

三元丹 에탄올 추출물이 비만유도인자에 미치는 영향

강경수^{1,2#}, 이해진^{3,4}, 심부용⁴, 박지원⁴, 최학주⁴, 김동희^{2,4*}

1 : 광주여자대학교 대체의학과, 2 : 대전대학교 한의학과 병리학교실,
3 : 대전대학교 뷰티건강관리학과 미용의학, 4 : 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명과학연구소

Effect of the Samwondan Ethanol Extract on Obesity Inducer

Kyung-Su Kang^{1,2#}, Hae-Jin Lee^{3,4}, Boo-Yong Sim⁴, Ji-Won Bak⁴, Hak-Joo Choi⁴, Dong-Hee Kim^{2,4*}

1 : Department of Alternative Medicine, Kwangju Women's University
2 : Department college of Oriental Medicine, Daejeon University
3 : Department college of Beauty & Healthy Medicine, Daejeon University
4 : Traditional and Biomedical Research Center (TBRC), Daejeon University

ABSTRACT

Objectives : In this study, we investigated the biological activities such as anti-obesity using Samwondan ethanol extract (SWD). SWD is a complex with *Salicornia herbacea* Linnaeus, *Saururus chinensis* Baill and *Houttuynia cordata* Thunberg as the main raw material.

Methods : The SWD was extracted 80% ethanol. 3T3-L1 preadipocytes were induced adipogenesis by differentiation media with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL. Effect of SWD performed using MTT assay, oil red O staining (observation by microscope), and reverse transcription polymerase chain reaction. Also we measured production of triglyceride (TG), fatty acid, and acetyl-CoA carboxylase (ACC).

Results : Non-cytotoxicity was in all test group from range of 1 µg/mL to 100 µg/mL on pre-adipocyte. The droplet and production of lipid were decreased significantly by the SWD. And TG was decreased by approximately 89%, 85% and 82%, upon the SWD treatment at concentration of 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL. Moreover, the SWD showed inhibitory effects on the expression of the C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein)β, C/EBPα, and peroxisome proliferator-activated receptor γ genes in adipocytes. The SWD at 100 µg/mL concentration showed inhibitory effect on fatty acid production by 79%. Also ACC production were decreased dose-dependently.

Conclusions : From the results above, we concluded that the SWD indicated significantly anti-obesity effects.

Key words : Obesity, Adipogenesis, *Salicornia herbacea* Linnaeus, *Saururus chinensis* Baill, *Houttuynia*

서론

비만은 체지방이 과잉 축적된 상태로 adipocyte 수의 증가나 adipocyte 크기가 증가됨에 따라 체중이 과도하게 증가된 상태의 대사질환을 말하며, adipocyte의 이상발달이라고도 알려져 있다¹⁾. 비만의 원인에는 여러 가지 요소가 복합적으로 작용하는데, 특히 동물성 식품, 포화지방이 다량 함유된 가공

식품의 섭취 증가와 불규칙한 식습관, 스트레스 등이 주요한 원인으로 작용하고 있으며²⁾, 유전적인 요인도 작용한다고 보고되어져 있다³⁾. 비만은 당뇨⁴⁾, 고혈압⁵⁾, 심혈관계 질환⁶⁾, 고지혈증⁷⁾과 같은 성인병을 일으키는 주요 요인으로 밝혀지면서 심각한 질환으로 대두되고 있으며, 지속적인 증가 추세를 보이고 있어 국가적으로 비만 예방 및 치료에 관심이 급증하고 있는 실정이다³⁾.

*Corresponding author : Dong-Hee Kim, Department college of Oriental Medicine, Daejeon University
· Tel : +82-42-280-2623 · Fax : +82-42-280-2624 · E-mail : dhkim@dju.kr

#First author : Kyung-Su Kang, Department of Alternative Medicine, Kwangju Women's University
· Tel : +82-10-3610-6251 · E-mail : tcmks@kwu.ac.kr
· Received : 10 June 2015 · Revised : 17 July 2015 · Accepted : 22 July 2015

Adipogenesis는 pre-adipocyte가 adipocyte로 분화되는 과정으로 형태변화, 다양한 유전자 발현 및 호르몬 민감성 등의 변화를 동반하게 된다^{8,9)}. Adipogenesis 과정에 대한 모델로서 3T3-L1, 3T3-F422A 그리고 Ob1771 등의 세포가 in vitro 연구에 주로 이용되고 있으며¹⁰⁾, adipogenesis를 억제 또는 지연 시키는 것은 비만예방 및 관리에 있어 중요한 타깃으로 알려져 있다. Adipocyte의 분화과정 중에 다양한 전사인자의 발현이 나타나는데, 초기에 CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β)의 발현이 시작되며, C/EBP α 와 peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ)의 발현을 유도하게 된다^{8,10)}. C/EBP α 와 PPAR γ 은 adipogenesis를 조절하는 핵심 전사인자(transcription factor)로서 분화의 후기에 높게 발현되어 adipocyte로의 분화를 촉진하며, acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 생성과 fatty acid의 생성을 유도하게 된다. Fatty acid는 중성지방을 구성하는 요소로 작용하며, ACC는 fatty acid 합성의 중간체인 malonyl-CoA의 합성에 관여하여 반응을 촉매 하는 효소로 작용한다^{11,12)}.

한의학적으로 비만을 일으키는 과정은 膏粱厚味한 음식을 과식하거나 다식하면 脾胃의 運化作用을 失調하게되어 열을 발생하며, 熱이 盛해 津液을 灼하고 陰津이 耗傷하여 음식을 구하게 되어 음식섭취가 왕성하게 되어 비만이 된다고 하였다¹³⁾. 또한 氣虛하면 運化機能이 무력하여지고 濕痰이 발생하여 비만을 야기하며, 濕痰, 痰飲을 비만을 일으키는 중요한 원인으로 보았다¹⁴⁾.

본 연구에서 사용된 三元丹 (samwondan, 삼원단)은 鹹草, 三白草, 魚腥草 및 甘草 복합물로 鹹草는 解毒과 潤腸通便, 血壓強化 등의 효능을 가지고 있으며, 腰痛, 糖尿, 哮喘, 皮膚病, 關節炎 등에 사용된다고 수록되어져 있고^{15,16)}, 三白草는 清熱解毒, 利尿消腫 등의 효능으로 小便不利, 淋瀝澀痛 등에 사용한다고 알려져 있다¹⁷⁾. 또한 魚腥草는 熱毒癰腫, 痔疾脫肛을 치료하고 粘質을 치료하며 尿의 중독을 풀어준다고 하였으며, 肺癰腫으로 인한 咳嗽에 血膿이 나오는 증상, 膽에서 비린내와 악취가 나는 증상, 大腸 熱毒, 痔疾을 치료 한다¹⁸⁾라고 알려져 있다.

따라서 解毒作用 및 潤腸通便하는 鹹草와 利尿消腫 및 清熱解毒하는 三白草 및 粘質治療 하는 魚腥草로 이루어진 三元丹이 항비만의 가능성이 있을 것이라 사료되어 복합물로 활용하였다. 三元丹의 구성 약재의 선행연구로는 鹹草의 경우 간독성 보호¹⁹⁾, 항균²⁰⁾, 생리활성²¹⁾ 등에 대한 연구가 이미 보고되어져 있고 항비만과 관련된 연구로는 鹹草 물 추출물의 leptin과 adiponectin 감소 효능²²⁾, 鹹草 분말의 항비만 효능²³⁾ 등이 보고되어져 있다. 三白草는 파골세포분화억제¹⁷⁾, 항산화 및 피부미백작용²⁴⁾ 등의 효능이 보고되어져 있으며, adipocyte 분화에 관련된 인자를 저해시킨다는 연구가 보고되어져 있다²⁵⁾. 또한 魚腥草는 대식세포 항염 활성¹⁸⁾, 항알레르기효능²⁶⁾ 등에 대한 연구가 이미 보고되어져 있다.

본 연구에서는 三元丹의 adipogenesis 과정에 관련된 다양한 인자들에 대한 영향을 확인 하여 제품화를 위한 중요한 자료로써 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 약재 및 추출

본 실험에 사용한 三元丹 (삼원단; samwondan 이하 SWD로 표기)의 구성 약재들은 (주)옵니허브에서 구입하였다. 三元丹은 Table 1의 분량에 80% 주정 500 mL을 넣고 3시간 동안 환류추출 후 여과액을 얻어 감압 농축하였다. 농축된 용액은 freeze dryer로 동결 건조하여 분말 8.2 g (수득률, 7.85%)을 얻었다.

Table 1. The Prescription of SWD

Herbal name	Korean name	Scientific name	Weight (g)
鹹草	함초	Salicornia herbacea Linnaeus	30
三白草	삼백초	Saururus chinensis Baill	20
魚腥草	어성초	Houttuynia cordata Thunberg	12.5
甘草	감초	Glycyrrhiza glabra Linne	1.9
Total amount			64.4

2. 시약

사용된 시약은 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청(fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), isopropanol (Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), streptomycin (Hyclone Co., U.S.A.), total RNA prep kit (Intronbio., Korea), triglyceride detection kit (Sigma Co., U.S.A.), fatty acid detection kit (Sigma Co., U.S.A.), ACC detection kit (Sigma Co., U.S.A.), Oil red O powder (Sigma Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

3. 세포 배양 및 분화

본 연구에 사용된 3T3-L1 pre-adipocyte는 American Type Culture Collection (U.S.A)에서 구매하여 사용하였다. 세포배양은 10% bovine calf serum (BSA)과 1% 항생제로 조성된 DMEM 배지에 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 세포 분화는 pre-adipocyte의 밀도가 80%가 된 것을 확인 후 differentiation media (DM, 10% FBS, 10 μ g/mL insulin, 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM IBMX)으로 교체한 후 시료를 처리하고 2일간 배양하였다. Differentiation maintain media (DMM, 10% FBS, 10 μ g/mL insulin)으로 교체하여 시료를 다시 처리하였으며, 2일 간격으로 DMM과 시료를 교체하여 5일 동안 배양하여 adipocyte로 분화시켰다.

4. MTT 분석

3T3-L1 세포는 96 well plate에 104 cells/well씩 분주하여 48시간 동안 배양하였다. 새로운 배양액으로 교체하였고, 시료 각각을 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL의 농도로

처리하여 다시 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μ L의 cell viability solution을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

5. Oil red O (ORO) 염색

Adipocyte로 분화되는 정도를 확인하기 위하여 ORO 염색법을 시행하였다. Pre-adipocyte는 밀도가 80%가 된 것을 확인 한 후 DM으로 교체 하고 시료를 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL의 농도로 처리하고 2일간 배양하였다. DMM으로 교체하고 시료를 다시 처리하였으며, 2일 간격으로 DMM과 시료를 교체하여 5일 동안 배양하여 adipocyte로 분화시켰다. 배양액을 제거하고 세척하였으며, 10% formalin 용액으로 1시간 동안 고정 시킨 후, 고정액을 제거하고 증류수로 세척하였다. ORO 염색 시약을 넣고 2시간 동안 염색 후 증류수로 세척하고, 염색된 세포를 현미경을 이용하여 관찰하였다. 관찰 후 100% isopropanol을 이용하여 염색시약을 용해 시킨 후에, 96 well plate에 200 μ L씩 옮겨 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지방축적은 대조군의 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었고, 대조군은 시료 없이 분화유도를 하였으며, 정상군은 시료와 분화유도를 모두 가하지 않고 실험을 진행하였다.

6. Triglyceride (TG) 측정

Pre-adipocyte는 밀도가 80%가 된 것을 확인 후 DM으로 교체 하고 시료를 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL의 농도로 처리하고 2일간 배양하였다. DMM으로 교체하고 시료를 다시 처리하였으며, 2일 간격으로 DMM과 시료를 교체하여 5일 동안 배양하여 adipocyte로 분화시켰다. TG를 측정하기 위해서 triglyceride detection kit을 사용하였으며, 결과 값은 triglyceride standard 검량선에 따라 계산하여 대조군의 값에 대한 백분율로 나타내었다. 대조군은 시료 없이 분화유도를 하였으며, 정상군은 시료와 분화유도를 모두 가하지 않고 실험을 진행하였다.

7. RNA 분리 및 RT-PCR 분석

Adipocyte에서 발현된 전사인자를 측정하기 위해 RT-PCR을 시행하였다. Adipocyte는 배양액을 제거하고 세척과정을 거친 뒤 total RNA prep kit을 이용하여 RNA를 추출하였다. 역전사 반응은 추출한 RNA를 RT premix kit의 mixture를 사용하여 first-strand cDNA를 합성하였으며, 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. RT-PCR은 DNA polymerase 1U/tube에 250 mM dNTPs mix, RT buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 30 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)를 포함한 mixture에 각 샘플과 primer를 넣고 PCR을 시행하였다. 사용된 primer는 Table 2와 같다. 1% agarose gel에 전기영동 후 유전자 발현의 여부를 UV로 촬영하여 각 그룹별로 band를 확인하였다. 대조군은 시료 없이 분화배지만 처리하였으며, 정상군은 분화를 유도하지 않은 세포에서 실험을 진행하였다.

Table 2. Primer sequences of target molecules for PCR

Primer	F/R	Sequences
C/EBP β	F	CCTTATAAACCTCCCGCTCG
	R	TCCAGGTAGGGGCTGAAGTC
C/EBP α	F	GGTGCTGGAGTTGACCACTG
	R	CGGAATCTCCTAGTCTGGC
PPAR γ	F	GAGCCGTGACCACTGACAAC
	R	TTGGCTGGTCCAGTAAGAG
β -actin	F	GATGCCCTGAGGCTCTTTTC
	R	TCAGCAATGCCTGGGTACAT

8. Fatty acid 측정

Fatty acid (FA)를 측정하기 위하여 fatty acid detection kit을 사용하였다. Pre-adipocyte는 밀도가 80%가 된 것을 확인 후 DM으로 교체 하고 시료를 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL의 농도로 처리하고 2일간 배양하였다. DMM으로 교체하고 시료를 다시 처리하였으며, 2일 간격으로 DMM과 시료를 교체하여 5일 동안 배양하여 adipocyte로 분화시켰다. FA의 양은 FA standard를 이용해 계산하여 대조군의 값에 대한 백분율로 나타내었다. 대조군은 시료 없이 분화유도를 하였으며, 정상군은 시료와 분화유도를 모두 가하지 않고 실험을 진행하였다.

9. Acetyl CoA carboxylase (ACC) 측정

ACC는 ACC detection kit를 이용하여 측정하였다. Pre-adipocyte의 밀도가 80%가 된 것을 확인 후 DM으로 교체 하고 시료를 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL의 농도로 처리하고 2일간 배양하였다. DMM으로 교체하고 시료를 다시 처리하였으며, 2일 간격으로 DMM과 시료를 교체하여 5일 동안 배양하여 adipocyte로 분화시켰다. ACC의 양은 대조군의 값에 대한 백분율로 나타내었다. 대조군은 시료 없이 분화유도를 하였으며, 정상군은 시료와 분화유도를 모두 가하지 않고 실험을 진행하였다.

10. 통계분석

실험 결과는 실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's *T*-test를 사용하여 통계분석 하였으며 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 세포독성

SWD의 세포 생존율을 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL 농도에서 확인한 결과, 대조군을 100%로 하였을 때, 각각 $100.4 \pm 3.2\%$, $99.9 \pm 4.1\%$, $100.9 \pm 7.8\%$ 로 나타나 세포독성이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

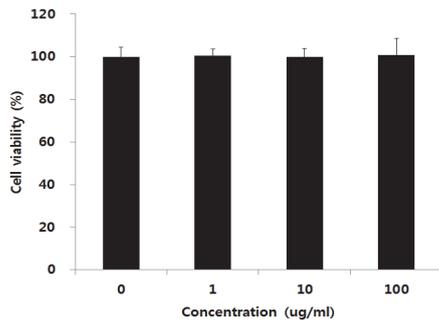


Fig 1. Effect of SWD on cell viability in pre-adipocytes. The cells were treated with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL for 48hr. Cell viability was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean ± standard from 3 independent experiments.

2. ORO 염색에 의한 세포내 지방축적에 미치는 영향

지방분화를 억제하는 것을 측정하는 결과, ORO 염색에서 현미경으로 관찰 하였을 때, 농도에 따라 지방축적이 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2-A). 정량적 측정에서, 대조군을 100%로 하였을 때, SWD는 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL 농도에서 각각 82.9 ± 3.3%, 76.5 ± 1.7%, 66.6 ± 3.9%로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2-B).

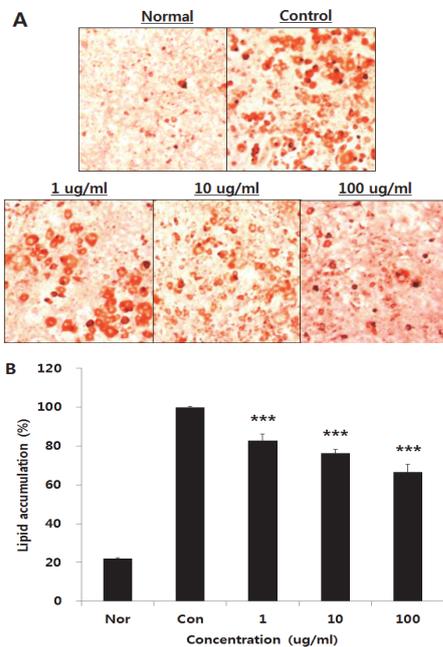


Fig. 2. Effect of SWD on the lipid droplet formation and accumulation in adipocyte. Pre-adipocytes were cultured in the DM with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL. After 2 days, the medium was switched to DMM with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL for 2 days, and then changed to DMM and SWD treatment at indicated concentrations for an additional 2 days to induce differentiation. (A) The intracellular lipid droplets were detected by Oil red O staining and optically observed by an inverted microscope (×25). (B) The rates of lipid accumulation were measured at λ =510 nm wavelength by a plate reader. Each value represents the mean±standard from 3 independent experiments (significance of results: *** p<0.001 for control). Nor, pre-adipocyte; Con, adipocyte without SWD.

3. TG 생성에 미치는 영향

TG 생성을 측정한 결과, 대조군을 100%로 하였을 때, SWD는 1 µg/mL의 농도에서 89.5 ± 0.7%로 감소되었고, 10 µg/mL와 100 µg/mL의 농도에서는 85.6 ± 1.9%, 82.1 ± 2.7%로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 3).

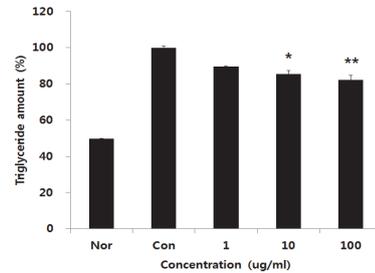


Fig. 3. Effect of SWD on the TG accumulation in adipocyte. Pre-adipocytes were cultured in the DM with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL. After 2 days, the medium was switched to DMM with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL for 2 days, and then changed to DMM and SWD treatment at indicated concentrations for an additional 2 days to induce differentiation. The rates of TG accumulation were measured at λ=570 nm. Each value represents the mean ± standard, from 3 independent experiments (significance of results: *p<0.05; **p<0.01 for control). Nor, pre-adipocyte; Con, adipocyte without SWD.

4. adipocyte 분화에 관련된 전사인자에 미치는 영향

전사인자의 발현을 측정하는 결과, 대조군을 100%로 하였을 때, C/EBPβ는 SWD 10 µg/mL와 100 µg/mL의 농도에서 유의하게 감소를 나타냈고(Fig. 4-A), C/EBPα는 100 µg/mL의 농도에서 감소되는 것을 나타냈으며(Fig. 4-B), PPARγ는 농도 의존적 감소를 나타냈다(Fig. 4-C).

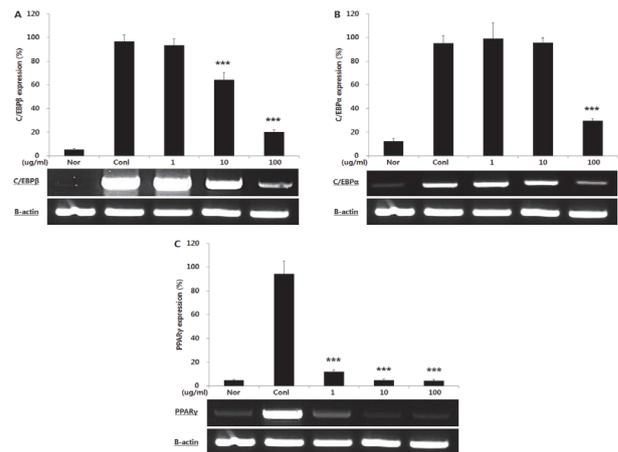


Fig. 4. Effect of SWD on the expression of C/EBPβ, C/EBPα, and PPARγ in adipocyte. Pre-adipocytes were cultured in the DM with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL. After 2 days, the medium was switched to DMM with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL for 2 days, and then changed to DMM and SWD treatment at indicated concentrations for an additional 2 days to induce differentiation. Gel stain and visualized by UV light. And the levels were calculated as a percentage of mRNA expression versus that of β-actin as an internal control. Each value represents the mean±standard from 3 independent experiments (significance of results: ***p<0.001 for control). Nor, pre-adipocyte; Con, adipocyte without SWD.

5. Fatty acid의 생성에 미치는 영향

Fatty acid의 생성을 측정된 결과, 대조군을 100%로 하였을 때, SWD는 1 µg/mL와 10 µg/mL의 농도에서 각각 90.6 ± 3.6 %, 86.5 ± 3.3 %로 감소되었고, 100 µg/mL의 농도에서는 79.0 ± 8.5 %로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 5).

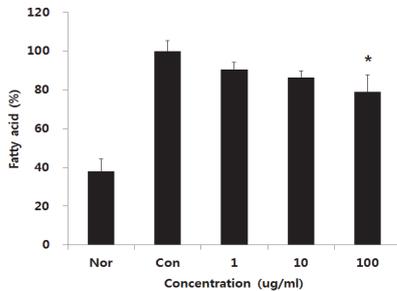


Fig. 5. Effect of SWD on the fatty acid production in adipocyte. Pre-adipocytes were cultured in the DM with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL. After 2 days, the medium was switched to DMM with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL for 2 days, and then changed to DMM and SWD treatment at indicated concentrations for an additional 2 days to induce differentiation. The rates of fatty acid production were measured at $\lambda=540$ nm. Each value represents the mean \pm standard from 3 independent experiments (significance of results: * $p < 0.05$ for control). Nor, pre-adipocyte; Con, adipocyte without SWD.

6. ACC 활성에 미치는 영향

ACC의 생성을 측정된 결과, 대조군을 100%로 하였을 때, SWD는 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL 농도에서 각각 91.6 ± 3.1 %, 85.0 ± 4.6 %, 80.4 ± 6.8 %로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 6).

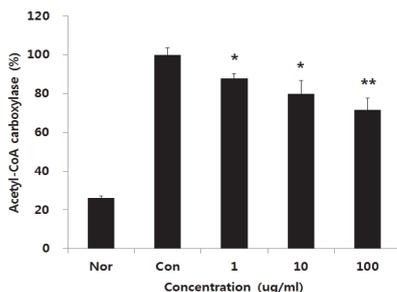


Fig. 6. Effect of SWD on the Lipase production in adipocyte. Pre-adipocytes were cultured in the DM with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL. After 2 days, the medium was switched to DMM with SWD at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL for 2 days, and then changed to DMM and SWD treatment at indicated concentrations for an additional 2 days to induce differentiation. The rates of ACC production were measured at $\lambda=570$ nm. Each value represents the mean \pm standard from 3 independent experiments (significance of results: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ for control). Nor, pre-adipocyte; Con, adipocyte without SWD.

고찰

지방조직은 식욕, 체온조절, 면역 및 신경호르몬 기능을 조절하는 adipokine을 분비하여 에너지 대사의 항상성에 기여

하고 있는 내분비 기관으로 인식되고 있다²⁷⁾. 그러나 체지방이 과도하게 축적되어 비만이 되면, 만성질환의 증가뿐만 아니라 타인에 대한 기피 및 자신감 상실 등으로 인한 정신과적 질환까지 유발할 수 있다²⁸⁾. 따라서 최근에는 식품 및 천연물 소재를 이용하여 adipogenesis를 억제함으로써 비만을 예방하고자 하는 연구가 다양하게 시도되고 있다.

본 연구에서는 SWD가 adipogenesis에 연관된 인자들에 미치는 영향에 대해 확인하고, 비만을 예방 및 치료할 수 있는 기능성 식품으로의 가능성을 연구하고자 한다.

3T3-L1 pre-adipocyte는 adipogenesis에 대한 분화 특성이 잘 알려져 있고 항비만 활성의 비교 모델로 널리 사용되고 있다²⁸⁾. Adipogenesis가 시작되면 지방축적이 형성되며, 이 과정에서 수많은 조절 인자들이 작용한다^{12,29)}. 축적된 지방의 대부분은 중성지방으로 지질대사 및 조절에 영향을 미친다²⁹⁾. 본 연구에서 SWD를 처리하였을 때, ORO 염색을 통해 지방축적의 감소를 확인하였고, 지방을 용해하여 정량 분석한 결과에서 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, TG의 생성이 유의하게 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 SWD가 adipogenesis의 과정에서 분화 인자에 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단된다.

Adipogenesis 과정은 여러 전사인자의 발현에 의한 체계적인 신호전달과정을 통해 진행되며, 연구 보고에 따르면 대표적으로 C/EBPs와 PPAR γ 가 중요한 인자로서 인식되고 있다³⁰⁾. C/EBP β 는 세포분열 유도물질과 호르몬의 자극에 의하여 분화초기에 빠르게 발현되어 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현을 촉진시킨다³¹⁾. C/EBP α 와 PPAR γ 는 adipogenesis의 핵심 전사인자(adipogenic transcriptional key markers)로서 분화 후기에 발현이 되어 분화를 촉진하고 분화를 완성하는데 관여하며³²⁾, adipocyte 분화를 위해 서로 상호작용 한다³³⁾. 연구자에 따라 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현시기에 대해서, 후기에 거의 같은 시기에 두 전사인자가 발현된다고 보는 연구도 있고³⁰⁾, PPAR γ 가 발현된 후 C/EBP α 의 발현이 발현되기 시작하여 촉진된다는 연구도 보고되어져 있다³⁴⁾. 또한 C/EBP α 와 PPAR γ 는 지질 대사에 나타나는 fatty acid synthase와 fatty acid binding protein 4의 유전자 전사 촉매제(transcriptional activators)로 작용하여 발현을 촉진 시키며^{35,36)}, acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 생성과도 관련이 되어져 있다³⁷⁾. 본 연구에서 C/EBP β 와 PPAR γ 는 농도의존적인 감소를 나타내었고, C/EBP α 의 경우 고농도에서 감소하는 양상을 나타냈다. 이는 SWD가 분화 초기인자인 C/EBP β 를 억제시켜 PPAR γ 에도 영향을 미치지 않지만, C/EBP α 에 더 강한 영향을 미칠 수 있다고 사료되며, 서로 상향조절 하는 것 또한 감소시키는 것으로 판단된다.

ACC는 fatty acid 대사조절을 하여 세포질에서 fatty acid을 합성시켜 adipocyte의 adipogenesis의 과정에 영향을 미친다고 보고되어져 있다^{11,37)}. 또한 fatty acid는 adipogenesis가 진행되는 동안 PPAR γ 의 리간드로 작용하여 PPAR γ 를 더욱 활성화시킨다³⁸⁾. 본 연구에서 fatty acid의 생성을 SWD가 농도에 따라 감소시켰고, 특히 100 µg/mL의 농도에서 현저하게 감소를 나타냈다. 또한 ACC는 농도에 따른 유의적인 감소가 나타났다. 이 결과로 SWD는 지방을 형성하는 것에 직접적으로 영향을 미칠 수 있다고 사료된다.

결과적으로, SWD는 adipogenesis에서 초기 분화에 관여

된 전사인자에 영향을 미침으로써 연계된 분화과정을 차단하여 비만을 예방할 수 있음을 객관적으로 확인할 수 있었다. 다만 제품화를 위해서는 각 구성약제의 효능 평가와 더불어 최적의 구성 비율에 대한 연구 역시 지속적으로 이루어져야 할 것으로 보인다.

결론

현재 임상에서 비만에 활용되고 있는 三元丹의 adipogenesis 과정에 관련된 다양한 인자들에 대한 효능을 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SWD의 세포독성은 확인되지 않았다.
2. Oil red O 염색 관찰 결과 SWD가 지방축적을 현저하게 감소시켰으며, 정량적 평가에서도 현저한 지방축적의 감소를 나타냈다.
3. Triglyceride 생성 측정 결과, SWD는 농도에 따른 감소를 나타냈으며, 10 µg/mL와 100 µg/mL의 농도에서 유의한 감소를 나타냈다.
4. 주요 전사인자의 발현 결과, C/EBPβ는 SWD 10 µg/mL와 100 µg/mL의 농도에서, C/EBPα는 100 µg/mL의 농도에서, PPARγ는 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL의 농도에서 유의한 감소를 나타냈다.
5. Fatty acid의 생성 측정 결과, SWD 100 µg/mL의 농도에서 유의한 감소를 나타냈다.
6. Acetyl CoA carboxylase의 생성 측정 결과, SWD의 농도에 따라 유의한 감소를 나타냈다.

이와 같은 결과는 SWD는 pre-adipocyte에서 adipocyte로의 분화과정 중, 초기 분화에 관여된 인자에 영향을 미치는 것을 확인하였고, 이로 인하여 연계된 분화과정에도 영향을 미쳐 항비만 효능을 나타내는 것으로 사료되며, 유의적인 항비만 활성이 있음을 객관적으로 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

References

1. Lee YM, Jung HJ. Inhibitory Effect of Heartwood of *Rhus verniciflua* Stokes on Lipid Accumulation in 3T3-L1 Cells. *Kor J Pharmacogn*. 2010 ; 41(1) : 21-5.
2. Lee KS, Lee JH. Effect of the Dietary Approaches to Stop Hypertension diet with aerobic exercise on body composition and blood Lipid profiles in obese individuals. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2010 ; 14(1) : 17-21.
3. 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) : 720-8.
4. Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 ; 28 : S12-21.
5. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 ; 414 : 799-806.
6. Visscher TL, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health*. 2001 ; 22 : 355-75.
7. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 ; 404 : 635-43.
8. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006 ; 4 : 263-73.
9. Kim HS, You JH, Jo YC, Lee YG, Park IH, Park JW, Jung MA, Kim YS, Kim SO. Inhibitory Effects of *Lentinus edodes* and Rice with *Lentinus edodes* mycelium on Diabetes and Obesity. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2013 ; 42(2) : 175-81.
10. Huang H, Lane MD, Tang QQ. Effect of serum on the down-regulation of CHOP-10 during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 ; 338 : 1185-8.
11. Barber MC, Price NT, Travers MT. Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochim Biophys Acta*. 2005 ; 1733(1) : 1-28.
12. Jay D, Horton, Joseph L, Goldstein, Michael S, Brown. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002 ; 109 : 1125-31.
13. Lee HC, Choi YM, Sim WJ, Kim KS, Choi SM, Shin SU. The study of the relationship with abdominal visceral fat in obese patients identified as phlegm type. *J Korean Med Obes Res*. 2006 ; 6(1) : 51-9.
14. Hong JA, Kim SS, Shin HD. A Case Report on Types of Identification of Symptom in Obese Patients. *J Orien Rehabil Med*. 2001 ; 11(3) : 63-71.
15. Choi JK. Korean herbs, flowers, and trees as traditional medicine 1. Seoul : Hanmunhwa, 2001 : 63-74.
16. Kim HS, Park JW, Lee YJ, Shin GW, Park IB, Jo

- YC. The Amino Acid Content and Antioxidant Activities of Glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Korean J Food Preserv.* 2009 ; 16(3) : 427-34.
17. Kim JY, Jung JH, Lee MS, Lee CH, Kim YK, Jeon BH, Kwak HB, Kim JY, Choi MK, Kim JJ, Oh JM. Effect of *Saururus Chinensis* in RANKL-induced Osteoclast Differentiation. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2012 ; 26(6) : 869-73.
 18. Lee JY, Lee YJ, Park WS. Anti-inflammatory Effects of Fermented *Houttuyniae Herba* Water Extract on LPS-induced Mouse Macrophage. *Kor J Herbol.* 2010 ; 25(3) : 27-34.
 19. Ha BJ, Lee SH. The protective effect of *Salicornia herbacea* L. against liver toxicity. *Life Sci.* 2006 ; 16(1) : 95-100.
 20. Lee JT, An BJ. Detection of physical activity of *Salicornia herbacea*. *Kor J Herbol.* 2002 ; 17(2) : 61-9.
 21. Lee JT, Jeong YS, An BJ. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and Its application for Cosmetic materials. *Kor J Herbol.* 2002 ; 17(2) : 51-60.
 22. Kim MJ, Jun HY, Kim JH. Antiadipogenic Effect of Korean Glasswort (*Salicornia herbacea* L.) Water Extract on 3T3-L1 Adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2014 ; 43(6) : 814-21.
 23. Kim MJ, Jun HY, Kim JH. Anti-obesity effect of Korean Hamcho (*Salicornia herbacea* L.) powder on high-fat diet-induced obese rats. *J Nutr Health.* 2015 ; 18(2) : 123-32.
 24. Pack DJ, Lee JC. A Study on the Antioxidative and Depigmentation Activities of the Ethanol Extract of *Saururus Herba*. *Kor J Herbol.* 2008 ; 23(2) : 193-202.
 25. Rho BG, Shin MK, Song HJ. Studies on the antiallergic reaction of the *Herba Houttuyniae* extract. *Kor J Herbol.* 1998 ; 13(2) : 77-89.
 26. Hong SW, Lee JM, Choi JH, Park SE, Rhee EJ, Park CY, Oh KW, Park SW, Kim SW, Lee WY. The Effect of AMPK Activation on Wnt and sFRP5 in TNF- α Induced Adipocyte Metabolic Dysfunction in 3T3-L1 Cell. *J Korean Soc Study Obes.* 2012 ; 21(1) : 29-36.
 27. Shin OS, Shin YH, Lee KH, Kim GY, Kim KH, Park JK, Ahn JI, Song KY. Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes with Ethanol Extracts of *Saururus chinensis*. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J.* 2012 ; 27(6) : 381-6.
 28. Shon MS, Kim SK, Lee SC, Kim GN. Anti-obese Activity of Water Extract Prepared from Green-shelled Mussel through Regulating Adipogenesis. *Kor J Aesthet Cosmetol.* 2013 ; 11(6) : 1067-72.
 29. Labreuche J, Touboul PJ, Amarenco P. Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis : a systematic review of the epidemiological studies. *Atherosclerosis.* 2009 ; 203 : 331-45.
 30. White UA, Stephens JM. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 ; 318 : 10-4.
 31. Christy RJ, KH Kaestner, DE Geiman, MD Lane. CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 ; 88 : 2593-7.
 32. Wu Z, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 1999 ; 11 : 689-94.
 33. 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) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. *J Biol Chem.* 2006 ; 281 : 40341-53.
 34. Jung HA, Jung HJ, Jeong HY, Kwon HJ, Kim MS, Choi JS. Anti-adipogenic activity of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* and its constituent fucosterol in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Pharm Res.* 2014 ; 37 : 713-20.
 35. El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and C/EBPalpha. *J Biol Chem.* 1999 ; 274 : 7946-51.
 36. Szatmari I, Rajnavolgyi E, Nagy L. PPARgamma, a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 ; 1088 : 207-18.
 37. Payne VA, Au WS, Lowe CE, Rahman SM, Friedman JE, O'Rahilly S, Rochford JJ. C/EBP transcription factors regulate SREBP1c gene expression during adipogenesis. *Biochem J.* 2009 ; 425(1) : 215-23.
 38. Zhang L, Chawla A. Role of PPAR γ in macrophage biology and atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab.* 2004 ; 15(10) : 500-5.