첨가하여 2시간 동안 반응하고, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 정도는 시료를 처리하지 않은 대조군(CON)과 약물 처리군의 비율로 계산하였다.

Cell viability (%) = 100 × (treated sample) / (Non-treated sample (CON))

9) 지방세포 분화 억제능 측정 (Oil Red O staining)

분화 완료된 6-well plate의 배지를 제거한 후 1×PBS로 2회 씻어주었다. 10% formalin으로 2시간 이상 고정시킨 세포를 40% isopropanol로 세척 후, 완전히 건조시켰다. 그 후, Oil Red O working solution으로 1시간 염색하였고 40% isopropanol로 3회 세척하였다. 염색된 세포는 사진촬영 후, 100% isopropanol로 염색된 Oil Red O solution을 녹여 520 nm에서 흡광도를 측정 정량하였다.

10) 종합효소 연쇄반응법 (RT-PCR)에 따른 지방분화 조절 유전자 측정

50, 200, 500 µg/mL 농도로 OJS 및 BTS를 처리하며 분화 유도하여 3일간 배양한 3T3-L1 세포를 TRIzol (Takara, Japan)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA는 1 µg로 정량하여 oligo-dT, DEPC와 함께 70 °C에서 5분간 반응시킨 후 바로 ice에서 반응을 중지시킨다. 여기에 dNTP's, RT buffer와 reverse transcriptase를 첨가한 완충 반응액 (Promega, USA)을 넣어 45 °C에서 약 60분간 반응시킨 후 72 °C에서 10분간 처리하여 cDNA를 합성하였다. 이 template DNA와 Taq polymerase 등이 포함된 반응 혼합액 (Promega, USA)과 각각의 Primer sequence인 ATT CTG GCC CAC CAA CTT CGG (Forward), TGG AAG CCT GAT GCT TTA TCC CCA (Reverse); Peroxisome proliferator activated receptor-γ (PPAR-γ), CTC AGT GGG AGC GAC TCT TCA (Forward), GGC CTC TGT GGT ACA CGA CAA (reverse); carnitine palmitoyltransferase1 (CPT1)로 PCR 증폭 후, 1.5% Agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

11) Western Blotting에 따른 지방분화 조절 단백질 측정

50, 200, 500 µg/mL 농도로 OJS 및 BTS를 처리하며 분화유도하여 3일간 배양한 3T3-L1 세포를 1X PBS로 세척 후, Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail을 포함하는 RIPA buffer (PIERCE, USA)로 균질화하였다. 균질화된 samples은 적정량의 단백질로 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-PAGE에 분리한 후, PVDF membrane으로 단백질을 전이시켰다. 그 후, 5% Skin milk를 처리하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 하였고, 각각의 1차 항체 (P-AMPK, AMPK, C/EBP-α, PPAR-γ, β-actin)를 4 °C에서 Overnight 반응 시킨 후, HRP가 중합된 2차 항체를 반응시켰다. Immuno-positive bands는 enhanced chemiluminescent (ECL, Thermo Scientific, USA)에 의해 감광시켜 cheiluminescent detection system을 이용하여 현상하였다.

3. 통계분석

실험결과와 통계 처리는 SPSS package를 이용하였으며, 실험에 대한 측정값은 *In vivo* 값은 mean ± SEM (n=6), *In vitro* 값은 mean ± SEM (n=3)로 표시하였고 분석에 대한 유의성은 one-way ANOVA를 실시, 분석결과에 대한 *p* < 0.05

의 수준에서 LSD 다중검정법으로 사후검정을 실시하여 각 리구간의 평균치에 대한 유의성을 분석하였다.

결 과

1. 오적산의 HPLC 동시분석

OJS의 구성 한약재 중 작약의 주요 성분인 paeoniflorin, 감초의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizic acid, 진피의 주요 성분인 hesperidin과 neohesperidin, 지각의 주요 성분인 naringin과 poncirin, 계지의 주요 성분인 cinnamic acid와 cinnamaldehyde, 건강 및 생강의 주요성분인 6-gingerol, 후박의 주요성분인 honokiol과 magnolol, 창출의 주요성분인 atractylenolide III과 atractyolodin, 당귀의 주요성분인 nodakenin, decursin, decursinol angelate을 대상으로 50 분 이내에 분리하였으며, 230 nm에서 검출하였다. 검액에서의 peak는 표준용액 peak의 retention time과 UV 흡수 spectrum을 비교하여 특이성을 확보하였으며, 검액에서 13종의 성분이 검출되었다(Fig. 1).

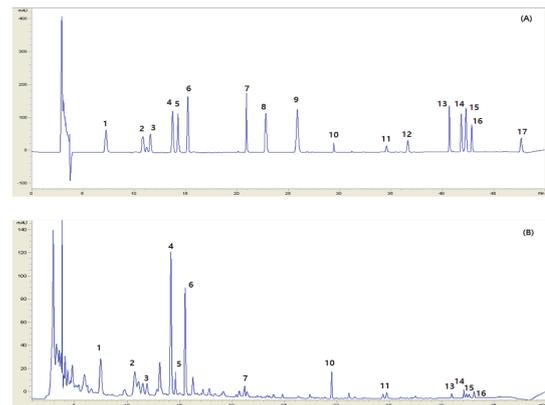


Fig. 1. HPLC chromatogram of the standard mixture(A), Ojeok-san mix soft extract(B)

Paeoniflorin(1), liquiritin(2), nodakenin(3), naringin(4), hesperidin(5), neohesperidin(6), poncirin (7), cinnamic acid(8), cinnamaldehyde(9), glycyrrhizic acid(10), 6-gingerol(11), atractylenolide III(12), honokiol(13), decursin(14), decursinol angelate(15), magnolol(16), atractyolodin(17)

2. 오적산이 체중변화에 미치는 영향

고지방식이로 8주간 비만을 유도하면서 마우스에 OJS 또는 양성대조군 BTS를 경구투여하고 체중증가에 미치는 영향을 1주 간격으로 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 실험 시작 전 체중은 실험군 간에 큰 차이 없이 시작하였으나, 고지방 식이를 공급 후 마우스의 체중이 3주부터 유의적으로 증가하는 현상을 보였고, 실험군 HF+OJS 및 HF+BTS는 4주부터 고지방 식이군 HF에 비해 유의적인 체중 감소를 나타내었다. 8주째 체중을 군간 비교해보면 OJS 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 체중이 20.74% 감소하였다(Fig. 2A). 양성대조군 약물인 BTS 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 체중이 23.28% 감소하였다. 따라서 본 실험 결과 OJS는 양성대조군 BTS처럼 체중억제에 우수한 효능을 가진 것으로 나타났다. 하루식이 섭취량에서는 정상식이에 비해 고지방식이 마우스의

경우 식이 섭취량의 차이가 없었으나, OJS 및 BTS 투여군의 경우 고지방식이 대조군에 비해 다소 감소하였으나 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 2B).

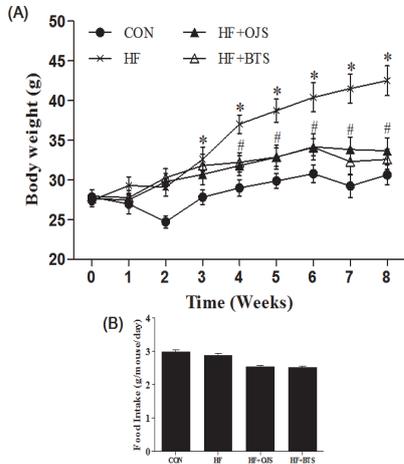


Fig. 2. Effects of Ojeok-san (OJS) on body weight in the diet-induced obesity mice. (A) Change in body weight consuming CON, HF or HF with OJS and BTS during 8weeks. (B) For each mouse, average daily food intakes were calculated. The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=6). * P <0.05 vs. CON, # P <0.05 vs. HF.

3. 오적산이 체내지방 축적에 미치는 영향

총 실험기간 8주후 마우스의 체내 지방 축적량을 측정하기 위하여 복부지방과 간 무게를 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 정상식이군 (CON)에 비해 고지방식이군 (HF)의 경우 복부지방이 유의하게 증가하였고(p <0.05) 간의 무게도 CON에 비해 HF가 유의하게 증가 하였다(p <0.05). 간 조직의 경우 HF에 반해 HF+OJS군과 HF+BTS군에서 간 조직의 무게가 각각 14.75.0%와 15.30%로 감소하는 경향이 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 3). 지방 조직의 경우 HF+OJS와 HF+BTS에서 HF에 비해 유의적인 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 3).

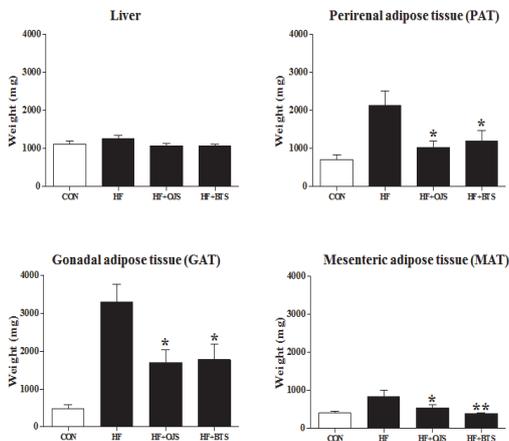


Fig. 3. Effects of Ojeok-san (OJS) on the weights of liver and adipose tissue in the diet-induced obesity mice. The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=6). * P <0.05 vs. HF.

4. 지방전구세포에 대한 오적산의 세포독성

OJS처리에 의한 3T3-L1 지방전구세포의 생존율을 세포독성 검사를 통하여 평가한 결과, 처리 최고농도인 1,000 μ g/mL에서 86.40 %로 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 4).

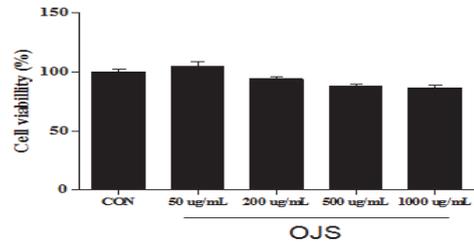


Fig. 4. Effect of Ojeok-san (OJS) on the viability of 3T3-L1 cells. Cells were treated with indicated concentrations of OJS for 24h. The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=3).

5. 오적산이 지방세포 분화에 미치는 영향

3T3-L1 세포에 OJS를 처리하여 8일동안 분화를 유도한 후 Oil red O 염색을 통하여 지방세포 분화 정도를 측정하고, 분화를 유도한 지방세포 (PC)에서는 분화전 전구지방세포 (NC)에 비해 유의적인 지방 분화를 나타내었으며, OJS를 처리한 세포는 PC에 비하여 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5). 또한 OJS 200, 500 μ g/mL을 처리한 군에서는 약 각각 44.22 %, 51.53 %의 감소율로 p <0.05의 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 5).

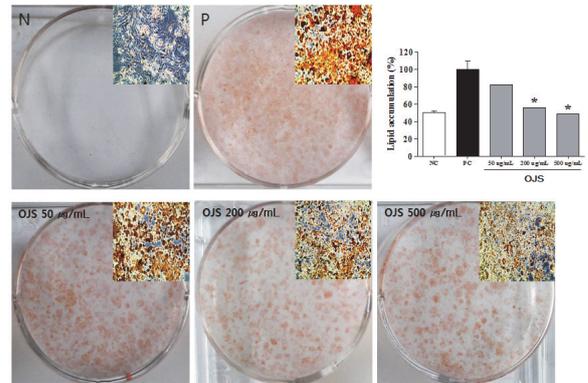


Fig. 5. Effect of Ojeok-san (OJS) on lipid accumulation during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. The intracellular lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining. The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=6). * P < 0.05 vs. PC. (N : Preadipocytes, P : Adipocytes)

6. 오적산이 지방세포분화 억제 조절에 미치는 영향

OJS의 항비만 효과에 대한 작용기전을 조사하기 위해 OJS 및 양성대조군 BTS를 처리하여 분화를 유도한 3T3-L1 세포에서 지방 생성의 주요 전사인자인 C/EBP- α 와 PPAR- γ 의 유전자 및 단백질 발현조절을 통해 지방 분화 억제를 효과적으로 감소함을 조사하였다.

이의 결과, 분화 전 전구지방세포 (NC)에 비해 분화를 유도한 지방세포 (PC)의 경우 C/EBP- α 와 PPAR- γ 의 유전자

및 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈었으나, OJS 및 BTS를 처리 군에서는 C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 유전자 및 단백질 발현이 감소하는 것을 나타내었다. 특히, OJS 500 μ g/mL을 처리한 군에서는 PPAR- γ 의 유전자 및 C/EBP- α 단백질 발현에서는 48.78 % 및 51.59 %로 유의적인 감소를 나타내었으며, BTS 군은 PPAR- γ 의 유전자 발현에서 100, 200, 500 μ g/mL을 처리한 군에서 유의적인 감소를 나타내었지만 C/EBP- α 및 PPAR- γ 단백질 발현에서는 유의적인 결과를 나타내지 못하였다(Fig. 6).

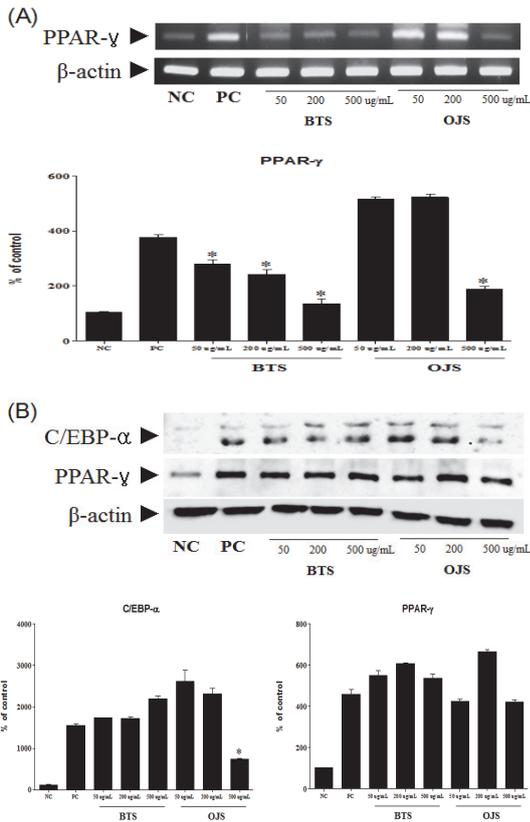


Fig. 6. Effect of Ojeok-san (OJS) on the expression of C/EBP- α and PPAR- γ mRNA and protein in 3T3-L1 adipocytes. The cells were treated with BTS and OJS at different concentrations for 3days during differentiation. The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=3).

7. 오적산이 지방세포 AMPK 단백질 발현 활성화에 미치는 영향

OJS의 항비만 효과에 대한 작용기전을 조사하기 위해 OJS 및 양성대조군 BTS를 처리하여 분화를 유도한 3T3-L1 세포에서 세포 에너지 대사 중심 단백질인 AMPK 활성화 정도를 조사하였다. 분화 유도 후 세포 내 단백질에서 Western blotting으로 AMPK 활성화 (인산화)를 분석한 결과, 분화 전 전구지방세포 (NC)에 비해 분화를 유도한 지방세포 (PC)의 경우 AMPK 인산화는 아무런 변화가 없었으나, OJS 및 BTS를 처리 군에서는 AMPK 인산화 활성이 증가하는 경향을 나타내었다. 특히, OJS 500 μ g/mL을 처리 군에서는 38.26 %의 유의적인 활성을 나타내었다(Fig. 7).

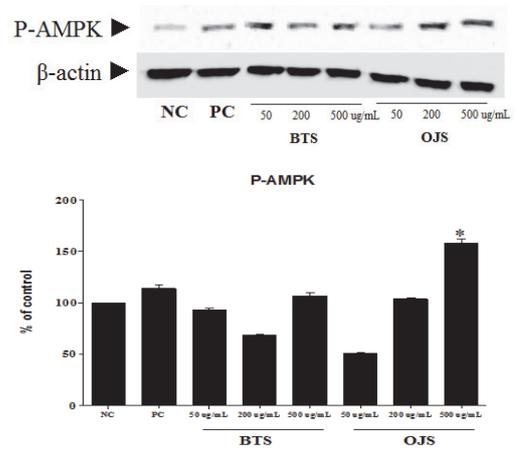


Fig. 7. Effect of Ojeok-san (OJS) on the phosphorylation of AMPK in 3T3-L1 adipocytes. The cells were treated with BTS and OJS at different concentrations for 3days during differentiation. The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=3).

고찰

풍요가 낳은 질병, 비만을 치료하기 위해 무수히 많은 다이어트법이 유행처럼 번졌다 사라지기를 거듭하는가 하면 다이어트를 도와준다는 갖가지 식품과 의약품이 범람하고 있다. 비만은 주로 구미선진국에서 공중보건상의 문제로 지적되어 왔으나 최근에는 국내에서도 경제발전에 따라 비만의 유병률이 급격히 증가하고 있으며, 비만에 의해 유발될 수 있는 각종 심각한 건강상의 문제가 널리 알려짐에 따라 의료인뿐만 아니라 일반대중의 관심과 우려가 높아지고 있다⁽¹⁰⁻¹²⁾.

비만이란 대사장애로 인해 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 말한다. 즉, 칼로리 섭취가 신체활동과 성장에 필요한 에너지보다 초과되어 중성지방의 형태로 지방조직에 과잉 축적된 열량불균형의 상태로 정의될 수 있다⁽¹³⁾.

한의학에서는 비만을 주로 습(濕), 담(痰), 기허(氣虛) 등에서 기인하며, 장부(臟腑) 중에서는 주로 비(脾)와 폐(肺) 및 신(腎)의 기능과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고 있다⁽¹⁴⁾. 즉, 기허(氣虛), 활동감소, 스트레스, 영양과잉 등의 요인과 폐(肺)의 선발(宣發)과 속강(肅降), 비(脾)의 운화수포(運化輸布) 및 신(腎)의 증등기화(蒸騰氣化)와 같은 기능의 저하가 연관되어 습(濕)이나 담(痰)과 같은 수액대사의 이상으로 인한 비생리적 체액의 저류를 일으킴으로 인해 비만이 유발되는 것으로 설명하고 있으며, 각각 그 유형에 따라 비허이수습정체형(脾虛而水濕停滯型), 담음형(痰飲型), 양허겸수습형(陽虛兼水濕型), 식적형(食積型), 간울형(肝鬱型), 어혈형(瘀血型) 등으로 분류하고 있다⁽¹⁵⁾.

따라서 본 연구는 이와 같은 양한방의 원리를 바탕으로 오적산의 항비만 효과로 비만의 주 지표인 지방세포 분화에 대한 이해와 생체 내 지방세포 조절기전에 대한 규명으로 오적산이 효과적인 항비만 치료제로 개발할 수 있는 근거가 되므로, 동물실험과 지방세포 조절에 대한 연구를 진행하였다.

세포수준에서 비만은 지방전구세포의 지방세포 분화에 의한 지방세포 수와 크기의 증가가 원인으로 작용한다. 내장등에 축적된 지방조직들은 에너지 저장 뿐만 아니라, 체내 지방

및 당 대사 등으로 체내 에너지 대사를 조절하는데 중요한 역할을 한다¹⁶⁾. 이에 본 연구에서는 OJS의 체지방 축적에 대한 억제효과를 확인하기 위해, 고지방 식이로 비만을 유도한 생쥐에서 OJS을 함께 투여하여 대조군인 BTS 대조군과 같이 유의한 체중감소와 내장지방 축적량이 감소하는 것을 볼 수 있었고, 또한 3T3-L1 지방세포 분화에도 유의적으로 감소하는 것으로 보아 OJS이 지방세포에서 지방축적 및 지방분화를 억제하는 것으로 보인다. 또한, OJS은 단순한 지방축적 및 분화의 억제뿐만 아니라, 지방전구세포의 지방세포 분화 조절기전에서 분화 후기에 발현되어 지방세포에 특이적인 유전자의 발현을 활성화시킴으로써 분화를 더욱 촉진시켜 분화과정을 완성¹⁷⁾ 시키고, 성숙한 지방세포 생성을 위한 인슐린 감수성에 중요한 역할을 담당하는¹⁸⁾, cytidine-cytidine- adenosine-adenosine-thymidine (CCAAT)/enhancer binding proteins (C/EBP- α , C/EBP- β , C/EBP- δ) 및 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- γ) 등과 같은 지방합성 전사인자 등¹⁹⁾ 또한 OJS이 용량 의존적으로 대조군인 BTS보다 감소하는 것을 나타내었다. 그리고 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 serine / threonine kinase의 일원으로 세포 내 에너지 상태를 감지하는 "에너지 센서"로 알려져 있는 효소이다²⁰⁾. AMPK는 ATP에 비해 AMP가 증가하는 상황에서 활성화되어 정상 에너지 균형을 회복시키기 위해 ATP를 소비하는 과정 즉 지방산, 콜레스테롤 등의 합성을 억제하고 반대로 ATP를 생산하는 과정으로써 지방산 산화, 해당과정을 활성화시킨다²¹⁾. AMPK는 지방산 합성에서 ACC 등 핵심 효소를 억제함으로써 ATP의 추가적 사용을 억제한다²²⁾. 본 연구에서는 비만의 표적 단백질인 AMPK 인산화 활성을 보고자 Western blot 방법으로 측정하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 OJS이 용량 의존적으로 대조군인 BTS보다 AMPK를 현저하게 인산화 시켰으며, 이 결과 OJS으로 인해 지방산 산화가 촉진되는 것으로 해석이 가능하다.

이상의 결과들로 OJS 한약제제의 동물실험에서 유의적인 체중 감소 및 지방 축적 감소와 지방세포 3T3-L1에서 초기 지방세포 분화 관련인자인 C/EBP- α 와 PPAR- γ 의 발현억제 및 AMPK의 인산화 증가로 지방세포의 분화 억제 및 세포내 지방합성 억제 효과로 OJS의 항비만 예방 및 치료의 후보 한약제제로서의 개발 가능성을 보여준다.

결론

본 연구에서는 OJS의 항비만 효능을 효과를 검증하기 위하여 고지방식이 유도 비만 동물실험과 지방세포 (3T3-L1) 실험을 진행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. OJS는 유의한 체중억제와 지방 조직무게 감소 효과를 나타내었다.
2. OJS는 농도 의존적으로 3T3-L1 지방세포의 분화를 억제시켰다.
3. OJS는 3T3-L1세포에서 C/EBP- α 와 PPAR- γ 의 발현을 억제함으로써 지방축적을 감소시켰다.

4. OJS는 3T3-L1세포에서 AMPK의 인산화를 현저히 증가시켰다.

따라서 OJS는 고지방식이 비만 마우스에서 항비만 효과와 3T3-L1 지방세포분화 억제효과를 통해 비만개선약물로 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

References

1. Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2009 Korea national health and nutrition and examination survey. Ministry of Health and Welfare, 2010.
2. Cha MK, Lee JY, Kim DG, Lee KT. Effect of Bangpoongtongsungsan on adipose tissue and hyperlipidemia of 3T3-L1 induced rats. J Korean Orient Pediatr. 2006 ; 20 : 177-96.
3. Hwang SJ, Song TW, Oh MS. The inhibitory effects of Bangpungdong seung-san on the obese gene and obese inhibitory about obese-mouse induced by high fat diet. J Kor Orient Med. 2006 ; 27 : 11-22.
4. Lee SI, CheonJinChubangHaesul, Seoul : Seongbosa, 1987 : 118.
5. Yoon KY, Dongui Imsang Bangjehak, Seoul : Myoung Bo Press, 1985 : 50.
6. Bae BC, PhoJun Imsang Bangjehak, Seoul : Seongbosa, 1995 : 206.
7. Park HJ, Oh MS, Kim EJ, Lee SG, Park SK, Kim YK. The Analysis of Main Diseases and Herbal Preparations in Herbal Health Insurance. Kor J Herbol, 2006 ; 21(4) : 1-10.
8. Lee NH, Ha HK, Lee HY, Jung DY, Choi JY, Lee JK, Shin HK. Analysis of Studies on Ojeok-san for Establishment of Evidence Based Medicine. Kor J Orient Med Prescr. 2008 ; 16(2) : 1-9.
9. Kim JH, Soh KS, Jeong CG, Kim KH. Effects of Ojuck-san on Hyperlipidemia in Rats. Kor J Orient Pre Med Soc. 2004 ; 8(2) : 185-202.
10. Park YS, Lee DH, Choi JM, Kang YJ, Kim CH. Trend of obesity in school age children in Seoul over the past 23 years. Kor J Pediatr. 2004 ; 47 : 247-57.
11. Hur HJ, Hwang JT. Effect of Silybin on body weight and glucose tolerance in high-fat-diet induced obese mice. KSBB J. 2011 ; 26 : 78-82.
12. 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 Herbol, 2012 ; 27(4) : 53-8.
13. Bray MS. Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. J Appl Physiol.

- 1985 ; 88(2) : 788-92.
14. Lee JS, Lee SH. The Reductive Effects of Oriental Medicine on the Body Fat and Abdominal Obesity. *J Korean Soc Study Obes.* 2001 ; 1 : 33-42.
 15. Park BJ. Herbal Diet of Obese with Osteoarthritis. *J Korean Soc Study Obes.* 2004 ; 4 : 201-11.
 16. Fruhbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol.* 2008 ; 456 : 1-22.
 17. Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr.* 2000 ; 130 : 3122-6.
 18. 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.
 19. Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr.* 2000 ; 130(12) : 3116-21.
 20. Nammi S, Sreemantula S, Roufogalis BD. Protective effects of ethanolic extract of *Zingiber officinale* rhizome on the development of metabolic syndrome in high-fat diet-fed rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009 ; 104(5) : 366-73.
 21. Kola B, Grossman AB, Korbonits M. The role of AMP-activated protein kinase in obesity. *Front Horm Res.* 2008 ; 36 : 198-211.
 22. Landree LE, Hanlon AL, Strong DW, Rumbaugh G, Miller IM, Thupari JN, Connolly EC, Haganir RL, Richardson C, Witters LA, Kuhajda FP, Ronnett GV. C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism. *J Biol Chem.* 2004 ; 279(5) : 3817-27.