

## 항비만에 대한 생약복합물의 효과

진휘승<sup>†</sup> · 박금주 · 박승희 · 김재기

정산생명공학연구소(주)

### The Effects of Herbal Extract Mixture on Anti-Obesity

Hwi Seung Chin<sup>†</sup>, Keum Ju Pack, Seung Hee Pack, and Jae Ki Kim

R&D Center, Jung San Bio Technology, Gyeonggi 445-964, Korea

#### Abstract

In this study, we investigated the anti-obesity activity of the herbal extract mixture (HEM). The inhibitory effect of HEM on triglyceride accumulation of 3T3-L1 preadipocyte was examined by Oil-Red O staining. HEM inhibited the triglyceride accumulation of 3T3-L1 preadipocyte cell and reduced glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity. We further investigated the effect of HEM in prevention of obesity in male ICR mouse for 5 weeks. Experimental groups were divided into high fat diet group (HFD), HFD supplemented with 100 mg/kg HEM group (HEM1) and HFD supplemented with 200 mg/kg HEM group (HEM2). Body weight and food efficiency ration of HEM1 and HEM2 was decreased by 52% and 50% and by 45% and 50%, respectively. The amount of adipocyte in body weight was decreased. Blood triglyceride and total cholesterol of HEM1 was significantly decreased. These results indicate that HEM may be useful in preventing obesity.

**Key words:** anti-obesity, 3T3-L1, GPDH, body weight, food efficiency ration

#### 서 론

서구 선진국과 같이 우리나라에서도 최근 과도한 열량 섭취와 운동부족 등으로 인하여 비만 인구가 증가하고 있다. 세계보건협회는 2010년에는 서양인의 약 50%가 비만으로 될 가능성이 높은 것으로 예상하고 있으며, 우리나라에서도 시간이 지날수록 비만이 크게 증가할 것으로 예상하고 있다. 비만은 외형적인 문제뿐만 아니라, 과체중으로 인하여 고혈압, 고지혈증, 동맥경화, 심장질환, 제2형 당뇨병 등과 같은 성인병 발병률 또한 증가시킨다고 보고되어져 있다(1,2).

비만 유발 원인으로서는 과도한 지방세포의 분화 증가, 에너지 섭취와 소비간의 불균형으로 인한 체내 지방 축적 증가가 주된 원인으로 알려져 있으며, 그 외 유전적 요인 등 복합적인 원인으로 인하여 유발이 되며 비만과 연관된 질병의 이해와 치료를 위해 지방세포의 분화와 지방대사에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(3-5).

전지방세포(preadipocyte)인 3T3-L1은 Green과 Kehinde (6-9)에 의해서 처음으로 3T3 세포로부터 분리되었고, 생물학적 특성과 적절한 배양 조건에서 지방세포로 분화하는 성질이 밝혀진 후, 지방세포의 분화과정과 지방축적을 연구하는데 현재 널리 사용되고 있다(10-12). 많은 연구자들이 3T3-L1 세포를 이용하여 전지방세포의 증식 및 지방세포로

의 분화에 영향을 주는 물질을 탐색한 결과 retinol(13), retinoic acid(14), vitamin E(15), vitamin D group(16), lithium(17), nicotinamide(18), phorbol ester(19), dihydroteletocidin B(19) 등은 지방세포로의 분화를 억제시키지만, ascorbate(20), hemin(21), cadmium(22) 등은 분화를 촉진시킨다고 보고되어져 있다.

전지방세포인 3T3-L1은 분화가 진행될수록 지방세포에서만 발현되는 특별한 유전자 및 지방축적에 관여하는 효소들이 활성을 가지게 되며, 그 결과 지방세포로서의 형태를 갖추게 되며 세포 내부에 지방이 축적된다.

전지방세포에서 지방세포로 분화 및 지방축적에 관여하는 여러 인자 중에서 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)은 adipogenic agents(23) 처리 후 분화 초기에 발현이 되며, C/EBPs에 의해 발현이 유도되는 peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)는 C/EBPs와 같이 adipocyte-specific genes의 발현을 유도한다고 보고되어져 있다(24). 또한 지방 축적에 관여하는 효소 중 하나인 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH)는 지방세포로 분화가 진행될수록 발현이 증가하며, 세포 내 지방 축적에 관여하는 것으로 알려져 있다(25).

본 연구에서는 비만 치료와 관련하여 천연물질을 이용한 지방축적억제 활성물질을 개발하고자 민간요법으로 이용되

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: seung94@korea.com  
Phone: 82-31-373-1021, Fax: 82-31-375-1023

는 지유, 옥발, 적하수오와 삼백초 4종을 혼합한 생약복합물을 대상으로 지방세포인 3T3-L1 preadipocyte를 이용하여 지방세포로 분화 시 지방축적과 지방 축적에 관여하는 효소인 GPDH의 활성을 측정하고, *in vivo*에서 항비만 효과를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Lonza), fetal bovine serum(FBS, Lonza), bovine serum(BS, Gibco), trypsin(Lonza), penicillin-streptomycin(PS, Lonza), phosphate buffered saline(PBS, Lanza), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma), dexamethasone(Dex, Sigma), insulin(Ins, Sigma), 3-isobutyl-1-methylxanthine(Mix, Sigma), Oil-Red O(Sigma), NaF(Sigma), EDTA(Sigma), benzamidin(Sigma), phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF, Sigma), Tris-HCl(Sigma), triethanolamine-HCl(Sigma), NADH(Sigma), dehydroxy acetone phosphate(Sigma),  $\beta$ -mercaptoethanol(Sigma) 등을 사용하였으며, 그 외 시약은 1급 시약을 사용하였다. 혈액 분석에 사용한 triglyceride와 total cholesterol kit는 아산제약에서 구입을 하였고, 측정 기기는 ELISA reader(model 550, Bio-Rad), CO<sub>2</sub> incubator (3111, Thermo), inverted microscope(CK40, Olympus), UV spectrophotometer(8452A, HP) 등을 사용하였다.

### 생약 추출물의 조제

경동시장에서 4종의 식물을 구입하여 동일한 양으로 혼합하여 10배수의 물을 가하여 100°C, 3시간 2회 추출하여, 그 추출액을 감압 농축하여 물 추출물(이하 HEM(herbal extract mixture)로 표기)을 제조하였다. 세포 실험에 사용할 시료는 DMSO를 이용하여 100 mg/mL로 녹여 stock solution을 만든 후, 적정 농도로 희석하여 사용하였다.

### 3T3-L1 세포의 지방축적 측정 및 Oil Red O stain

실험에 사용된 3T3-L1 세포는 한국세포주은행에서 분양을 받았고, 세포 유지는 10% BS, 1% PS가 함유된 DMEM을 사용하여 CO<sub>2</sub> incubator(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양을 하였고, 3~4일 간격으로 계대배양을 실시하였다. 이러한 조건하에서 3T3-L1은 preadipocyte 상태를 유지한다고 알려져 있다(26).

배양중인 preadipocyte 상태인 3T3-L1을 탈착시켜 24 well plate에 동일한 수( $2 \times 10^4$ )로 cell을 seeding하여 3T3-L1 cell이 confluent stage에 도달하면 분화유도 물질인 0.25  $\mu$ M Dex, 0.5 mM Mix와 10  $\mu$ g/mL Ins을 첨가한 배양액으로 4일간 배양하여 분화유도 후, 4일간 10  $\mu$ g/mL Ins만을 첨가한 배양액으로 교환하여 지방을 축적시켰다. 검액의 효과를 조사하기 위해서 0~100  $\mu$ g/mL을 분화유도 배지에 첨가하

였다. 또한 배양액은 2일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하였다.

8일간 배양 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척, 10% formalin으로 고정시킨 후 Oil-Red O를 처리하여 염색하였다. 염색 후 70% 에탄올을 사용하여 세척 후 건조시켜 isopropyl alcohol로 용해하여 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지방함량은 대조군의 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

### 세포 독성 측정

Cell cytotoxicity test는 Mosmann의 방법(27)을 변형한 Skaper 등의 방법(28)을 응용한 MTT 측정법을 사용하였다. HEM 시료 0~100  $\mu$ g/mL을 DMSO에 녹인 후 배양된 세포에 처리하여 24시간 배양하였다. MTT 용액(5 mg/mL)을 처리하여 4시간 더 배양시킨 다음, 생성된 청색 결정의 formazan의 양을 ELISA reader를 이용하여 595 nm에서 측정하였다. 세포에 대한 독성은 각각의 대조군의 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

### GPDH activity 측정

8일간 배양 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후, cell lysisation buffer를 이용하여 세포단백질을 추출하였다.

GPDH 활성측정은 Wise와 Green의 방법(29)을 응용하여 다음과 같이 측정하였다. 100 mM triethanolamine-HCl buffer, pH 7.5, 0.12 mM NADH, 2.5 mM EDTA, 0.2 mM dehydroxy acetone phosphate, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 동일한 양의 단백질을 사용하여 340 nm에서 1분 간격으로 10분간 흡광도 변화를 측정하여 GPDH의 활성을 계산하였다. 효소활성 1 unit는 1 nmol NADH/min이 산화되는 것으로 하였다.

단백질 정량은 Bradford법(30)을 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 단백질 함량을 계산하여 세포 내 총 단백질량을 측정하였다.

### 동물실험

6주령의 수컷 ICR mouse 18마리를 (주)셈타코에서 구입하여 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 군은 대조군인 HFD(high fat diet group)군과 실험군인 HEM1(HFD supplemented with 100 mg/kg HEM group)군과 HEM2(HFD supplemented with 200 mg/kg HEM group)군으로 나누었고, 각 군당 6마리씩 하였다. 실험은 5주간 체중변화, 식이섭취량, 식이효율, blood total cholesterol(BTC) 및 blood triglyceride(BTG)와 간 무게 및 부고환과 신장 주위의 지방의 무게를 측정하였다. 사육실 온도는  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도는  $50 \pm 5\%$ 로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 조절하였다.

### 식이조제

식은 AIN-93G를 기준으로 변형된 식이를 실험에 사용

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredients	HFD	HEM1	HEM2
Casein	200	200	200
Corn starch	300	299.9	299.8
Sugar	100	100	100
Lard	300	300	300
Cellulose	50	50	50
Soybean oil	5	5	5
Vitamin mix	10	10	10
Mineral mix	35	35	35
HEM	—	0.1	0.2
Total	1,000	1,000	1,000

하였으며, 대조군은 lard, casein, vitamin mix, mineral mix, sugar와 starch 등이 함유된 고지방 식이, 실험군은 대조군 식이에 100 또는 200 mg/kg HEM을 첨가한 고지방 식이로 조제하여 사용하였다(Table 1). 식이섭취량은 1주일에 2회 측정하였으며, 식이와 물은 제한 없이 자유 공급하였다.

혈액분석

혈액은 실험 종결 후 복강대정맥에서 채혈한 후 원심분리 후 얻어진 혈장을 시료로 사용하였다. 혈장 triglyceride는 Muller방법(31)에 준한 효소법에 의한 kit를 사용하였으며, 혈장 total cholesterol은 Richmond방법(32)에 준한 효소법에 의한 kit를 사용하여 각각 550, 500 nm에서 UV spectrophotometer를 사용하여 생화학 검사를 수행하였다.

지방조직 무게 측정

실험 종료 후 마우스를 12시간 동안 절식시키고 에테르로 마취한 후, 지방조직의 무게를 조사하기 위하여 부고환주위 지방(좌/우), 신장주위지방(좌/우)과 간을 적출하여 생리식염수로 세척한 다음 여과지로 수분을 제거한 후 중량을 측정하였다.

통계처리

본 실험결과는 각 항목에 따라 평균치±표준오차(standard error, SE)를 구하였으며, Student's t-test로 검증하였으며,

p value<0.05는 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

3T3-L1 지방 축적에 미치는 검액의 효과

3T3-L1 adipocytes의 지방축적율을 조사하기 위하여 배양된 세포에 분화유도물질과 함께 HEM을 0, 20, 40, 60, 80 그리고 100 µg/mL로 처리하였다. 그 결과 분화유도물질만을 처리한 것과 비교 시 HEM의 처리 농도가 증가함에 따라 지방세포 내 지방함량은 56, 56, 48, 42 그리고 32%로 감소하였고(Fig. 1), Oil Red O로 염색을 하여 비교하였을 경우에도 HEM의 농도가 증가함에 따라 염색된 지방이 감소함을 알 수 있었다(Fig. 2). 이는 지방세포에 지방이 축적되는 것을 HEM이 억제시키는 것으로 사료된다.

세포독성 측정

3T3-L1 adipocytes에서 HEM의 세포독성을 조사하기 위하여 0~100 µg/mL 농도의 HEM을 처리하였을 때, 대조군인 DMSO만을 처리한 것과 비교하여 세포증식의 변화 정도

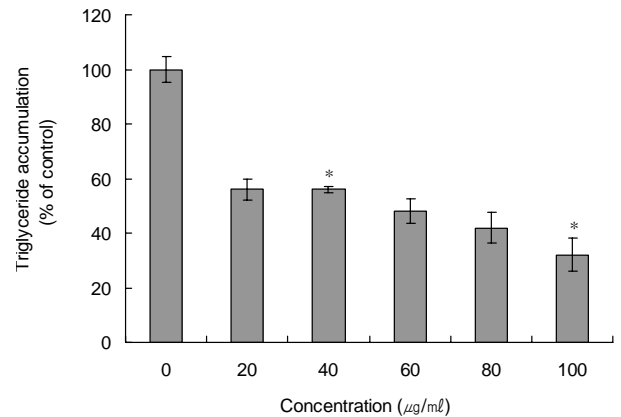


Fig. 1. Effect of HEM on triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Data are expressed as mean±SE. \*p<0.05 vs control.

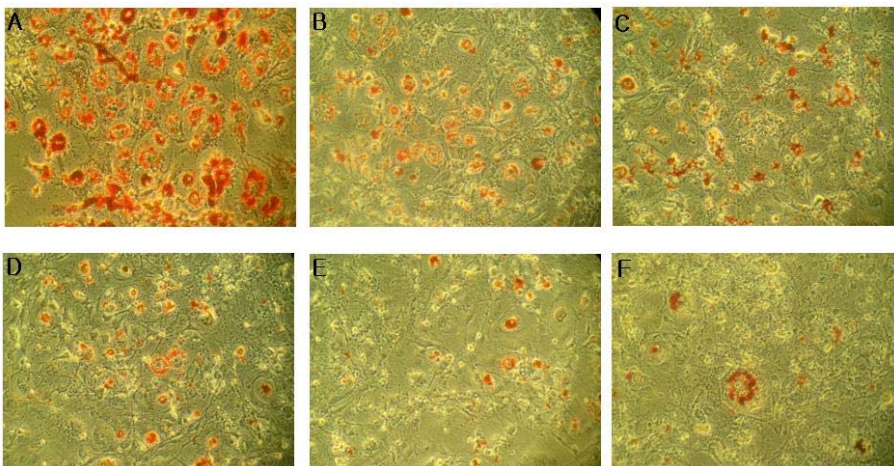


Fig. 2. Oil Red O staining. Images were obtained at 8 day of differentiation with HEM treatment. (A) 0 µg/mL HEM. (B) 20 µg/mL HEM. (C) 40 µg/mL HEM. (D) 60 µg/mL HEM. (E) 80 µg/mL HEM. (F) 100 µg/mL HEM. (×200)

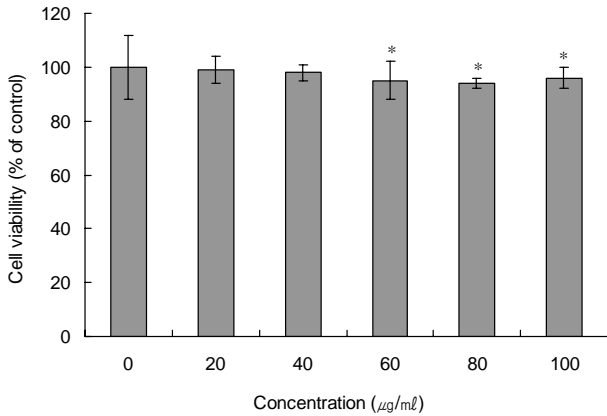


Fig. 3. Cytotoxicity of HEM against 3T3-L1 preadipocytes. Data are expressed as mean±SE. \*p<0.05 vs control.

를 계산하여 세포독성을 조사하였다(Fig. 3). 고농도인 100 µg/mL에서도 cell viability가 95% 이상인 것으로 측정되어 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다.

GPDH activity

HEM의 처리 농도가 증가함에 따라 지방축적이 감소가 되었고, 고농도에서도 독성을 보이지 않아 고농도인 100 µg/mL로 GPDH의 활성을 측정한 결과, 분화유도물질만을 처리한 군(MDI)의 GPDH 활성이 129.36 U/mg으로 처리하지 않은 군(Control)에 비해서 약 5.8배 활성이 증가되었으며, 100 µg/mL HEM을 분화유도물질과 함께 처리한 군(MDI+HEM)은 분화유도물질만을 처리한 것과 비교 시 GPDH의 활성이 59% 감소되었다(Table 2).

체중 및 식이섭취량에 미치는 영향

체중 변화와 식이효율에 미치는 HEM의 효과를 알아보기 위해서 고지방식이에 HEM을 각각 100, 200 mg/kg을 식이에 첨가하여 5주간 투여하고 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 고지방식이만을 섭취한 군과 비교 시 HEM1과 HEM2의 체중 변화는 각각 52%와 50% 낮았으며, HEM2군은 통계학적으로 유의한 차이(p<0.05)를 나타내었다. HEM1의 체중 감소에서 유의적 차이가 없는 것은 다소 낮은 식이섭취량에 기인하는 것으로 사료된다. 식이효율 또한 45%와 50% 낮았다. 특히 HEM1보다 HEM2의 식이섭취량이 13% 증가하였지만 식이효율은 낮아 HEM2가 체중의 증가를 억제시키는

Table 2. Effect of HEM (100 µg/mL) on GPDH activity in 3T3-L1 adipocytes

Sample	GPDH <sup>3)</sup> activity (U/mg protein)
Control <sup>1)</sup>	22.5±0.46
MDI <sup>2)</sup>	129.36±1.12*
MDI+HEM	53.2±3*

<sup>1)</sup>Control: preadipocyte.

<sup>2)</sup>MDI: treatment of MIX, DEX and insulin.

<sup>3)</sup>GPDH: glycerol-3-phosphate dehydrogenase.

Data are expressed as mean±SE. \*p<0.05 vs control.

데 효과가 더 높은 것으로 사료된다.

혈액분석

HEM1은 대조군과 비교 시 혈중 중성지방과 총콜레스테롤 수치가 각각 38%, 29% 감소되었으나, HEM2는 혈중 중성지방은 대조군보다 증가하였으나 총콜레스테롤은 17% 낮았다(Table 3).

지방조직의 무게

실험 종결 후 군별 조직의 지방의 무게를 측정한 결과, 대조군과 비교하여 HEM1과 HEM2에서 부고환주위의 지방 무게가 각각 7%와 18% 적었으나 유의성은 보이지 않았으며, 신장주위의 지방무게는 44%와 41% 유의적인 감소(p<0.05)를 보였다. 또한 간 무게를 측정한 결과 대조군과 비교하여 HEM1과 HEM2는 16%와 2% 낮았으나 유의적인 차이는 보이지 않았다(Table 4).

고찰

우리나라도 생활수준의 향상과 서구화된 식생활로 인해

Table 4. Effect of HEM1 and HEM2 on body fat weight in mouse fed high fat diet

Group	Epididymal fat weight (mg/g body weight)	Perirenal fat weight (mg/g body weight)	Liver weight (mg/g body weight)
HFD <sup>1)</sup>	54.9±4.56	27.4±3.54	51.1±4.74
HEM1 <sup>2)</sup>	51.3±9.78	15.4±3.33*	42.8±0.75
HEM2 <sup>3)</sup>	45.2±8.56	16.3±2.1*	50.3±4.76

<sup>1)</sup>HFD: high fat diet group.

<sup>2)</sup>HEM1: HFD supplemented with 100 mg/kg HEM group.

<sup>3)</sup>HEM2: HFD supplemented with 200 mg/kg HEM group.

Data are expressed as mean±SE. \*p<0.05 vs HFD.

Table 3. Changes in body weight, food intake, food efficiency ration (FER) and blood analysis of mice fed high fat diet with HEM for 5 weeks (n=6)

Group	Initial weight (g)	Final weight (g)	Food intake (g/5 weeks)	FER <sup>1)</sup>	BTG <sup>2)</sup> (mg/dL)	BTC <sup>3)</sup> (mg/dL)
HFD <sup>4)</sup>	34.8±1.44	53.3±4.33	138±6.00	0.4±0.07	117.3±28.78	277.7±24.41
HEM1 <sup>5)</sup>	32.3±0.53*	41.1±1.79	119±5.85	0.22±0.03*	73.3±9.06*	198±2.52*
HEM2 <sup>6)</sup>	33.9±0.78*	43.2±1.29*	136±7.98	0.2±0.02*	173.7±62.28	231.3±23.81

<sup>1)</sup>FER: weight gain (g/5 weeks)/food intakes (g/5 weeks). <sup>2)</sup>BTG: blood triglyceride. <sup>3)</sup>BTC: blood total cholesterol. <sup>4)</sup>HFD: high fat diet group. <sup>5)</sup>HEM1: HFD supplemented with 100 mg/kg HEM group. <sup>6)</sup>HEM2: HFD supplemented with 200 mg/kg HEM group. Data are expressed as mean±SE. \*p<0.05 vs HFD.

점차 비만환자가 증가하는 추세에 있다. 이는 개인의 건강을 해칠 뿐만 아니라, 사회적으로도 문제이기 때문에 이에 대한 치료와 예방에 관한 관심이 점차 높아지고 있다. 비만은 체내 지방이 과잉으로 증가된 상태로 단순한 과체중의 상태가 아닌, 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 말한다. 따라서 과도한 칼로리 섭취로 인해 소비되고 남은 칼로리가 중성지방 형태로 지방조직에 과잉으로 축적되는 질환으로서 유전적 요인과 호르몬, 효소 활성화와 같은 생리적 요인을 비롯하여 나이, 성별, 활동량 등 환경적인 요인들의 상호작용에 의하여 발생하는 것으로 알려져 있다(33-35).

민간요법은 예로부터 민간에서 전해져 오는 질병치료를 목적으로 시행되어온 방법들로서, 한의학이나 현대의학의 근본이 생활 속에서 시작되고 있다는 점에서 민간요법은 의료 행위의 원조라 할 수 있다(36).

삼백초(*Saururus chinensis* Baill.)는 삼백초과에 속하는 다년생 초본으로 예로부터 다양한 약효를 가지고 있어 민간에서 약으로 널리 사용되고 있으며, 특히 부종, 이뇨, 소종, 해독 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(37). 최근에는 간 보호 작용, 항암, 진통작용 및 뇌신경 세포 손상에 예방효과가 있는 것으로 보고되어지고 있다(38). 전초에는 정유 성분은 주로 많이 있으며, 대부분 quercetin, isoquercitrin, rutin 및 수용성 tannin 등으로 구성되어 있다(39).

지유(*Sanguisorba officinalis* L.)는 장미과에 속하는 다년생 초본인 오이풀 및 동속근연식물의 뿌리를 건조한 것으로 중국, 일본, 우리나라 전 지역의 산과 들, 특히 산비탈의 습기가 적당한 곳에서 많이 자란다(40). 항산화효과(41), 과민성 알레르기의 예방과 항암 및 항균효과(42,43), 지혈작용(44), 항응고작용(45) 등이 보고되었다. 성분으로는 사포닌 배당체, pomolic acid(46), triterpenoides(47), tannin과 관련 화합물인 phenolic acid, sanguisorbic acid dilactone 및 ellagitannins인 sanguis H-1, H-2, H-3(48), ziyuglycoside I (49), glucosyltransferase와 tyrosinase inhibitor(50) 등이 보고되었다.

옥발(corn silk)은 벼과에 속하는 옥수수(*Zea mays* Linne)의 수염으로서 한방에서는 옥축서예라고 한다(51). 고혈압, 혈당강하, 토혈, 지혈, 비출혈, 평간, 설열, 각기, 축농증, 이담작용, 이뇨작용 등에 효능이 있다고 보고되어 왔다(52). 옥발의 성분에는 지방유, 정유, 배당체, saponin, alkaloid 외에 inositol, cryproxanthin, pantothen acid, vitamin C, vitamin K, sitosterol, stigmasterol, 사과산, 주석산, 포도당, 키실란, 갈락탄, 카테롤 등이 함유되어 있다(53).

적하수오(*Polygonum multiflorum* Thunberg)는 마디풀과 식물인 하수오의 근경을 건조한 것으로, 주요 약리작용은 조혈작용, 면역증강, 혈중지질강화 및 항노화 작용, 간기능 보호작용, 심근허혈에 대한 보호작용 등에 효과가 있다고 보고되어져 있으며, 주성분은 lecithin과 hydroxyanthraquinone 유도체로 chrysophanol, emodin, physcion, questin이 있고, 최근에 polygonimitin B, C가 분리되었다(54).

4종의 식물을 동량으로 혼합하여 10배의 물을 사용하여 가열 추출과 감압농축 과정을 거쳐 HEM을 조제하였다. *In vitro* 실험으로서 3T3-L1 preadipocyte가 adipocyte로 분화 유도과정에서 0~100 µg/mL 농도로 분화유도물질과 함께 48시간 처리 후 배지를 교환하여 6일 후 Oil-Red O 염색법으로 축적된 지방을 염색하였고, 분화유도물질만을 처리한 군과 비교 시 HEM의 처리 농도가 증가함에 따라 유의적으로 지방축적이 감소되었으며(Fig. 1, 2), 동일 농도에서 세포독성 또한 없음을 알 수 있었다(Fig. 3).

지방축적에 관여하는 효소인 GPDH 활성을 측정하기 위해서 지방축적 억제율이 높고 세포 독성을 보이지 않은 농도인 100 µg/mL을 선별하여 실험을 하였다. 그 결과 분화유도물질만을 처리한 군과 비교 시 GPDH 활성이 50 % 감소하였다(Table 2). 전지방세포에서 지방세포로 분화가 진행될수록 GPDH 활성은 증가되는 것으로 알려져 있고(25), 반면 GPDH 활성이 감소되면 지방축적이 감소된다고 보고되어져 있다(55-57). 이는 HEM의 처리에 의한 지방축적 감소는 GPDH 활성이 감소된 결과인 것으로 사료된다.

동물실험에서 5주간 고지방식이만을 섭취한 군과 고지방 식이에 100 또는 200 mg/kg HEM이 첨가된 HEM1과 HEM2 군을 비교하여 항비만에 대한 효과를 관찰하였다. HEM의 효과는 체중변화, 식이효율과 혈중 triglyceride와 total cholesterol 측정 및 부고환과 신장 주위의 지방 무게 측정 및 간 무게를 측정하여 판단하였다. HEM 섭취에 따른 체중과 식이효율의 감소는 처리군에서 유의성 있게 감소하였으며(Table 3), 특히 HEM2는 식이섭취량이 HEM1보다 많았으나 식이효율에서는 낮아 지방축적억제 효과성이 있는 것으로 사료된다.

Song과 Kim(58)의 보고에서 total cholesterol과 triglyceride가 대조군보다 8주차에는 증가하였지만 14주차에는 감소하였으며, Kim과 Seo(59)의 보고에서도 triglyceride가 8주차에서 증가되었으나 12주차에서는 감소되었다. 이런 결과는 식이섭취량 감소에 따른 신체에서 이를 보상하기 위해서 일어나는 반응으로 혈액 속에서는 이와 관련된 수치들이 증가된 것으로 판단하였고, 약물의 효과가 늦게 나타날 경우 일 수도 있다고 추정하였다. Cho 등(60)과 Kang 등(61)의 연구에서는 동물실험에서 triglyceride의 감소 효과가 상이하게 나타났으며, Choo와 Shin(62)은 capsaicin의 투여에 의한 total cholesterol과 triglyceride가 동물실험에서 다른 연구자와 상이한 결과가 나타난 것은 식이의 지방함량, 약물의 투여기간 및 방법 그리고 동물의 종과 계통에 의하여 달라질 수 있다고 하였다. 본 연구에서 HEM2군의 triglyceride 수치는 대조군보다 상승하였으나 유의성이 없어 혈중 중성지방의 변화에 영향을 주지 않는 것으로 판단되며(Table 3), Song과 Kim(59)의 결과처럼 약물의 효과가 늦게 나타날 수 있는 점도 고려할 수 있으나 HEM1군에서의 triglyceride의 감소만으로 HEM의 효과성에 대한 근거로는 미약하므로 14

주 이상의 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 혈중 total cholesterol은 고지방식이 섭취 시 증가되는데 비해 HEM 처리군에서는 혈중 total cholesterol이 감소하였으며(Table 3), 항비만 효과가 있는 생약제의 섭취는 혈중 total cholesterol을 감소시킨다는 보고(63-65)와 일치하였다. 그러나 HEM2군은 HEM1군보다 감소 정도가 낮아 결과적으로 HEM의 농도 의존적 효과성이 없어 혈중 콜레스테롤에 미치는 영향이 미약한 것으로 사료된다.

지방조직 무게 측정에서 HEM1과 HEM2군 모두 신장과 부고환주위의 지방량이 대조군보다 적었으며, 간 무게 또한 낮았다(Table 4). 조직주위의 지방량 감소는 체중 감소에 영향을 주고, 체지방 축적과 관련하여 신장과 부고환 주위 지방량이 낮음은 체중감소와 직접적인 연관성이 있다는 결과(58)와 동일하게 본 실험에서도 체중증가 억제 효과가 나타났다.

본 연구는 HEM이 지방세포의 분화와 지방축적을 억제하고 지방세포 내의 GPDH의 활성을 억제한다는 결과를 얻었으며, 동물실험에서도 HEM 투여군은 체중 증가가 억제되었다. 이러한 원인은 부고환 및 신장 주위의 지방이 감소한 결과였다. 혈중 total cholesterol과 triglyceride에는 영향을 주지 않았으며, 이는 HEM이 혈액의 변화에 대한 작용보다는 지방세포 및 이와 관련된 인자에 영향을 주어 지방세포의 감소와 지방축적에 영향을 미쳐 결과적으로 체중이 감소되는 것으로 사료된다.

요 약

민간요법 중에서 비만 치료에 사용되는 4종의 식물인 지유, 옥발, 적하수오 및 삼백초를 동량으로 혼합하여 10배의 물을 사용하여 가열추출 후 감압농축 하여 HEM을 조제하였고, 이렇게 조제된 HEM을 사용하여 0~100 µg/mL 농도로 3T3-L1의 지방축적 억제율을 측정된 결과 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하였으며, 동일 농도에서 세포 독성은 없었다. 또한 지방 축적에 관여하는 효소인 GPDH의 활성을 억제함으로써 세포내 지방이 축적되는 것을 억제하였다. 5주간의 동물실험 결과 대조군과 비교하여 HEM1과 HEM2군 모두 체중 변화와 식이효율이 줄어드는 것으로 나타났다으며, 혈액 분석에서 HEM군은 혈중 중성지방과 총콜레스테롤에 효과를 보이지 않았다. 해부학적인 측면에서 부고환 및 신장 주위의 지방무게와 간 무게 또한 낮았다. 이러한 결과를 통해, 본 실험에서 사용한 생약복합물은 항비만 소재로써 체지방 축적억제에 효과성이 있음을 확인하였다.

문 헌

1. Michio S, Moritake H, Shou YT, Christopher BN, Roger HU. 1998. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. *J Biol Chem* 273: 32487-32490.

2. Bradford BL, Bruce MS. 2000. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404: 652-660.

3. Kim JB. 2001. New horizon in atherosclerosis research: Insights into fat cell differentiation and insulin sensitivity with ADD1/SREBP1 and PPARγ. *Korea J Lipidol* 9: 79-83.

4. Grundy SM. 1998. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J Clin Nutr* 67: 563S-572S.

5. Albu J, Allixon D, Boozer CN, Heymsfield S, Kissileff H, Kretser A, Krumhar K, Leibel R, Nonas C. 1997. Obesity solutions report of a meeting. *Nutr Rea* 55: 150-156.

6. Green H, Kehinde O. 1973. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1: 113-116.

7. Green H, Meuth M. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3: 127-133.

8. Green H, Kehinde O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5: 19-27.

9. Green H, Kehinde O. 1976. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7: 105-113.

10. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12: 207-233.

11. Boney CM, Staats BM, Atilas AD, Dercole AJ. 1994. Expression on insulin-like growth factor- I (IGF- I ) and IGF-binding proteins during adipogenesis. *Endocrinology* 135: 1863-1868.

12. Choi JH, Rhim CH, Kim JY, Yang JS, Choi JS, Byun DS. 1986. Basic studies on the development of diet for the treatment of obesity I the inhibitory effect of alginic acid as a diet fiber on obesity. *J Kor Fish Soc* 19: 303-311.

13. Sato M, Hiragun A, Mitsui H. 1980. Preadipocytes possess cellular retinoid binding proteins and their differentiation is inhibited by retinoids. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 1839-1845.

14. Stone RL, Bernlohr DA. 1990. The molecular basis for inhibition of adipose co-nversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid. *Differentiation* 45: 119-127.

15. Kawada T, Aoki N, Kamei Y, Maeshige K, Nishiu S, Sugimoto E. 1990. Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from pre-adipocytes to adipocytes of 3T3-L1 cells. *Comp Biochem Physiol* 96: 323-326.

16. Sato M, Hiragun A. 1988. Demonstration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor-like molecule in ST 13 and 3T3 L1 preadipocytes and it's inhibitory effects on preadipocyte differentiation. *J Cell Physiol* 135: 545-550.

17. Aratani Y, Sugimoto E, Kitagawa Y. 1987. Lithium ion reversibility inhibits inducer-stimulated adipose conversion of 3T3-L1 cells. *FEBS Lett* 218: 47-51.

18. Lewis JE, Shimizu Y, Shimizu N. 1982. Nicotinamide inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *FEBS Lett* 146: 37-41.

19. Shimizu Y, Shimizu N, Fujiki H, Sugimura T. 1983. Distinct inhibitory effects of dihydroteleocidin B and the phorbol ester tumor promoters on the adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Cancer Res* 43: 4974-4979.

20. Cno M, Aratani Y, Kitagawa I, Kitagawa Y. 1990. Ascorbic acid phosphate stimulates type IV collagen synthesis and accelerates adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Exp Cell Res* 187: 309-314.

21. Chen JJ, London IM. 1981. Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes. *Cell* 26: 117-122.

22. Harrison SA, Buxton JM, Clancy BM, Czech MP. 1991. Evidence that erythroid-type glucose transporter intrinsic activity is modulated by cadmium treatment of mouse

- 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 266: 19438-19449.
23. Lane MD, Tang QQ, Jiang MS. 1999. Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 677-683.
  24. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14: 1293-1307.
  25. Grégoire FM, Smas CM, Sul HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809.
  26. Morikawa M, Nixon T, Green H. 1982. Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell* 29: 783-789.
  27. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
  28. Skaper SD, Facci L, Milani D, Leon A, Toffano G. 1990. Culture and use of primary and clonal neural cells. *Cell Culture* 2: 17-33.
  29. Wise LS, Green H. 1979. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem* 254: 273-275.
  30. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
  31. Muller PH. 1977. A fully enzymatic triglyceride determination. *J Clin Chem Biochem* 15: 457-464.
  32. Richmond W. 1976. Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum continuous flow analysis. *Clin Chem* 22: 1579-1588.
  33. Chouen RW, Hong JU, Lee HW, Lee SL. 1995. Effects of nutrition education in weight management program. *J Korean Oriental Assoc Study Obes* 4: 23-32.
  34. 대한비만학회. 2001. 임상비만학. 고려의학, 서울. p 13-29, 171, 215-229.
  35. Lee WJ, Choi HJ. 2003. Effect of capsaicin on the body fat and adipocyte in the diet induced-obese mice. *J Biomed Lab Sci* 9: 215-222.
  36. 구본홍. 1987. 한국민간요법대전. 금박출판사, 서울. p 90.
  37. 박종현. 1996. 삼백초와 천궁을 이용한 약용주 개발 연구. 농림부보고서.
  38. Chung YG, Lee HS, Lee KA, Jung O, Oh WK, Kim KD, Lim JS, Moon JY, Cho YK, Park SH, Youn DY. 2002. The efficacy of *Saururus chinensis* on cervical cancer cells. *Kor J Pharmacogn* 46: 426-432.
  39. 김재길. 1984. 천연물대사전. 남산당, 서울. p 174.
  40. In collaboration with a national college of oriental medicine herbology professor association. 1994. *Herbology*. Younglim press Co., Seoul. p 392-393.
  41. An BJ, Lee SA, Kwak JH, Park JM, Lee JY, Son JH. 2004. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *Sanguisorba officinalis* L. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 244-250.
  42. Kim SH, Kim DK, Eom DO, Kim SY, Kim SH, Shin TY. 2002. *Sanguisorba officinalis* inhibits immediate-type allergic reactions. *Nat Prod Sci* 8: 177-182.
  43. An BJ, Lee SA, Son JH, Kwak JH, Park JM, Lee JY. 2004. Cytotoxic and antibacterial activities of *Sanguisorba officinalis* L. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 141-145.
  44. Goun EA, Petrichenko VM, Solodnikov SU, Sunhinina TV, Kline MA, Cunningham G, Nguyen C, Miles H. 2002. Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *J Ethnopharmacol* 81: 337-342.
  45. Kim YS, Roh JE, Ann HS. 1993. Compositional analysis of polysaccharide from *Sanguisorba officinalis* and its anti-coagulant activity. *Kor J Pharmacogn* 24: 124-130.
  46. Cheng DL, Cao XP. 1992. Pomolic and derivatives from the root of *Sanguisorba officinalis*. *Planta Med* 59: 204-245.
  47. Roher G, Budesinsky M. 1992. Triterpenoids from plants of the anguisorbeae. *Phytochemistry* 31: 3909-3914.
  48. Nonaka G, Tanaka T, Nishioka I. 1982. Tabbubsabd related compounds. Part 3. A new phenolic acid, sanguisorbic acid dilactone and three new ellagitannins, sanguins H-1, H-2 and H-3 from *Sanguisorba officinalis*. *J Chem Soc Oerkin Translation* 4: 1067-1777.
  49. Kim HK, Kim YA, Hwang SW, Ko BS. 2002. Quantitative analysis of ziyuglucoside I from *Sanguisorbae Radis*. *Kor J Pharmacogn* 33: 100-104.
  50. An BJ, Lee JT, Park JM, Kwak JH, Lee JY, Park CI, Son JH, Lim HY. 2003. Isolation of novel glucosyltransferase and tyrosinase inhibitor from the roots of Korean *Sanguisorba officinalis* L. *Kor J Herbology* 18: 255-262.
  51. 전국한의학대학교수공편. 1991. 본초학. 영림사, 서울. p 217-419.
  52. 과학백과사전출판사 엮음. 1991. 약초의 성분과 이용. 일월서각, 서울. p 187-189, 519, 651-652.
  53. 고경식, 김윤식. 1989. 한국원색식물도감. 도서출판 아카데미서적, 서울. p 264.
  54. 김호철. 2001. 한약약리학. 집문당, 서울. p 360-361, 472-473.
  55. Jeong JH, Lee SH, Hue JJ, Lee YE, Lee YH, Hong SK, Jeong SW, Nam SY, Yun YW, Lee BJ. 2007. Effects of diglyceride-conjugated linoleic acid on proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells. *J Toxicol Pub Health* 23: 223-229.
  56. Ueda H, Ishida Y, Taniguchi H. 1991. Involvement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -PKC in the differentiation of 3T3-L1 cells. *FEBS Lett* 292: 57-60.
  57. Lee CW, Youn HM, Kang KH. 2008. The effects of *Ganoderma lucidum* herba pharmacopuncture on 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *J Korean Institute of Herbal Acupuncture* 11: 47-53.
  58. Song JC, Kim KS. 2001. Effect of chegameyiin-tang extract on the change of the weight, tissue in epididymal fat, blood, leptin and uncoupled protein in visceral fat of obesity rats induced by high fat diet. *J Korean Oriental Assoc Study Obes* 1: 85-100.
  59. Kim GY, Seo IB. 2000. Effect of the semyung-Gangi-tang on the blood lipid in experimentally induced hyperlipidemic rabbits. *J Korean Oriental Med Soc* 20: 69-81.
  60. Cho HJ, Kim DK, Cho GS. 2001. Effects of sargassum extract and *Polygoni multiflori* radix extract on the obese SD rats induced by 1% cholesterol diet. *J Korean Oriental Pediatrics* 15: 1-13.
  61. Kang JI, Ding GX, Kim KH, Ko SG. 2005. Effects of *Polygonum multiflorum* THUNB on serum lipid levels in high cholesterol diet induced hyperlipidemia rats. *Korean J Oriental Prev Med Soc* 9: 105-118.
  62. Choo JJ, Shin HJ. 1999. Body-fat suppressive effects of capsaicin through  $\beta$ -adrenergic stimulation in rats fed a high fat diet. *Korean J Nutr* 32: 533-539.
  63. Kim SO, Yun SJ, Lee EH. 2007. The water extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi* var. mayuen) exhibits anti-obesity effects through neuroendocrine modulation. *Am J Chin Med* 35: 297-308.
  64. Yu MH, Im HG, Lee JW, Bo MH, Kim HJ, Kim SK, Chung SK, Lee IS. 2008. Effects of ethanol extract from *Saururus chinensis* (Bour.) Baill on lipid and antioxidant metabolisms in rats fed a high-fat diet. *Nat Prod Res* 22: 275-83.
  65. Aoki M, Tuzihara N. 1984. Effects of hatomugi (*Coix lachrymajobi* L. var. Mayuen) on the blood pressure cholesterol absorbion and serum lipids level. *Japan J Home Economics* 35: 89-96.

(2008년 9월 8일 접수; 2009년 1월 8일 채택)