

## 황백(Phellodendri Cortex)으로부터 분리한 지방세포 분화 저해물질

김경희 · 안순철 · 이명선 · 권오송 · 오원근 · 김민수 · 손천배<sup>1</sup> · 안종석\*

한국생명공학연구원, <sup>1</sup>충남대학교 식품영양학과

### Adipocyte Differentiation Inhibitor Isolated from the Barks of *Phellodendron amurense*

Kyung Hee Kim, Soon Cheol Ahn, Myung Sun Lee, Oh Song Kweon,  
Won Keun Oh, Min Soo Kim, Cheon Bae Sohn<sup>1</sup> and Jong Seog Ahn\*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Chungnam National University

For the development of the anti-obesity natural drug, the inhibitor of adipocyte differentiation was screened from Korean traditional medicinal plants. Phellodendri Cortex was selected as a candidate of adipocyte differentiation inhibitor. An inhibitory compound PC-4 was purified from the methanol (MeOH) extract of Phellodendri Cortex using silica gel and ODS RP-18 column chromatography and HPLC. PC-4 was obtained as yellow powder; UV  $\lambda_{max}$  (MeOH): 230, 260, 340 and 430 nm. The chemical structure of PC-4 was determined as an isoquinoline alkaloid, berberine, on the basis of various NMR experiments including <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR. The PC-4 inhibited the differentiation of preadipocyte NIH-3T3 L1 cells at a concentration of 1  $\mu$ g/mL.

**Key words:** Phellodendri Cortex, inhibitor, adipocyte differentiation, *Phellodendron amurense*, berberine

## 서 론

우리나라에서도 최근에 과다한 음식섭취와 운동부족으로 인해 서구 선진국과 마찬가지로 비만 유발 빈도가 증가하고 있다. 세계보건협회에 따르면 2010년이 되면 서양인의 약 50%가 비만이 될 가능성이 높은 것으로 예상하고 있으며, 따라서 우리나라도 예외는 아닐 것으로 판단된다. 이러한 비만은 단순한 외형상의 문제 뿐 아니라 성인에게 체중과 동반하여 발생하는 고혈압, 고지혈증, 동맥경화, 심장질환, 인슐린 비의존형 제2형 당뇨병(Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM) 등과 같은 성인병을 비롯하여 유방암, 자궁암, 및 대장암 등을 야기하는 것으로 보고되고 있으며<sup>(1,2)</sup> 고혈압, 흉부질환, 암 등의 발병률이 각기 2배씩 높아진다고 밝혀졌다.

비만은 과다한 지방세포의 분화와 불균형적인 에너지 대사에 의해 유발되며 이와 연관된 질병의 이해와 치료를 위해 지방세포의 분화와 지방대사에 대한 연구가 활발히 진행

되어 오고 있다<sup>(3)</sup>. 전구 지방세포(preadipocyte)에서 지방세포(adipocyte)로의 분화는 성장과정 중 특정 호르몬의 급작스러운 양적 변화와 과잉 영양공급에 의해 유발될 수 있으며, 이들 지방세포 분화 유도인자에 의해 신체 내 특정부위에서 지방세포 분화가 일어날 수 있다. 또한, 지방세포의 크기는 한계가 있으므로 과잉 에너지를 섭취할 때 에너지를 신속히 저장하기 위해서 지방세포수의 증가가 일어나게 된다<sup>(3,4)</sup>. 비만과 같은 에너지 과잉에 의한 질환은 환경 및 유전적 요인이 함께 관여하는 다인성 질환으로 비만 관련 여러 유전인자와 과 전사인자들에 의해 조절되는 조절계 및 에너지 대사에 이상이 생겨 일어나는 결과로 여겨진다<sup>(5-12)</sup>.

본 연구에서는 비만조절시스템과 연관지어 비만에 대한 저해활성을 나타내는 물질을 탐색하고자 국내의 식용 또는 약용식물을 대상으로 지방세포분화 저해활성을 측정하여 그 중 저해활성이 높은 황백(Phellodendri Cortex)을 선택하였으며 황백으로부터 전구 지방세포인 NIH-3T3 L1의 지방세포로의 분화를 억제하는 물질을 분리하였기에 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에 사용된 생약재료는 황백나무(*Phellodendron amurense*<sub>RUPRCHT</sub>)의 주피를 벗겨낸 후 말린 줄기껍질인 황백

\*Corresponding author : Jong Seog Ahn, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), P.O. Box 115, Yusong, Daejeon 305-600

Tel: 82-42-860-4312

Fax: 82-42-860-4595

E-mail: jsahn@kribb.re.kr

(Phellodendri Cortex)으로 대전의 일신약품(주)에서 구입하였다. 활성물질 분리 및 확인에 사용된 silica gel(Kiesegel 60, particle size: 0.040-0.063 nm)은 Merck사(Darmstadt, Germany)로부터, ODS RP-18(ODS-A, 120A, S-150  $\mu$ m)은 YMC-GEL사(Tokyo, Japan)로부터 구입하였고, TLC에 이용된 precoated silica gel plates 60F<sub>254</sub>(0.25 mm and 0.5 mm in thickness)와 ODS RP-18 F<sub>254S</sub>(25DC-Platten 5×10 cm)는 Merck사(Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 각 분리단계에 이용된 유기용매는 덕산약품공업(주)의 고순도 제품을 이용하였고, HPLC 용매는 Burdick & Jackson(Muskegon, USA)제품을 사용하였다. NMR용 DMSO는 Norell사(Landisville, USA)로부터 구입하였다. 지방산 생합성 효소(fatty acid synthase, FAS)활성의 측정에 사용한 acetyl-CoA, malonyl-CoA, NADPH는 Sigma(St. Louis, USA)에서, pancreatic lipase assay에 사용한 tributyrin은 Fluka(St. Gallen, Switzerland)에서 gum arabic은 Sigma에서 구입하였다. 세포배양에 사용한 시약 중 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Oil red O, dexamethasone(DEXA), insulin, 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), phosphate buffered saline (PBS)은 Sigma에서, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone (Logan, USA)에서, trypsin, penicillin, streptomycin은 Gibco (Grand Island, USA)에서 구입하였다.

#### 지방세포 분화 저해물질의 분리 및 구조분석

본 실험에 사용된 HPLC는 SCL-6A system controller, SDP-6A UV spectrophotometric detector, LC-6A liquid chromatograph로 구성된 것과 SPD-M10A photo diode array detector, CTO-10A column oven, LC-10AD liquid chromatograph(Shimadzu Scientific Co., Tokyo, Japan)로 구성된 것을 사용하였다. 저해물질을 분리하기 위해 silica gel column chromatography, ODS RP-18 column chromatography, HPLC(YMC-Pack ODS-H80, 250×10 mm I.D., S-4  $\mu$ m, Tokyo, Japan) 등을 사용하여 분리하였고, 구조분석을 위한 <sup>1</sup>H-과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Varian unity-300, Varian unity-500 NMR spectrometer를 이용하여 측정하였으며, 저해물질의 질량분석을 위해 Navigator mass spectrometer(Finnigan, Manchester, UK)를 사용하여 EI-mass를 측정하였다.

#### NIH-3T3 L1 세포의 분화유도

실험에 사용된 NIH-3T3 L1세포(pre-adipocyte)는 ATCC에서 구입하여 DMEM에 10% FBS, 50 U/mL penicillin, 50  $\mu$ g/mL streptomycin과 함께 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에 배양하였다. NIH-3T3 L1세포를 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻어준 후 5×10<sup>4</sup> cells/mL을 12 well-flat plate에 배양하였다. 48시간 후 10% FBS가 첨가된 medium에 0.5 mM DEXA, 10 mg/mL insulin, 1  $\mu$ M IBMx를 48시간 처리하였다. 그 후 6일 동안 이틀에 한번씩 10% FBS가 첨가된 medium에 10  $\mu$ g/mL insulin과 시료를 처리하였다<sup>(13,14)</sup>.

#### NIH-3T3 L1 세포의 분화능 측정

NIH-3T3 L1 세포의 분화는 역상현미경으로 관찰하여 세포내에 밝은색의 작은 지방과립의 형성이 생기는 것으로 확

인하였고 세포의 분화 정도는 Oil red O로 염색하여 측정하였다. Oil red O stock solution(60% triethyl-phosphate 100 mL 에 500 mg Oil red O)을 녹여 여과한 후 용액 12 mL을 취하고 여기에 8 mL의 증류수를 첨가하여 실험에 이용하였다. 세포배양 8일 후 분화된 세포를 관찰하기 위해 10% formaldehyde(Conc. 37%)처리 후 1시간 동안 고정시켰다. PBS로 두 번 세척하여 건조시킨 후 1 mL Oil red O solution을 처리하여 3시간 동안 염색하였다. PBS로 두 번 세척하여 건조시킨 후 isopropanol을 처리하고 세척 후 추출된 염료액을 모아 microplate reader(Beckman, USA) 510 nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>(15,16)</sup>.

#### 지방산 생합성효소 저해활성의 측정

지방산 생합성효소는 Tracy 등<sup>(17)</sup>의 방법에 따라 분리하였다. 중량 250 g인 수컷 SD(Sprague-Dewley)쥐를 2일간 굶긴 후, 지방을 뺀 고탄수화물 식이를 3일간 실시한 후 간을 분리하여 분쇄 후 buffer로 씻어내고 polyethylene glycerol (PEG) 용액과 원심분리 등을 이용하여 지방산 생합성 효소를 분리하였다. 분광학적 방법으로 3 mM acetyl-CoA, 0.2 M DTT, 2.8 mM NADPH 및 검정시료를 포함하는 75 mM의 포스페이트 완충용액 1 mL에 50  $\mu$ L의 지방산 생합성 효소 분획물을 첨가한 뒤 상온에서 30분간 방치한 후, 3 mM의 malonyl-CoA를 반응용액에 넣고 가볍게 흔들어 준 후, 30분간 방치하고 340 nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>(18)</sup>. 방사선 동위원소를 이용한 측정은 3 mM의 malonyl-CoA([malonyl-2-<sup>14</sup>C]-CoA)를 반응용액에 넣은 후 가볍게 흔들어 준 뒤 30분간 반응하였다. 반응을 종결시키기 위하여 0.5 N NaOH 100  $\mu$ L를 넣은 후 끓는 물에서 20분 동안 비누화 반응을 하고 1 N HCl 수용액 0.5  $\mu$ L을 넣어 반응을 중화한 뒤 1.4 mL의 핵산을 넣어 상등액인 핵산층의 방사능도(radioactivity)를 측정하였다<sup>(18)</sup>.

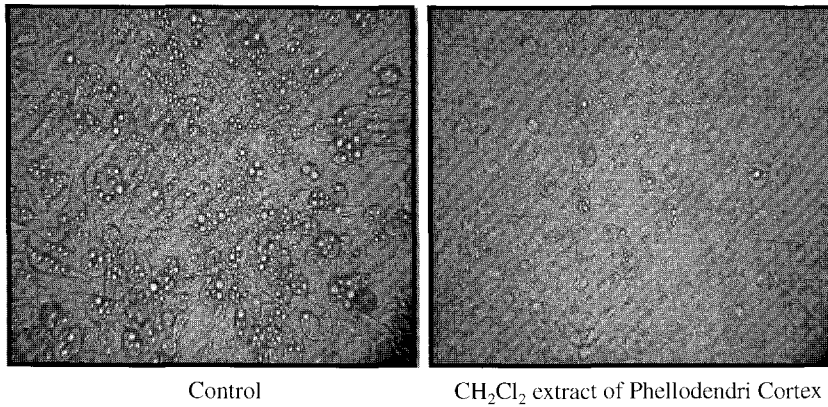
#### Pancreatic lipase 저해활성의 측정

10 mM CaCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl을 포함한 5% gum arabic 용액 100 mL 중 9 mL을 tributyrin 1 mL과 섞어 유화 시킨 후 2% 한천배지에 잘 섞어주었다. 5 mm 두께의 한천배지에 지름 6 mm의 구멍을 뚫고 메탄올에 녹인 시료와 lipase(Sigma, St. Louis, USA)를 반응시켜 넣어준 후 30분마다 투명환(clear zone)이 생성되는 정도를 측정하였다.

## 결 과

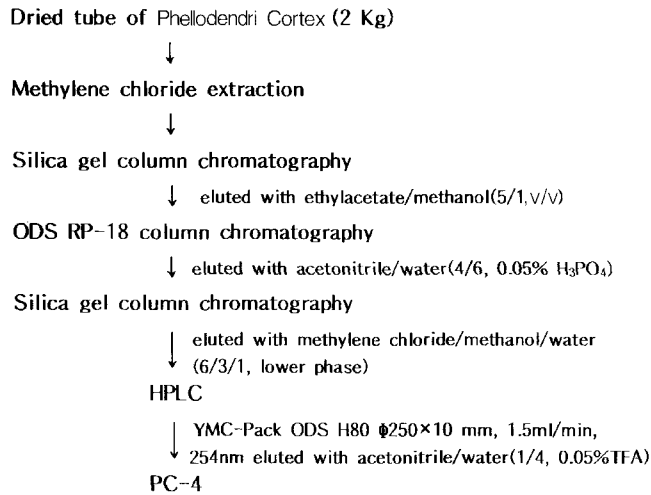
#### 지방세포 분화 저해활성을 갖는 황백(Phellodendri Cortex)의 선정

200종류의 생약 시료 중 NIH-3T3 L1 전구 지방세포의 분화에 대한 저해활성을 조사한 결과, 황백(Phellodendri Cortex)의 methylene chloride 추출물에서 지방세포분화에 대한 강한 저해활성을 보여 최종 후보 생약으로 선정하였다. 미분화상태의 전구지방세포인 NIH-3T3 L1 세포의 지방세포로의 분화에 미치는 황백 methylene chloride추출물의 영향을 조사하기 위해 12-well plate의 각 well에 5×10<sup>4</sup> cells/mL의 세포를 넣고 2일 동안 배양하여 confluent stage 에 도달시킨 후, 0.5



**Fig. 1. Effect of Phellodendri Cortex on adipocyte differentiation.**

NIH-3T3 L1 preadipocytes were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and allowed to reach confluence and then induced to differentiation by the exposure of IBMX, dexamethasone and insulin as described in Materials and Methods. Preadipocytes were treated with no addition (control) or in the presence of 10 µg/mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract of phellodendri Cortex, and the accumulation of lipid droplet were detected.

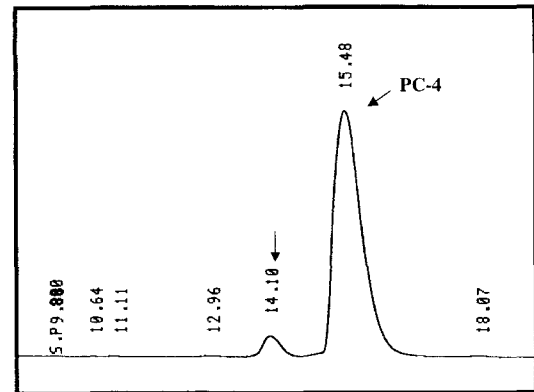


**Fig. 2. Isolation procedure of adipocyte differentiation inhibitor from Phellodendri Cortex.**

mM dexamethasone, 10 µg/mL insulin, 1 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine을 처리하여 2일간 배양한 후 지방세포 분화 저해물질의 첨가 없이 또는 첨가 하에 6일간 배양하였다. 배양 후 황백 추출물 처리에 의한 영향을 조사한 결과 Fig. 1에서 보는바와 같이 10 µg/mL 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 지방세포의 분화를 억제하였다.

**황백으로부터 지방세포 분화 저해물질의 분리**

황백으로부터 지방세포 분화 저해물질을 분리하기 위해 황백을 7일 동안 메탄올에 침지하여 3회 추출하고 감압농축한 후, methylene chloride, 부탄올을 이용하여 용매분획을 실시하였다. 강한 저해활성을 나타내는 methylene chloride층은 감압농축한 후, silica gel column chromatography(Kieselgel 60, particle size: 0.040-0.063 nm)를 실시하였으며 ethyl-acetate : methanol(5 : 1, v/v)의 용매조건으로 활성물질을 용출하였다. 활성분획을 감압농축한 후, ODS RP-18 column chromatography(ODS-A, 120A, S-150 µm)를 실시하였으며 40% aceto-



**Fig. 3. HPLC chromatogram of PC-4 from Phellodendri Cortex.**

Column: YMC-Pack ODS-AM φ 250 × 10 mm, mobile phase: 25% CH<sub>3</sub>CN (0.05% TFA), flow rate: 1.5 mL/min, detector: UV 254 nm.

nitrile(0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)의 용매조건으로 활성분획을 용출하여 감압농축시킨 후 methylene chloride : methanol : H<sub>2</sub>O (6 : 3 : 1, 아래층)의 용매조건으로 silica gel column chromatography를 실시하였다. 이러한 용매조건으로 얻어진 활성분획물을 감압농축하고 methanol에 녹여 HPLC(YMC-Pack ODS-H80, 250 × 10 mm I.D., S-4 µm)를 반복적으로 실시하여 저해물질을 분리하였다(Fig. 2). 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 15.48분대에서 화합물 PC-4를 분리 할 수 있었다.

**황백으로부터 분리한 PC-4의 구조분석**

황백으로부터 분리한 지방세포 분화 저해물질 PC-4의 물리·화학적 특성은 Table 1에서 나타난 바와 같이 노란색의 분말 형태로 메탄올, DMSO, 물에는 잘 녹았으나 클로로포름, 헥산에서는 전혀 녹지 않았다. 메탄올을 용매로 UV 최대 흡수치를 조사한 결과 222, 265, 349, 429 nm에서 최대의 UV 흡수치를 보였으며 산이나 알칼리 조건에서 최대 흡수치의 변화가 관찰되지 않았다. 또한 분자량을 측정하기 위한 EI-mass spectrum에서는 336.1에서 molecular ion으로 예상되

**Table 1. Physico-chemical properties of PC-4**

Characteristic	Properties
Appearance	Yellow powder
EI-MS (m/z)	336.1 ([M] <sup>+</sup> )
UV λ <sub>max</sub> <sup>MeOH</sup> (nm)	222, 265, 349, 429
λ <sub>max</sub> <sup>1M HCl</sup> (nm)	222, 265, 349, 429
λ <sub>max</sub> <sup>1M NaOH</sup> (nm)	208, 222, 265, 349, 429
R <sub>f</sub> on TLC	0.7 <sup>1)</sup> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O= 6/3/1, lower phase) 0.51 <sup>1)</sup> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH= 5/1) 0.32 <sup>2)</sup> (80% CH <sub>3</sub> CN+0.05% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
Soluble	MeOH, DMSO, H <sub>2</sub> O
Insoluble	CHCl <sub>3</sub> , Hexane

<sup>1)</sup>Silica gel(Merck 5715), 0.25 mm thickness.

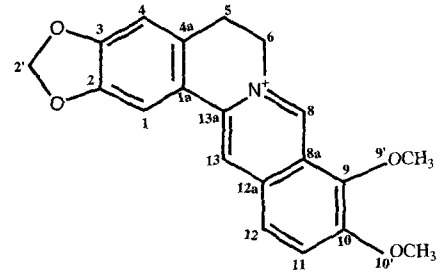
<sup>2)</sup>RP-18(Merck 5685), 0.25 mm thickness.

**Table 2. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR assignment of PC-4**

Carbon No.	<sup>1</sup> H-NMR Chemical shifts (ppm)	<sup>13</sup> C-NMR Chemical shifts (ppm)
1	7.79 (1H, s)	105.42
1a		130.70
2		150.40
2a-O-CH <sub>2</sub> -O	6.17 (2H, s)	102.09
3		149.83
4	7.09 (1H, s)	108.43
4a		121.41
5	3.20 (2H, t, J=6.3 Hz)	26.33
6	4.93 (2H, t, J=3.6 Hz)	55.18
8	9.88 (1H, s)	147.69
8a		143.66
9		149.83
9a-OCH <sub>3</sub>	4.07 (3H, s)	61.92
10		150.40
10a-OCH <sub>3</sub>	4.09 (3H, s)	57.04
11	8.20 (1H, d, J=9.3 Hz)	126.77
12	8.00 (1H, d, J=9.3 Hz)	123.51
12a		132.97
13	8.93 (1H, s)	120.44
13a		137.51

는 peak를 확인할 수 있었다.

PC-4의 화학구조를 동정하기 위하여 여러 가지 NMR spectroscopy 기술을 이용하였다. PC-4를 DMSO에 녹여 <sup>1</sup>H-NMR spectrum(300 MHz)을 측정 한 결과 6개의 aromatic methine(7~10 ppm), 2개의 aromatic methylene(3.2, 4.9 ppm), 2개의 aromatic methoxyl groups(4.1 ppm)을 확인하였다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum(50 MHz)을 측정 한 결과 2개의 methylene carbon(26, 55 ppm), 2개의 methoxy carbon(57, 62 ppm), aromatic ring에서 유래된 methine 및 4급 탄소 signal(100~150 ppm)이 확인되었다. PC-4의 NMR spectrum의 signal을 정리한 결과는 Table 2와 같았으며 이 결과는 이미 보고된<sup>(19,20)</sup> berberine의 NMR data와 일치하여 분리된 PC-4를 berberine으로 동정하였다(Fig. 4).



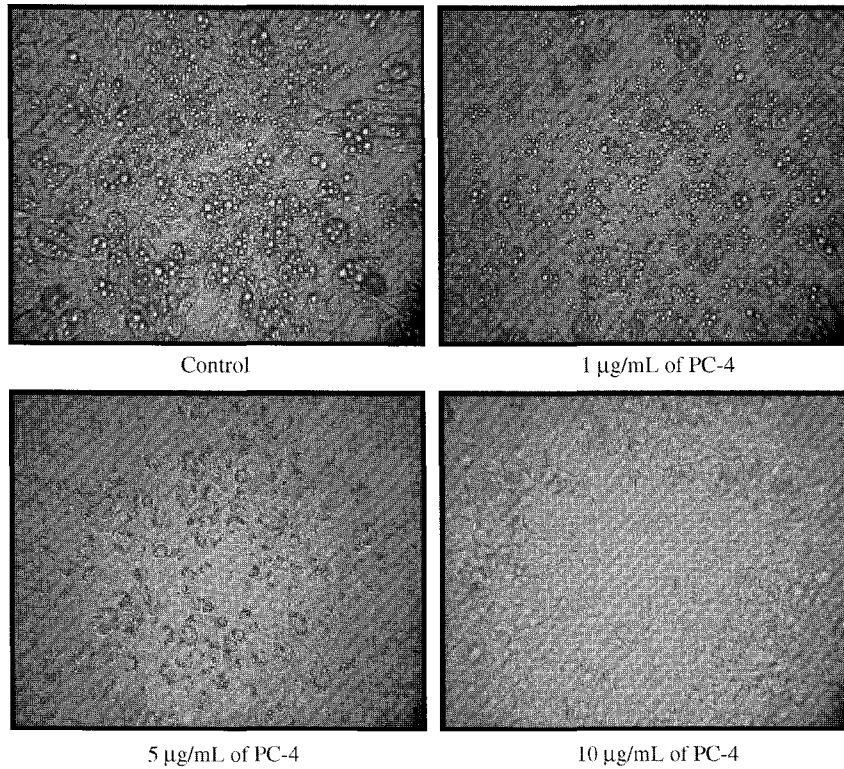
**Fig. 4. Chemical structure of PC-4.**

**PC-4의 지방세포 분화에 대한 저해활성**

황백으로부터 최종적으로 분리한 활성물질 PC-4의 미분화 상태 전구 지방세포인 NIH-3T3 L1 세포의 지방세포로의 분화에 대한 영향을 조사한 결과, PC-4 처리농도 1 µg/mL에서 까지 지방세포 분화 저해활성을 나타내었다(Fig. 5). Lipid droplet 형성정도를 측정하기 위하여, Oil red O로 염색하여 isopropanol로 용출시켜 흡광도를 측정한 결과, PC-4는 대조군에 비해 10 µg/mL에서는 85% 저해하였고 1 µg/mL에서는 26% 정도의 저해활성을 보여(Table 3) PC-4가 지방세포의 분화의 지표로 사용되는 lipid droplet의 형성을 저해하는 것을 통해 지방세포의 분화를 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

**FAS에 대한 PC-4의 영향:** 황백으로부터 분리한 PC-4의 비만관련 지방대사에 중요한 효소로 작용하는 FAS에 대한 저해활성을 측정하였다. 저해활성을 측정하는 과정에서 저해활성을 보이는 활성분획층이 주로 노란색을 띠는 것으로 보아 분광학적으로 측정되는 FAS저해활성이 황백 활성분획 자체의 색으로 인해 340 nm에서 흡광도를 나타낼 수도 있으므로 정확한 FAS 저해활성을 측정하기 위하여 방사선 동위원소를 이용한 FAS assay를 병행하여 실시하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 황백 활성분획을 분광학적으로 FAS 저해활성을 측정 한 결과 10 µg/mL에서도 약간의 저해활성을 보이고 이러한 저해활성은 농도의존적으로 나타남을 관찰할 수 있었다. 반면 방사선 동위원소를 이용한 FAS 저해활성을 측정 한 결과, 선택적인 지방산 생합성효소 저해제로 알려진 cerulenin이 확실하게 저해활성을 나타낸 반면, 황백 활성분획은 분광학적 방법에서의 저해활성과 달리 농도에 관계없이 대조시료와 비슷한 값으로 나타나 FAS에 대한 저해활성은 없는 것으로 확인되었다. 따라서 황백에서 분리한 활성분획 PC-4는 지방산 대사과정 중 지방산 생합성에 관여하는 지방산 생합성효소에 대한 저해활성은 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

**Pancreatic lipase 활성에 대한 PC-4의 영향:** 황백으로부터 분리한 활성물질인 PC-4가 지방대사에서 작용하는 다른 효소에서도 활성을 보이는지 확인하기 위해 지방대사의 다른 과정 즉, 소장의 lumen에서 흡수된 중성지방을 지방산과 monoacylglycerol로 분해하는데 관여하는 pancreatic lipase에 대한 영향을 알아보았다. 5% gum arabic용액과 TBN(tributyrin)을 섞어 유화시켜 agar 배지에 넣고 배지에 구멍을 뚫은 후 시료를 처리하여 lipase의 활성으로 생성되는 투명한 생성여부를 관찰하였다. Table 5에서 보는바와 같이 증류수만 처리한 것과 lipase 억제제인 orlistat를 처리한 것은 투명환(clear zone)이 생성되지 않은 반면 lipase만 처리한 것과



**Fig. 5. Effect of PC-4 on adipocyte differentiation.**

NIH-3T3 L1 preadipocytes were cultured as described in Fig. 1. Differentiated cells cultured under various concentrations of PC-4 [no addition (control), 1 µg/mL, 5 µg/ml and 10 µg/mL]. Cells were then harvested, and accumulation of lipid droplet were observed by an inverted microscope.

**Table 3. Effect of PC-4 on adipocyte differentiation analyzed by Oil red O staining and extraction method**

Treatment	Absorbance (510 nm) <sup>1)</sup>	Percent (%) <sup>2)</sup>
Control <sup>3)</sup>	2.47	100.00
PC-4 (1 µg/mL)	1.815	73.48
PC-4 (5 µg/mL)	0.665	26.92
PC-4 (10 µg/mL)	0.037	14.98

<sup>1)</sup>NIH-3T3 L1 was stained with Oil red O for 3 hr and the dye was extracted with isopropanol and its absorbance was determined at 510 nm.

<sup>2)</sup>Percent (%): absorbance ratio to control.

<sup>3)</sup>Control: no addition of PC-4.

시료를 처리한 경우에는 투명환을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과를 통해, PC-4는 pancreatic lipase에 대한 저해활성은 없는 것으로 관찰되었다.

## 고 찰

황백나무(*Phellodendron amurense*)의 주피를 벗겨낸 줄기껍질에 함유된 것으로 밝혀진 성분으로는 berberine 외에도 palmatine, jateorrhizine, magnoflorine, norcoralydine, menispermine, guanidine, condicine, obacunone, limonin 등이 있다<sup>21)</sup>. Isoquinoline alkaloid의 protoberberine class의 하나인 berberine 성분은 황백내 0.6~2.5% 함유되어 있으며, 항암활성, 항전이활성, 항균활성, 단백질 생합성 저해활성, 항

**Table 4. Inhibitory activity of PC-4 against FAS**

Samples	Absorbance <sup>1)</sup> (340 nm)	<sup>3</sup> H DPM <sup>2)</sup> (mean ± S.D)
(-)Control <sup>3)</sup> (no enzyme)	0	34 ± 22
(+)Control <sup>3)</sup> (enzyme only)	0.421	1356 ± 100
Cerulenin <sup>4)</sup> (15 µg/mL)	0.628	220 ± 2
PC-4 (100 µg/mL)	2.097	2170 ± 1207
PC-4 (50 µg/mL)	2.047	1514 ± 148
PC-4 (10 µg/mL)	1.252	1321 ± 52
PC-4 (5 µg/mL)	0.818	1311 ± 19

<sup>1)</sup>FAS activity was measured by spectrophotometrically monitoring oxidation of NADPH at 340 nm as described in Materials and Methods.

<sup>2)</sup>FAS activity was measured by radioactivity of malonyl-CoA([malonyl-2-<sup>14</sup>C]-CoA) as described in Materials and Methods.

<sup>3)</sup>Controls consisted of methanol vehicle without PC-4.

<sup>4)</sup>Cerulenin (an inhibitor of fatty acid synthesis) was used as a positive control of FAS inhibitory activity.

염증작용, 살균작용, 위액의 분비, 식욕항진작용, 설사에 효과가 있는 것으로 알려졌다<sup>22-27)</sup>. Berberine sulfate는 25 mg/kg으로 mice에 복강투여하거나 45 mg/kg으로 개에게 투여했을 때 독성이 없는 것으로 보고 되었다<sup>28)</sup>.

황백(*Phellodendri Cortex*)으로부터 분리한 PC-4는 지방의 대사에 관여하는 중요한 효소인 FAS와 pancreatic lipase에 대한 저해활성은 없었으나, 비만의 중요한 원인인 지방세포 분화에 대한 저해활성은 1 µg/mL의 낮은 농도에서도 관찰되었

**Table 5. Inhibitory activity of PC-4 against pancreatic lipase**

Samples	Clear zone size (mm) <sup>2)</sup>
Control <sup>1)</sup> (no enzyme)	0
Control <sup>1)</sup> (enzyme only)	2
Orlistat <sup>3)</sup>	0
PC-4 (10 mg/mL)	2

<sup>1)</sup>Controls consisted of distilled water vehicle without PC-4.

<sup>2)</sup>Hole size: 6 mm.

<sup>3)</sup>Orlistat (an inhibitor of pancreatic lipase) was used as a positive control.

으며 항균활성도 확인할 수 있었다(결과 생략). 최근 지방조직을 구성하는 지방세포의 분화와 조절기전에 대한 분자생물학적 연구가 활발하게 진행되어<sup>3)</sup> CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$ (C/EBP $\alpha$ ), peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )/retinoid X receptor- $\alpha$ (RXR $\alpha$ ), adipocyte determination and differentiation factor-1(ADD1)의 전사인자(transcription factor)가 지방세포 분화에 중추적 역할을 한다는 사실이 알려져 있다. 또한 분화 과정 중 서로 다른 시기에 각기 발현되어 지방세포 특이 유전자(leptin, leptin receptor, pro-opiomelanocortin, pro-hormone convertase-1, melanocortin-4 receptor genes 등)의 발현과 지방대사의 활성화를 통해 지방세포분화를 유도한다고 보고되어있다<sup>4,29,30)</sup>.

본 연구에서 분리한 PC-4는 지방대사에 관여하는 효소에 대한 저해활성은 보이지 않고 지방세포 분화 저해활성은 보여 PC-4가 지방조직 분화에 관련된 전사인자나 지방세포 특이적 유전인자, 아니면 지방조직의 내분비 역할과 연관된 호르몬 등에 작용하여 지방세포 분화 저해활성을 나타내는 것으로 추정된다.

## 요 약

비만 저해 물질을 탐색하고자 전통의학에서 사용되는 200여 종류의 식용 또는 약용식물을 대상으로 지방세포 분화 저해활성을 보이는 생약식물을 선별하여 용매층으로 활성이 이행되는 생약 중 황백(Phellodendri Cortex)을 최종적으로 후보 식물로 선정하였다. 황백을 메탄올로 추출한 후, silica gel column chromatography, ODS RP-18 column chromatography, HPLC 등을 수행하여 지방세포 분화 저해활성을 갖는 화합물 PC-4를 분리하였다. PC-4는 노란색의 분말형태로 메탄올을 용매로 UV 최대흡수치를 조사한 결과, 222, 265, 349, 429 nm에서 최대의 UV의 흡수치를 보였으며 산이나 알칼리 조건에서 최대 흡수치의 변화가 관찰되지 않았다. EI-mass spectrum을 측정한 결과, 분자량이 336.1로 예상되었으며 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC NMR spectrum을 통해, PC-4는 isoquinoline alkaloid 계열의 berberine으로 동정되었다. PC-4는 지방의 대사에 관여하는 중요한 효소인 fatty acid synthase와 pancreatic lipase에 대한 저해활성은 나타나지 않았으나, 지방세포 분화 저해활성은 1  $\mu$ g/mL의 낮은 농도에서도 관찰되었다.

## 감사의 글

본 연구는 기초기술이사회가 지원하는 한국생명공학연구원 정책연구과제로 수행되었으며 연구비 지원에 감사를 표합니다.

## 문 헌

1. Michio, S., Moritake, H., Zhou, Y.T., Wang, M.Y., Christopher, B.N. and Roger, H.U. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. *J. Biol. Chem.* 273: 32487-32490 (1998)
2. Bradford, B.L. and Bruce, M.S. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404: 652-660 (2000)
3. Kim, J.B. New horizon in atherosclerosis research: Insights into fat cell differentiation and insulin sensitivity with ADD1/SREBP1 and PPAR $\gamma$ . *Korean J. Lipidol.* 11: 79-83 (2001)
4. Kim, Y.S. Transcriptional factors involved in insulin resistance. *Korean J. Lipidol.* 9: 28-35 (1999)
5. Holst, D. and Grimaldi, P.A. New factors in the regulation of adipose differentiation and metabolism. *Lipidology* 13: 241-245 (2002)
6. Michell, A.L. Becoming fat. *Genes Develop.* 16: 1-5 (2002)
7. Rosen, E.D., Hsu, C.H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J. and Spiegelman, B.M. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : a unified pathway. *Genes Develop.* 16: 22-26 (2002)
8. Jiang, M.S. and Lane, M.D. Sequential repression and activation of the CCAAT enhancer-binding protein- $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) gene during adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12519-12523 (2000)
9. Tang, Q.Q. and Lane, M.D. Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein- $\beta$  during adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12446-12450 (2000)
10. Chen, D. and Garg A. Monogenic disorders of obesity and body fat distribution. *J. Lipid Res.* 40: 1735-1746 (1999)
11. Loftus, T.M. and Lane, M.D. Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Genetics Develop.* 7: 603-606 (1997)
12. Spiegelman, B.A. and Flier, J.S. Adipogenesis and obesity: Rounding out the big picture. *Cell* 87: 377-389 (1996)
13. Xueming, G. and Kan, L. Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* 251: 45-53 (2000)
14. Andrea, B., Laura, G. and Alexander, S. Rapamycin inhibits human adipocyte differentiation in primary culture. *Obesity Res.* 8: 249-254 (2000)
15. René, K., Gert, S. and Hesselink, M.K.C. Optimization of Oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem. Cell. Biol.* 116: 63-68 (2001)
16. Ramirez-Zacarias, J.L., Castro-Muñozledo, F. and Kuri-Harcuch, W. Quantiation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 493-497 (1992)
17. Tracy, C.L. Purification and crystallization of rat liver fatty acid synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* 209: 613-619 (1981)
18. Dils, R. and Carey, E. M. *Methods in Enzymol.* 35: 74-83 (1975)
19. Kim, J.P., Jung, M.Y., Kim, J.P. and Kim, S.Y. Antiphotoxidative activity of protoberberines derived from *Coptis japonica* Makino in the chlorophyll-sensitized photooxidation of oil. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1058-1063 (2000)
20. Pan, J.F., Yu, C., Zhu, D.Y., Zhang, H., Zeng, J.F., Jiang, S.H. and Ren, J.Y. Identification of three sulfate-conjugated metabolites of berberine chloride in healthy volunteers' urine after oral administration. *Acta Pharmacol. Sin.* 23: 77-82 (2002)

21. Huang, K.C. The Pharmacology of Chinese Herbs, p. 289. CRC press, Tokyo, Japan (1993)
22. Szeto, S., Yow, C.M.N. and Fung, K.W. Characterization of berberine on human cancer cells in culture. Turk. J. Med. Sci. 32: 363-368 (2002)
23. Jeon, Y.W., Jung, J.W., Kang, M.R., Chung, I.K. and Lee, W.T. NMR studies on antitumor drug candidates, berberine and berberubine. Bull. Korean Chem. Soc. 23: 391-394 (2002)
24. Mitani, N., Murakami, K., Yamaura, T., Ikeda, T. and Saiki, I. Inhibitory effect of berberine on the mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic implantation of Lewis lung carcinoma. Cancer Lett. 165: 35-42 (2001)
25. Iwasa, K., Moriyasu, M., Yamori, T., Turuo, T., Lee, D.U. and Wolfgang, W. *In vitro* cytotoxicity of the protoberberine-type alkaloids. J. Nat. Prod. 64: 896-898 (2001)
26. Park, K.S., Kang, K.C., Kim, J.H., Adams, D.J., Johng, T.N. and Paik, Y.K. Differentiation inhibitory effects of protoberberines on sterol chitin biosyntheses in *Candida albicans*. British J. Antimicrob. Chemother. 43: 667-674 (1999)
27. Uchiyama, T., Kamikawa, H. and Ogita, Z. Anti-ulcer effect of extract from *Phellodendri cortex*. Yakugaku Zasshi 109: 672-676 (1989)
28. Sabir, M. and Bhide, N.K. Study of some pharmacological actions of berberine. Indian J. Physiol. Pharmacol. 15: 111-132 (1971)
29. Evan, D.R., Christopher, J.W., Pere, P. and Bruce, M.S. Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes Develop. 14: 1293-1307 (2000)
30. Robert, M.C., Robert, E.L. and Robert, E.M. Jr. Molecular regulation of adipocyte differentiation. Cell Develop. Biol. 10: 3-10 (1999)

---

(2003년 4월 4일 접수; 2003년 5월 14일 채택)