

鹿茸이 脂肪細胞(3T3-L1)와 成長因子에 미치는 影響

全燦日, 金岐勳, 李進容, 金德坤

慶熙大學校 韓醫科大學 小兒科學教室

Effect of velvet antler on the function of adipocytes(3T3-L1) and its association with IGF-1

Jun Chan Il, Kim Ki Hoon, Lee Jin Yong, Kim Deog Gon

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objectives: These experimental studies were designed to investigate the effects of antler's extracts on the expression of leptin, IGF-1 and IGF-1 receptor on cultured 3T3-L1 cells.

Methods: A mouse adipoblast cell line, 3T3-L1, was cultured with or without a differentiation medium containing Isobutylmethylxanthin, Dexametasone and Insulin before adding extracts of antler of various concentration(10, 50, 100, 200 μ g/ml). The expression of leptin and IGF-1 receptor was measured by western blot assay, and expression of IGF-1 was determined by FACS analysis.

Results and Conclusion: The 3T3-L1 cells' differentiation did not show a significant induction by extracts of antler. The expression of leptin was significantly decreased depend on antler's concentration. The expression of IGF-1 showed a slightly increase by extracts of antler, whereas that of IGF-receptor showed a tendency to increase. The total amount of intracellular triglyceride showed a tendency to diminish as the concentration of antler's extract increase.

Key word : velvet antler, leptin, IGF-1, IGF-1 receptor, 3T3-L1 cells

I. 緒 論

최근 우리 사회는 생활 환경 및 식생활이 서구화되고 편리해지고 있으나 반대로 운동이나 활동양은 부족해지면서 체격은 점차 커짐에도 불구하고 반대로 체력적인 허약이나 또는 비만이 늘어나고 있는 실정이다.¹⁾ 소아의 성장부진과 허약증에 녹용을 다용하는데, 녹용은 補血, 壯精, 元陽의 기능이 있어 本草綱目²⁾에 「生精補髓 養血益陽 強健筋骨 治一切虛損」이라고 효능이 기재되어 있다.

녹용에 관한 최근 연구들로 배⁵⁻⁷⁾와 허⁸⁾ 등은 동물의 성장 촉진에 녹용이 유의한 영향을 미친다고 하였다. 김⁹⁾은 녹용 약침 투여군이 성장호르몬 투여군에 비하여 총 신장량이 유의성 있게 증가한다고 보고하였고 김²⁷⁾은 녹용추출액이 조골세포의 증식을 촉진시킨다고 하였다. Suttie JM이나 Francis SM¹⁰⁻¹⁵⁾ 등은 녹용에는 각 종 성장인자와 성호르몬, 성장호르몬 등이 존재하며 특히 IGF-1의 생성과 밀접한 관계를 가지고 있다고 보고하고 있다.

성장호르몬은 주로 간에서 존재하는 성장호르몬수용체와 결합하여 IGF-1의 생성을 촉진하여 혈중 IGF-1 농도를 상승시키고 이 IGF-1이 장골의 성장판 연골세포의 분화 및 증식을 일으켜 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다.²⁰⁾

오²¹⁾ 등은 성장호르몬 결핍증 환아를 대상으로 혈중 leptin과 혈중 IGF-1 농도를 관찰한 결과 혈중 leptin은 유의하게 낮아졌으며 혈중 IGF-1은 유의하게 높아졌고 체질량지수는 유의하게 감소하여 체지방량의 변화가 혈중 leptin 농도와 유의한 상관관계를 갖는다고 보고하고 있으며 Chen²²⁾ 등은 배양된 돼지 지방세포에서 성장호르몬은 leptin mRNA

expression을 역시 감소시킨다고 하였다.

이에 저자는 녹용의 성장촉진 작용은 성장호르몬 분비를 직간접적으로 자극하게 되고 이차적으로 성장호르몬 분비의 촉진은 지방세포에 작용하여 leptin의 분비에 영향을 주고 나아가 IGF-1의 생성을 늘려 비만과 성장에 관여할 것이라고 유추하여 녹용추출물을 가지고 in vitro에서 실험 연구하였으며 성장촉진과 아울러 비만을 억제하는 효능에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗 및 方法

1. 檢액의 製法

예손통상주에서 2000년 12월 수입된 러시아산 원녹용(Cornu Cervi Parvum)의 분골부위 2 kg을 실험에 사용하였다. 녹용 추출물은 식품의약품안전청 고시 '의약품 등의 안전성, 유효성 심사에 관한 규정 (제 1999-60호)'의 표준탕액의 조제법에 의거, 녹용 분량의 10배량의 정제수를 넣고 80-100°C에서 2-3시간 동안 추출하여 추출액이 1/2이 되었을 때, 여과포로 여과한 다음 rotary evaporator에 넣어 감압 농축하여 동결건조시켜 사용할 때까지 냉장 보관하였다. 수득률은 18.5%으로 370g이었다.

2. 세포배양

3T3-L1 세포주는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 사용하였으며, 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin

을 함유한 DMEM 배지에서 5% CO₂를 함유하며 37°C를 유지하는 incubator에서 배양하였다.

3. 분화유도

2 × 10⁴ cells/ml 의 3T3-L1 세포를 2일 동안 배양하여 plate 바닥에 꼭 찬 후 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (MIX), 0.25 μM dexamethasone, 10 μg/ml insulin 이 함유된 DMEM배지에 10-200 μg/ml의 시료 (DMSO 0.01%미만 함유)를 첨가하여 8일 동안 배양하였다.

4. 세포 독성 시험 (MTT assay)

세포를 2×10⁵ cells/ml 농도로 조절한 후 0.1 ml를 96 well plate에 이식하고 4시간 후 배지에 희석시킨 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 각 시료는 DMSO에 용해시켜 사용하였으며 최종 DMSO의 농도가 0.1%를 넘지 않도록 하였다. 5 mg/ml 농도로 PBS에 용해시킨 MTT용액 50 μl를 첨가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후 상등액을 제거하고 DMSO 100 μl에 녹인 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 세포 성장 저해 실험 (Trypan blue assay)

• 세포 성장 저해는 trypan blue exclusion 실험법에 따랐다.

6. Western blotting

시료를 처리한 세포들을 모아 원심분리

(2,000 rpm, 4 min)후 상등액을 제거하고 PBS로 washing한 후 protease inhibitor cocktail을 함유한 ELB buffer (50mM HEPES pH 7.0, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM dithiothreitol, 5 mM NaF, 0.5 mM Na orthovanadate)에 현탁시켜 세포를 용해시킨 후 700g에서 5분간 원심분리하여 세포의 불순물을 제거하였다. 상등액을 Bradford 방법으로 정량하고 sample buffer 처리하여 SDS-PAGE를 이용하여 세포 내 단백질을 분리하였다. 분리한 gel을 semi dry system으로 100 mA에서 1시간 동안 nitrocellulose membrane에 transfer시킨 후 5% skim milk 용액에 하룻밤 blocking한 다음 4시간 동안 다양한 primary antibody를 반응시키고 washing후 HRP(horseradish peroxidase)-conjugate된 secondary antibody를 1시간 동안 반응시킨 후 암실에서 ECL방법으로 X-ray film에 detection 하였다

7. FACS를 이용한 IGF-1 확인

시료를 처리하여 배양한 세포를 PBS로 washing하고 100% ethanol로 세포를 고정시킨 후 다시 PBS로 washing한다. NP40 0.05%, BSA 0.5% 함유된 PBS로 10분 동안 permeabilized하여 washing한 후 IGF-1 antibody로 4°C에서 1시간 incubation 한다. 다시 PBS로 washing후 FITC-conjugated된 secondary antibody를 첨가한 후 4°C에서 30분 동안 incubation하고 이를 다시 PBS로 3회 washing하여 flowcytometry로 확인하였다.

8. Triglyceride assay

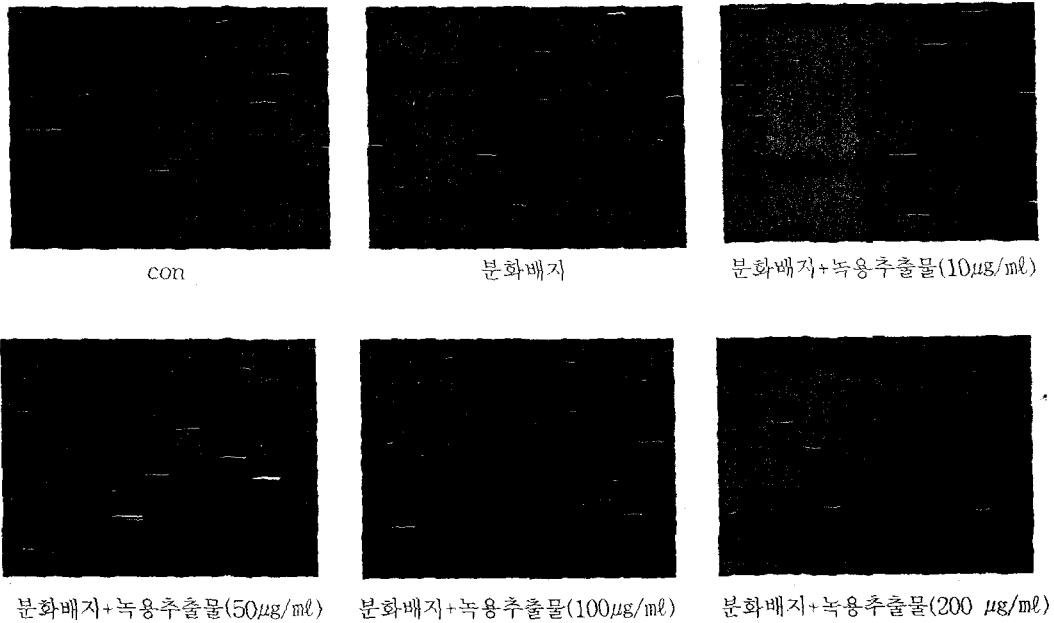
시료를 처리하여 배양한 세포를 PBS로 washing하여 Teflon policeman으로 떼어낸 후 extraction buffer(50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, and 1 mM mercaptoethanol)로 현탁시켜 homogenization하였다. 이중 chloroform-methanol (2:1, v/v) 로 Triglyceride (TG) 추출하여 Triglyceride Test Kit를 사용하여 정량하였다. 방치 후 다시 0.4NaOH 용액 10 ml와 잘 혼합하여, 실온에서 10분간 방치 후 60분 이내에 505 nm (490-530nm)에서 증류수를 대조로 흡광도를 측정하였다.

Ⅲ. 實驗 結果

1. 3T3-L1의 분화 및 분화확인

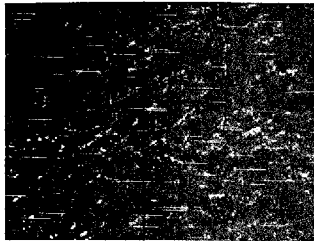
3T3-L1 세포를 분주한지 2-3일 후 바닥이 짝 찬 상태에서 분화배지 (0.5 mM Isobutylmethylxanthin, 1 uM Dexametasone, 1 µg/ml Insulin첨가)를 8일간 처리하여 분화를 현미경으로 확인 하였으며 동시에 녹용추출물 (10, 50, 100, 200 µg/ml)을 동시에 첨가하여 처리한 경우에서도 분화 유도를 확인함으로써 녹용 추출물의 분화 유도에 미치는 영향을 관찰 하였으나 분화 유도에는 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

1) Microscopy로 확인한 morphology변화

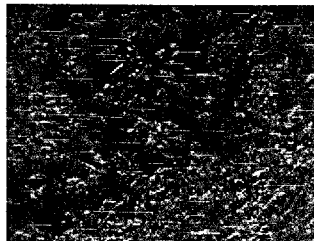


2) Oil Red-O 염색으로 확인한 morphology 변화

분화된 세포의 정도를 oil-Red로 확인한 경우 대조군에 비해 분화 배지를 사용한 경우 뚜렷한 분화를 확인하였다. 본 실험에서도 녹용 추출물을 투여한 경우 분화되는 정도에는 영향을 미치지 않았다.



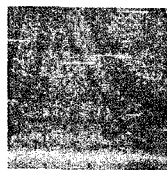
Con.



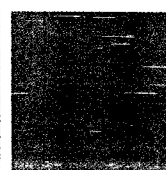
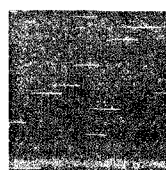
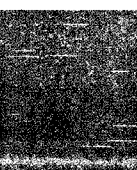
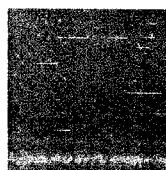
분화배지



Con.



분화배지



분화배지+녹용추출물(10 µg/ml)



분화배지 + 녹용추출물(50µg/ml) + (100 µg/ml) + (200 µg/ml)

2. 세포독성(MTT assay)

녹용 추출물이 3T3-L1 세포의 세포독성에 미치는 영향을 조사한 결과 IC50 는 녹용추출물 처리 최고 농도인 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 아무런 영향을 보이지 않음으로써 녹용 처리 농도는 적합한 것으로 생각되었다.

3. Western blot assay

3T3-L1 세포를 분주한지 2-3일 후 바닥이 딱 찬 상태에서 Growth factors (0.5 mM Isobutylmethylxanthin, 1 uM Dexametasone, 1 $\mu\text{g/ml}$ Insulin)를 8일간 처리하였고 동시에 녹용추출물 (10 $\mu\text{g/ml}$ -200 $\mu\text{g/ml}$)을 첨가하여 비교하였다. Growth factors가 첨가된

배지로 8일간 배양한 결과 leptin 단백질은 뚜렷한 증가(density ratio 22.01)를 보인 반면 대조군(density ratio 10.43)에서는 leptin의 발현은 미약하였다. 반면에 Growth factors와 녹용 추출물을 동시에 투여하여 8일간 배양한 경우에 농도 의존적인 leptin의 발현 감소를 확인 하였다. 녹용 추출물의 농도 10, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 density ratio가 각각 21.53, 17.88, 10.85 및 9.8을 보임으로서 녹용 추출물 처리에 따른 농도 의존적인 leptin 단백질의 감소를 확인하였다. 즉 Growth factors 투여 후 세포 분화가 유도되어 비만세포로 전환됨으로서 상대적인 leptin의 발현 증가를 확인하였으나, 녹용 추출물의 투여시 농도 의존적으로 뚜렷한 감소를 보였다(Fig. 1).

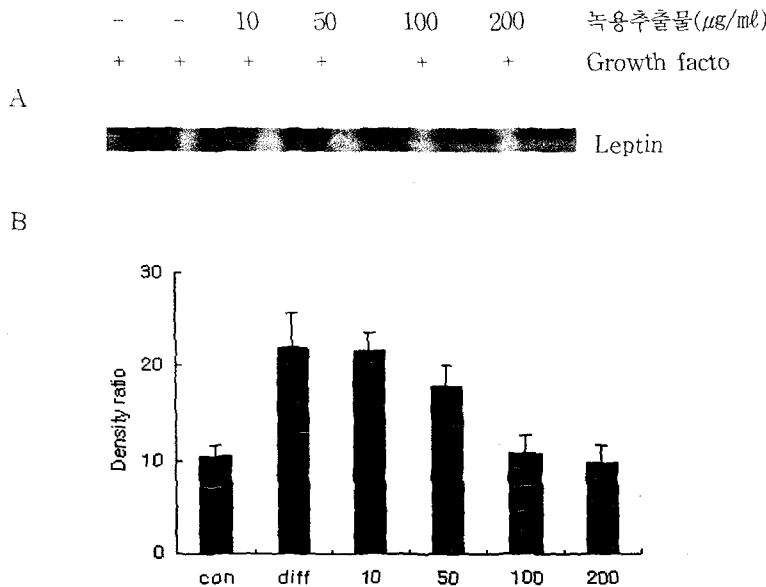


Fig. 1. Effect of Antler's Extracts on Protein Levels of Leptin in 3T3-L1 Preadipocytes (A) Western Blot Analysis with an Antibody against Leptin (B) The Intensity of the Bands Was Quantified Using Image Quanta. The Experiments Were Repeated Three Times with Similar Results. Reported Values are mean±S.D.

4. IGF-1 발현검사

분화와 동시에 여러 농도의 녹용 추출물을 투여한 경우 미분화 세포에 비해 성장배지의 처리 후 분화세포에서는 IGF-1의 생성이 증가함을 보였으며, 녹용 추출물과의 동시처리에서는 성장배지 단독 처리군에 비해 유의성 있는 IGF-1 생성은 보이지 않으나 미약한 농도 의존적인 증가가 관찰되었다(Fig. 2).

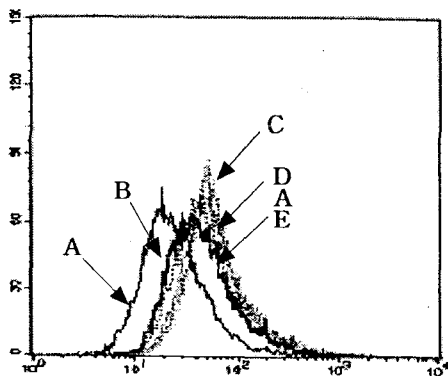


Fig. 2. FACS Analysis of Expression of Fas in 3T3-L1 Cells by Antler's Extracts.

A : Undifferentiated Cell, B: Differentiated Cell, C: Antler's Extract 100 µg/ml, D: Antler's Extract 200 µg/ml, E: Antler's Extract 400 µg/ml. The Experiments Were Repeated Three Times with Similar Results. Reported Values are mean ± S.D.

5. IGF-1 Receptor 발현검사

분화와 동시에 여러 농도의 녹용 추출물을 투여한 경우 미분화 세포에 비해 성장배지의 처리 후 분화세포에서는 IGF-1 receptor의

생성이 증가함을 보였다. 녹용 추출물과의 동시처리에서는 녹용 추출물의 농도 10 µg/ml에서는 density ratio가 38.53, 50 µg/ml에서는 density ratio가 38.90, 100 µg/ml에서는 density ratio가 36.36, 200 µg/ml에서는 density ratio가 29.26으로 나타나 성장배지 단독 처리군에 비해 IGF-1 receptor의 생성이 증가하는 경향을 보였으나 고농도에서 다시 약간 감소하였다(Fig. 3). 녹용 추출물이 IGF-1 receptor의 발현 증가를 유도한다면 IGF-1이 receptor와의 결합을 증가시킴으로써 성장발육을 촉진하는 기전에 관여할 수 있을 것으로 생각된다.

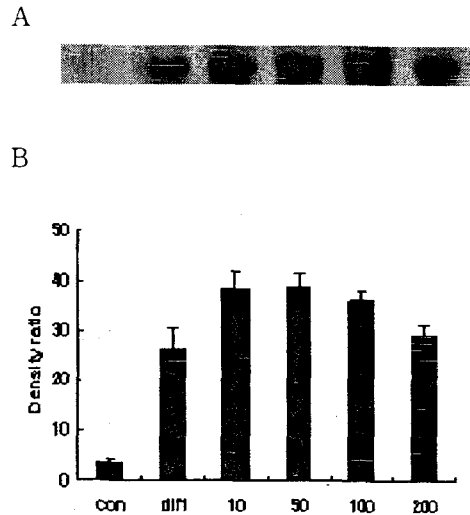


Fig. 3. Effect of Antler's Extracts on Protein Levels of IGF-1 Receptor in 3T3-L1 Preadipocytes. (A) Western Blot Analysis with an Antibody against IGF-1 Receptor (B) The Intensity of the Bands was Quantified Using Image Quanta. The Experiments Were Repeated Three Times with Similar Results. Reported Values are mean ± S.D.

6. Triglyceride assay

Growth factors가 첨가된 배지로 8일간 배양한 결과 세포 내 총 triglyceride 함량은 대조군(0.90 mg/mg protein)에 비해 뚜렷한 증가(2.66 mg/mg protein)를 보였다. 반면에 성장 배지와 녹용 추출물을 동시에 투여하여 8일간 배양한 경우 농도 의존적인 triglyceride 감소를 확인 하였다. 녹용 추출물의 농도 50 μ g/ml에서는 2.92 μ g/ml protein, 200 μ g/ml에서는 2.44 mg/mg protein, 400 μ g/ml에서는 2.28 mg/mg protein으로 농도 의존적으로 세포 내 총 triglyceride 함량의 감소를 보였다(Fig. 4).

하고 있고²⁴⁾, 그 체중 증가 추세는 매년 0.2kg/y를 보이고 있다²⁵⁾고 한다. 또한 우리나라 서울 시내 초, 중, 고교학생들을 대상으로 비만의 빈도를 조사한 연구에서 1984년 남아의 비만증 빈도가 9%에서 1992년에는 17.2%로 증가하였고, 여아에서는 7%에서 14.3%로 8년 만에 2배 이상 증가되었다²⁶⁾고 한다.

최근 우리 사회는 생활 환경 및 식생활이 서구화되고 편리해지고 있으나 반대로 운동이나 활동양은 부족해지면서 체격은 점차 커짐에도 불구하고 반대로 체력적인 허약이나 또는 비만이 늘어나고 있는 실정이다¹⁾.

임상상 소아 허약증이나 성장촉진의 목적으로 많이 응용되고 있는 녹용의 경우 비만에

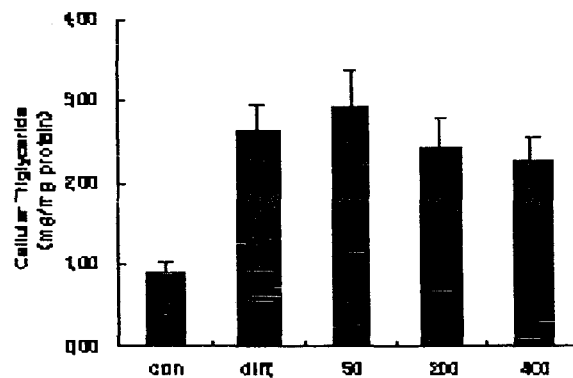


Fig. 4. Effect of Antler's Extracts on Triglyceride Content in Cultures of 3T3-L1 Preadipocytes. Reported Values are mean \pm S.D.

IV. 考 察

1990년대 중반부터 5차례의 National Health and Nutrition Examination Surveys을 포함한 많은 연구에서 소아에서 비만 증가를 보고

대한 우려를 나타내고 있으나 본 실험에서 실제 녹용이 비만을 유발하는지, 성장촉진에 어떤 기전으로 작용하는지를 연구하게 되었다.

녹용은 척추동물 哺乳綱 偶蹄目 鹿科에 속한 梅花鹿 혹은 馬鹿 등 각종 雄鹿의 미골화된 幼角³⁾을 말하며 峻補元陽, 體力增強

強筋骨하는 작용이 있다⁴⁾. 녹용에 관한 최근 연구들로 배⁵⁻⁷⁾와 허⁸⁾ 등은 동물의 성장 촉진에 녹용이 유의한 영향을 미친다고 하였다. 김⁹⁾은 녹용 약침 투여군이 성장호르몬 투여군에 비하여 총 신장량이 유의성 있게 증가한다고 보고하였고 김²⁷⁾은 녹용추출액이 조골세포의 증식을 촉진시킨다고 하였다. Suttie JM이나 Francis SM¹⁰⁻¹⁵⁾ 등은 녹용에는 각종 성장인자와 성호르몬, 성장호르몬 등이 존재하며 특히 IGF-1의 생성과 밀접한 관계를 가지고 있다고 보고하고 있다.

성장호르몬과 비만과의 상관성에 대해서는 성장호르몬의 결핍시 주로 내장지방과 복부지방이 증가하여 비만이 일어나게 되고 성장호르몬의 보충요법시 사지의 단백질양은 증가시키면서 사지보다는 복부, 체지방의 내장지방을 감소시켜 비만이 호전된다는 보고가 있었다^{16,17)}. 또한 비만증을 보이는 동물에서도 성장호르몬 투여시 체지방은 감소하고 간의 지방산대사가 증가된다는 사실이 보고되었다^{18,19)}.

성장호르몬의 표적기관인 지방세포에서는 ob유전자로부터 leptin이 생산되어 분비되는데, 이 단백질은 체지방의 증식을 억제하며 이 leptin은 시상하부의 neuropeptide-Y의 전령 RNA의 전사를 억제하여 식욕을 감소시키고 에너지 소비를 증가시켜 체지방량을 감소시킴이 알려져 있다²⁸⁾. 또한 쥐의 간세포를 이용한 실험에서 leptin이 지방분해 촉진 수용체(lipolysis-stimulating receptor ; LSR)에 작용하여 지방분해를 촉진함이 알려져 있다²⁹⁾. 이처럼 혈중 leptin 농도는 에너지 평형 뿐 아니라 체지방량과 유의한 상관성을 갖는다.

Leptin은 영양상태에 비례하여 지방세포의 obesity gene에서 생성 분비되어 뇌의 시상하부에 있는 포만중추를 자극하는 식욕조절인자로 발열반응(thermogenesis)과 활동량을 증가

시키고 섭취량을 감소시키며, 시상하부의 arcuate와 ventromedial nuclei 부분에 존재하는 leptin receptor와 결합하여 식욕조절 물질인 neuropeptide-Y 등에 직접 작용하여 체중 및 식욕을 조절함으로써 비만을 억제하고, 체중과 체지방량을 감소시키는 역할을 한다³⁰⁻³⁵⁾.

비만 조절에 있어서 고지방식으로 비만을 유도한 후에 혈중 leptin의 변화에 대한 연구에서 고지방식이 섭취 시 마우스의 혈중 leptin 농도가 유의하게 증가하였으며³⁶⁻³⁸⁾, Masuzaki 등^{36,39-41)}은 2주 동안의 고에너지, 고지방식이 섭취시 지방조직에서 leptin mRNA의 증가를 보고하였고 고지방식에서 혈액중의 leptin의 농도가 증가하다가 절식 시에는 감소하는 연구 결과들이 보고되었다.

성장호르몬 결핍증(growth hormone deficiency, GHD) 환자에서는 비만 정도에 비해서 혈중 leptin 농도가 상대적으로 더 높는데⁴²⁾ GHD 소아나 성인에서 GH 치료를 시행하면 체지방량이 감소하며 leptin의 혈중 농도는 낮아진다^{21,43-45)}고 하였다. Elimam 등⁴⁶⁾은 GHD 환아에서 GH치료는 체질량지수의 변화와 상관없이 혈중 leptin 농도의 저하를 초래하는 것으로 보아 체지방량 변화에 의한 이차적 현상으로 혈중 농도가 감소하는 것이 아니라 GH가 직접적으로 leptin의 생산, 대사에 영향을 주어 혈중 leptin 농도를 저하시킨다고 보고하였다.

Chen 등²²⁾은 배양된 돼지 지방세포에서 성장호르몬은 leptin mRNA expression을 역시 감소시킨다고 하였고, 이²³⁾는 마우스의 지방세포에서의 연구에서 GH는 leptin의 발현과 분비에 큰 영향이 없다고 보고하였다. Hardie 등⁴⁸⁾은 배양된 쥐 부고환 지방세포에서 leptin 분비를 관찰하여 완전 분화된 성숙한 지방세포에서만 48시간 이상 선형으로 증가 곡선을

그리며 leptin 분비가 증가하는 것을 관찰하였고, 인슐린과 dexametasone이 각기 다른 경로를 통해 leptin 분비를 증가시키는 것을 보고하였다. 또한 미분화된 지방세포에서는 ob 유전자의 발현이 일어나지 않으며 GH, IGF-1과 TNF- α 가 leptin의 분비에 영향을 미치지 못한다고 보고하였다.

성장호르몬과 IGF-1에 있어서는 성장호르몬은 주로 간에서 존재하는 성장호르몬 수용체와 결합하여 IGF-1의 생성을 촉진하여 혈중 IGF-1 농도를 상승시키고 IGF-1이 장골의 성장판 연골세포의 분화 및 증식을 일으켜 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾.

성장호르몬과 혈중 IGF-1 농도, 그리고 leptin 농도의 상관성에 대해 같이 진행한 연구들이 보고되었다. 오 등²¹⁾은 GHD 환아를 대상으로 12개월 동안 GH 치료를 시행한 후 GH 치료전과 치료 후 6개월과 12개월에서의 혈중 IGF-1의 농도가 유의하게 상승하였으나 혈중 leptin 농도 저하와는 상관성이 없다고 보고하고 있으며, Rauch 등⁴⁹⁾과 Coutant 등⁵⁰⁾ 또한 혈중 leptin 농도는 혈중 IGF-1 농도 뿐 아니라 IGF BP(Binding Protein) 3 농도와도 상관성이 없다고 보고하고 있다. Isozaki 등⁴⁷⁾은 시상하부를 파괴한 비만한 Zucker쥐에서 지방조직의 leptin mRNA를 측정하였다. 성장호르몬 보충요법에는 부고환 지방조직에서 leptin mRNA가 감소하였고, 전체 피하지방층에서는 변화가 없으며, 인슐린양 성장인자를 투여하였을 때에는 전체 지방의 변화는 없었고, 부고환 지방조직의 leptin mRNA의 발현도 변화가 없는 것을 보고하였다.

In vitro 실험에서 배양된 지방세포에서 성장호르몬은 leptin을 감소시킨다는 Chen 등²²⁾과 Hardie 등⁴⁸⁾의 결과와 영향을 주지 못한다는 Rauch 등⁴⁹⁾과 Coutant 등⁵⁰⁾의 상반된 결

과가 나타났다.

따라서 본 실험은 녹용이 성장호르몬 분비에 직간접적으로 작용하여 성장을 촉진한다면 지방세포를 배양하고 여기에 다시 성장인자만 첨가하여 배양한 대조군과 성장인자와 녹용추출물을 동시에 첨가하여 배양한 실험군을 비교하여 지방세포의 분화, leptin의 발현 그리고 IGF-1, IGF-1 receptor의 발현을 확인함으로써 녹용의 성장과 비만에 대한 효과를 확인할 수 있을 것으로 판단하여 본 실험을 시행하였으며 아래와 같은 유의한 결과를 얻었다.

실험에서는 지방세포(3T3-L1)를 배양하여 분화배지(0.5mM Isobutylmethylxanthin, 1 μ M Dexametasone, 1 μ g/ml Insulin첨가)를 8일간 처리하여 분화를 현미경으로 확인 하였으며 동시에 녹용추출물 (10, 50, 100, 200 μ g/ml)을 동시에 첨가하여 처리한 경우에서도 분화 유도를 확인함으로써 녹용 추출물의 분화 유도에 미치는 영향을 microscopy와 Oil Red-O 염색을 통해 관찰 하였다. 또한 western blot assay를 통해 위의 녹용추출물의 농도 별 leptin의 발현을 확인하였다. 마지막으로 FACS를 이용하여 배양세포와 분화세포, 그리고 녹용추출물을 다양한 농도(10, 50, 100, 200, 400 μ g/ml)로 처리한 후 IGF-1과 IGF-1 receptor의 발현을 검사하였다.

Microscopy와 Oil Red-O 염색을 통해 확인한 결과 녹용추출물은 모든 농도에서 3T3-L1 지방세포의 분화에 유의한 영향을 주지 못했다. 추후 녹용추출물의 농도나 실험조건에 따른 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Western blot assay를 통해 위의 녹용추출물의 농도 별 leptin의 발현을 확인한 결과 3T3-L1 지방세포의 분화 배지에서 증가된

leptin의 발현은 녹용추출물을 동시에 투여하여 배양한 배지에서 녹용추출물의 농도가 증가할수록 유의한 감소를 보였다. 이것은 성장호르몬 투여시 혈중 leptin이 감소하면서 체지방량이 줄어들며 지방조직이 증가하면 혈중의 leptin이 증가하여 음식섭취를 감소시키고 에너지 소모를 증가시키며, 지방조직이 감소하면 혈중의 leptin이 감소하여 음식섭취를 증가시키고 에너지 소모를 감소시킨다^{51,52)} 고 보고한 내용과 동일하며 지방세포의 감소, 즉 비만의 억제 효과를 제시한다고 할 수 있을 것이다.

3T3-L1 지방세포의 분화 배지에서 증가된 IGF-1의 발현은 녹용추출물(100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 농도 별로 투여하여 배양한 배지에서 IGF-1의 생성에 뚜렷한 차이점을 보이지 않으나 미약한 증가는 확인되었으며 녹용추출물(10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 농도 별로 투여하여 배양한 배지에서 IGF-1 receptor의 생성을 확인한 결과, 성장배지 단독 처리군에 비해 IGF-1 receptor의 생성이 증가하는 경향을 보였다. 따라서 본 실험 결과로는 녹용 추출물이 IGF-1의 생성에 직접적으로 관여하는 것에 대해서는 보다 추가적인 연구가 필요하나, IGF-1 receptor의 증가를 유도하여 IGF-1의 작용을 활성화시켜 성장발육을 촉진할 수 있다는 의미 있는 결과를 얻을 수 있었다.

성장 호르몬이 첨가된 배지로 8일간 배양한 결과 triglyceride은 뚜렷한 증가를 보인 반면 대조군에서는 triglyceride의 발현은 미약하였다. 반면에 성장 배지와 녹용 추출물을 동시에 투여하여 8일간 배양한 경우 농도 의존적인 triglyceride 발현 감소를 확인 하였다. triglyceride는 cholesterol과 더불어 유용한 지표이므로 지질대사이상을 검사하는데 우선적으로 선택되는 검사로 비만, 고지혈증, 지방간, 동맥경화 등의 성인병과 큰 관련성을 갖는다

⁵³⁾ 실험 결과 녹용 추출물은 지질대사를 개선하여 비만을 억제한다고 할 수 있을 것이다.

결론적으로 실험에서 녹용은 유의성 있게 leptin을 감소시켰으며, 직접적인 지방세포(3T3-L1)의 분화 억제를 확인할 수 없었고, 성장인자인 IGF-1의 미약한 발현 증가만을 확인하였으나 IGF-1 receptor는 증가하는 경향을 띠어, 녹용이 IGF-1 receptor의 증가를 유도하여 IGF-1의 작용을 활성화시켜 성장발육을 촉진할 수 있다는 의미있는 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 녹용이 성장은 촉진하고 비만을 개선, 억제하는 효과가 있음을 실험을 통해 확인하였으나, 실제로 성장호르몬의 분비를 직간접적으로 촉진하여 비만을 억제하는지, 그렇다면 인슐린양 성장인자(IGF)의 발현을 증가시켜 성장발육을 촉진하는 효과를 나타내는 지에 대해서는 보다 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Ⅶ. 結 論

녹용이 In vitro에서 지방세포(3T3-L1)의 분화 및 leptin, IGF-1과 IGF-1 receptor의 발현에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 녹용추출물은 3T3-L1 지방세포의 분화에 유의한 영향을 주지 못했다.
2. 3T3-L1 지방세포의 분화 배지에서 leptin의 발현은 녹용추출물의 농도가 증가할수록 유의한 감소를 보였다.
3. 3T3-L1 지방세포의 분화 배지에서 IGF-1의 발현은 녹용추출물 투여시 미약한

증가를 나타냈으며, IGF-1 receptor는 증가하는 경향을 나타냈다.

4. 3T3-L1 지방세포의 분화 배지에서 tri-glyceride의 발현은 녹용추출물의 농도가 증가할수록 유의한 감소를 보였다.

參考文獻

1. 안주영. 서울지역 학생의 발육 표준치에 대한 통계적 관찰. 소아과. 1996;39(12):1669-1679.
2. 李時珍. 本草綱目. 서울: 고문사. 1975: 404-407, 596, 1205, 1558.
3. 載新民. 現代本草中國藥物學, 臺灣, 啓業書局. 1974:1253.
4. 辛民敎. 臨床本草學, 서울: 營林出版社. 1986:184.
5. 배대식. 동물의 발육에 미치는 녹용의 효과에 관한 연구(I). 韓蓄誌, 1975;17:571.
6. 배대식. 동물의 발육에 미치는 녹용의 효과에 관한 연구(II). 韓蓄誌, 1976;10:209.
7. 배대식. 동물의 발육에 미치는 녹용의 효과에 관한 연구(III). 韓蓄誌, 1977;15:103.
8. 허령, 최숙형, 이매빈, 정규찬, 고돈이. 녹용에 관한 연구(II) 녹용이 실험용 백서의 성장에 미치는 영향에 대해서. 약학회지. 1959;5:10.
9. 김영태. 녹용 및 녹용 약침이 동물의 성장과 성장 발달에 미치는 영향. 경산대학교 대학원. 2001.
10. Ko KM, Yip TT, Tsao SW, Kong YC, Fennessy P, Belew MC, Porath J. Epidermal growth factor from deer (Cervus elaphus) submaxillary gland and velvet antler. Gen Comp Endocrinol. 1986;63(3):431-40.
11. Suttie JM, Gluckman PD, Butler JH, Fennessy PF, Corson ID, Laas FJ. Insulin like growth factor 1 (IGF-1) antler stimulating hormone. Endocrinology. 1985;116(2):846-8.
12. Li C, Wang W, Manley T, Suttie JM. No direct mitogenic effect of sex hormones on antlerogenic cells detected in vitro. Gen Comp Endocrinol 2001; 124(1):75-81.
13. Francis SM, Suttie JM. Detection of growth factors and proto oncogene mRNA in the growing tip of red deer (Cervus elaphus) antler using reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). J Exp Zool. 1998;281(1):36-42.
14. Sempere AJ, Mauget R, Bubenik GA. Influence of photoperiod on the seasonal pattern of secretion of luteinizing hormone and testosterone and on the antler cycle in roe deer (Capreolus capreolus). J Reprod Fertil. 1992;95(3):693-700.
15. Bubenik GA, Bubenik AB, Brown GM, Wilson DA. The role of sex hormones in the growth of antler bone tissue (Endocrine and metabolic effects of antiandrogen therapy). J Exp Zool. 1975;194(2):349-58.
16. Ho KK, O'Sullivan AJ, Hoffman DM. Metabolic actions of growth hormone in man. Endocrine J. 1996;43suppl:S57

- 63.
17. Goodman HM, Gorin E, Honeyman TW. Biochemical basis of for the lipolytic activity of growth hormone. Progress and challenge. New York, Marcel Dekker Inc. 1988:75-111.
 18. Martin RJ, Drewry M, Jewell D, Harris RB, Young R, Patton JS. Growth hormone treatment reduces total body fat accumulation in Zucker obese rats. *Int J Obes*. 1989;13(3):327-35.
 19. Isozaki O, Tsushima T, Nozoe Y, Demura H, Seki H. Effects of growth hormone on leptin gene expression in rats. *Endocrine Journal* 45(S). 1998: S117-119.
 20. Bright GM, Rogol AD, Johanson AJ, Blizzard RM. Short stature associated with normal growth hormone and decreased somatomedine C concentration : Response to exogenous growth hormone. *Pediatrics*. 1983;71:576-580.
 21. 오진희, 이병철. 성장호르몬 결핍증 환아에서 성장호르몬 치료가 혈청 leptin 농도에 미치는 영향. *대한내분비학회지*, 2000; 15(4·5):493-501.
 22. Chen XL, Hausman DB, Dean RG, Hausman GJ. Hormonal regulation of leptin mRNA expression and preadipocytes recruitment and differentiation in porcine primary cultures of SV cells. *Obes Res* 6. 1998:164-172.
 23. 이경노. 마우스 지방세포에서 인슐린 및 성장호르몬에 의한 leptin 유전자의 발현 조절. *고신대학교 대학원*. 1999.
 24. Troiano RP, Flegal KM, Kyczmarski RJ. Overweight prevalence and trends for children and adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1995;149:1085-91.
 25. Freedman DS, Srinivasan SR, Valdez RA, Williamson DF, Berenson GS. Secular increases in relative weight and adiposity among children over two decades. the Bogalusa Heart Study, *Pediatrics*. 1997;99:420-6.
 26. 강윤주, 홍창호, 홍영진. 서울 시내 초,중,고 학생들의 최근 18년간(1976-1996) 비만도 변화추이 및 비만의 증가 양상. *한국영양학회지*. 1993;30:32-9.
 27. 金扶年. 녹용의 추출액이 조골세포의 활성화와 파골세포의 생성에 미치는 영향, *Effects of Extracts of Antler on Osteoblastic Activity and Osteoclast Generation*. 단국대학교 일반대학원. 2000.
 28. Rohner Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Obesity, Leptin, and the brain. *N Eng J Med*. 1996;334:324-325.
 29. A Matson, F Wiater. Leptin and the regulation of body adiposity, *Diabetes review*. 1996;4:488-508.
 30. Behme MT. Leptin: Product of the obese gene. *Nutr Today*. 1996;31:138-141.
 31. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR et al. Serum immunoreactive leptin concentration in normal weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334:292-295.
 32. Flier JS, Maratos

- and hypothalamus. Novel Peptides for New pathways, *Cell*. 1997;92:437-40.
33. Meier CA. Advances in the understanding of the molecular basis of obesity. *Eur J Endocrinol*, 1995;133:761-3.
 34. Mistry AM, Swick AG, Romsos DR. Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and ob/ob mice. *J Nutr*. 1997;127:2065-72.
 35. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372L:425-32.
 36. Fredrich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice, Evidence for diet induced resistance to leptin action. *Nature Med*. 1995;1(12):1311-4.
 37. Klein S, Coppack SW, Mohamed Ali V, Landt M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes*. 1996;45:984-7.
 38. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN 93 purified diets for laboratory rodents, final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN 76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123:1939-51.
 39. Ahren B, Mansson S, Gingerigh RL, Havel PJ. Regulation of plasma leptin in mice, influence of age, high fat diet, and fasting. *Am J Physiol*. 1997;273:R113-20.
 40. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y et al. Leptin levels in huma and rodent, Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight reduced subjects. *Nature Med*. 1995;1:1155-61.
 41. Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Kawada T, Fushiki T, Nakao K. Augmented expression of the obese gene in the adipose tissue from rats fed high fat diet. *Biochem Biophys*. 1999;140:35-42.
 42. al Shoumer KA, Anyaoku V, Richmond W, Johnston DG. Elevated leptin concentrations in growth hormone deficient hypopituitary adults. *Clin Endocrinol*. 1997;47:153-159.
 43. Janssen YJ, Frolich M, Deurenberg P, Roeltsema F. Serum leptin levels during recombinant human GH therapy in adult whth growth hormone deficiency. *Eur J Endocrinol*. 1997;137:650-654.
 44. Fisker S, Vahl N, Hansen TV, Jorgensen JO, Hagen C, Orskove H, Christiansen JS. Serum leptin is increased in growth hormone deficient Adult, Relationship to body composition and effects of placebo-controlled growth hormone therapy for 1 year. *Metabolism*. 1997;46:812-817.
 45. Rauch F, Westermann F, Englaro P, Bium WF, Schonau E. Serum leptin is suppressed by growth hormone therapy in growth hormone deficient chil-

- dren. *Horm Res.* 1998;18-21.
46. Elimam A, Lindgren AC, Norgren S, Kamel A, Skwirut c, Bang P, Marcus C. Growth hormone treatment down-regulates serum leptin levels in children independent of changes in body mass index. *Horm Res.* 1999; 52:66-72.
 47. Isozaki O, Tsushima T, Miyakawa M, Demura H, Seki H. Growth hormone directly inhibits leptin gene expression in visceral fat tissue in fatty Zucker rats. *J Endocrinol.* 1999;161(3): 511-6.
 48. Hardie LJ, Guihot N, Trayhurn P. Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res.* 1996;28:685-689.
 49. Rauch F, Westermann F, Englaro P, Bium WF, Schonau E. Serum leptin is suppressed by growth hormone therapy in growth hormone deficient children. *Horm Res.* 1998;50:18-21.
 50. Coutant R, Lahlou N, Bouvattier C, Bougneres P. Circulating leptin level and growth hormone response to stimulation tests in obese and normal children. *Eur J Endocrinol.* 1998;139: 591-597.
 51. Okuya S, Tanabe K, Tanizawa Y, Oka Y. Leptin increases the viability of isolated rat pancreatic islets by suppressing apoptosis. *Endocrinology.* 2001;142(11):4827-30.
 52. Ju SK, Park JH, Na SY, You KH, Kim KL, Lee MK. Determination of rat leptin activity in vitro using a novel luciferase reporter assay. *Mol Cells.* 2001;12(1):131-6.
 53. 대한임상의학연구소. 임상병리검사편람. 서울:의학문화사. 1992. 158-246.