

후박 추출물의 지방세포 분화 억제 효능에 관한 연구

김현주[†] · 이여명 · 김연향* · 원선임** · 최성이*** · 최신욱

(주)라디안, *한림대학교 바이오메디컬학과, **한림대학교 식품영양학과, ***한림대학교 생명과학과
(2009년 5월 14일 접수, 2009년 5월 27일 수정, 2009년 6월 3일 채택)

Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes with *Magnolia officinalis* Extracts

Hyun Ju Kim[†], Yeo Myeong Lee, Yeon Hyang Kim*, Sun Im Won**, Sung A Choi***, and Shin Wook Choi

RADIANT INC. Rm 207 Bioindustry Innovation Center, Hi-tech Venture Town, 198-53, Hupyeong, Chuncheon,
Gangwon 200-957, Korea

*Department of Biomedical Science, College of Natural Science, Hallym University

**Department of Food Science and Nutrition, College of Natural Science, Hallym University

***Department of Life Science, College of Natural Science, Hallym University

(Received May 14, 2009; Revised May 27, 2009; Accepted June 3, 2009)

요약: 후박추출물은 중국 원산인 당후박에서 제조되며, 항산화 및 항염증 효과로 알려져 있다. 후박의 성분으로는 폴레페놀인 honokiol 및 magnolol 등이 알려져 있다. 이 연구에서, 우리는 후박추출물이 triglyceride (TG)의 축적을 감소 시킴으로써 지방세포 분화를 억제한다는 표면적인 결과를 얻었다. 또한, 후박 추출물이 hormone sensitive lipase (HSL) 단백질 수준을 증가시키고 adipocyte에 specific한 transcription factors로 peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- γ 의 단백질과 mRNA 수준을 억제하였다. 결과적으로, 후박추출물이 항비만제로서 adipogenic transcription factor와 그들의 특이적인 유전자의 발현을 억제함으로써 지방세포 분화를 억제한다고 사료된다.

Abstract: Magnolia extract, prepared from the Chinese herb *Magnolia officinalis*, is known for its potent anti-oxidative and anti-inflammatory effects. In this report, we showed that *Magnolia* extract inhibits adipocyte differentiation, as evidenced by reduced triglyceride (TG) accumulation. Also, Magnolia extract increased hormone sensitive lipase (HSL) protein level, and decreased the adipogenic transcription factor peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- γ protein and their corresponding mRNA. Our results suggest a potential application of Magnolia extract as anti-obesity agents inhibits adipocyte differentiation through the down-regulation of adipogenic transcription factors and other adipocyte-specific genes.

Keywords: *Magnolia officinalis*, 3T3-L1 cell, adipocytes differentiation, peroxisome proliferator activated receptor- γ , hormone sensitive lipase

1. 서론

최근 비만이 세계 각국에서 증가추세에 있는 심각한 보건문제로 인식되고 있으며 우리나라 역시 고도의 산업 성장과 세계화의 영향으로 식생활 패턴의 서구화 및 신체 활동량 부족이 급속히 진행되어 비만 인구의 현저한

증가를 나타내고 있다. 또한 현재 우리나라의 주요 사망 원인이 되는 질환인 순환기계 질환, 암, 당뇨병 등도 비만과 밀접한 관련이 있어 그 심각성이 더욱 고조되고 있는 실정이다.

지방 조직(adipose tissue)은 에너지를 저장하는 기관으로, 음식물 섭취 등으로 인해 과도하게 섭취된 에너지를 이용하여 triglyceride (TG)를 형성한다. TG는 chylomicrons과 very low-density lipoprotein (VLDL) 입자를

[†] 주 저자 (e-mail: hjkim617@gmail.com)

통해 이동하며 extracellular lipoprotein lipase에 의해 가수분해 되어 glycerol과 free fatty acid (FFA)를 생성한다. 또한 FFA는 지방세포(adipocytes)에 의해 fatty acyl-CoA로 변환되어 glycerol-3-phosphate와 함께 세포 내에 TG를 형성하는 과정으로 순환된다[1]. 이러한 지방 조직은 정상 성인의 총 몸무게의 15 ~ 20 %를 차지하며, 신체에 널리 분포되어 있다[2]. 3T3-L1 세포가 지방세포로 분화되는 과정은 분화 유도인자들에 의해 일어나는 현상으로 분화촉진인자(insulin, dexamethasone, 1-methyl-3-isobutylxanthine, prostaglandin F₂α 등)를 첨가함으로써 세포분화를 유도할 수 있다. 반대로 분화억제인자(actinomycin D, tumor necrosis factor-α, bromodeoxyuridine 등)를 첨가함으로써 분화를 억제할 수 있다[3,4].

최근 지방 세포 내의 수많은 유전자들 및 단백질들의 발현 변화에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며 대표적인 지방분화 촉진에 관여하는 전사인자들로 PPAR-γ와 CCAAT-enhancer binding protein-α (C/EBP-α) 등이 지방세포를 성숙하게 하고 지질대사에 관여하는 유전자를 자극하여 지방 축적에 관여한다[5]. 3T3-L1 지방 전구세포는 1-methyl-3-isobutyl-xanthine, dexamethasone과 insulin (MDI)을 처리하여 배양하면 G1에서 S기로 진입하여 분화가 시작되는데 그 조절자로 retinoblastoma protein (Rb)이 작용하여 C/EBPs에 결합된다. C/EBPs는 지방세포의 분화에 있어서 중요한 전사인자로서 이량체를 형성할 수 있는 기능을 가진 leucine-zipper 결합부위와 DNA 결합부위를 가지고 있다[11]. MDI를 배지에 첨가하여 지방세포로의 분화를 유도시키면 4 h 이내에 C/EBP-β와 C/EBP-α가 유도되어 heterodimer를 이루게 되어 PPAR-γ와 C/EBP-α를 활성화시켜 adiposine, adipocyte-specific fatty acid binding protein (aP2), leptin 등과 같은 지방 세포 특이 유전자들을 활성화 시킨다[6-8].

후박(*Magnolia officinalis*)은 쌍떡잎식물에 속하여 미나리아재비목 녹나무과의 상록 활엽수로 한국, 일본, 타이완, 중국 남부에 서식한다. 예로부터 약용으로 줄기 및 가지의 껍질이 천식과 위장병 치료에 사용되었으며 magnolol, isomagnolol, honokiol, machiol과 같은 성분이 함유되어 있다. 이 중 honokiol은 polyphenol에 속하는 물질로 항우울, 혈전응고 저해, 신경 안정, 항균 효능을 나타내는 유용한 물질로 이용되고 있다. 최근 honokiol이 다양한 암세포의 mitochondrial permeability transition pore의 induction과 cytochrome c release, caspase의 활성화를

통해 세포 괴사가 유도하는 효능을 나타냄이 보고된 바 있다[9]. 그러나 이러한 honokiol 및 이를 포함하는 후박 추출물의 지방세포에 대한 연구는 거의 진행되어 있지 않은 실정이다.

화장품 시장의 경우 well-being 열풍을 타고 화장품에 첨가되는 유효성분을 식물성 원료 및 해양 원료에 이르기까지 다양한 종류로 대체하고, 이에 대한 기능성 성분에 대한 연구 개발이 활발히 이루어지고 있다. 이는 인체에 무해하고 효능 성분을 보다 쉽게 인체에 적용이 가능하다는 장점을 가지고 있어 소비자들에게 기능성 화장품에 대한 관심은 나날이 증가하는 추세이다[10]. 따라서 본 연구에서는 후박 추출물에 대한 것으로, 지방세포 내의 지방 축적을 감소시켜 세포의 크기를 줄이거나 지방 세포에 분화에 관여하는 인자를 통해 지방 형성을 감소시키는 효능에 대하여 확인하고, 이를 통해 보다 안전하고 적은 비용으로 소비자들에게 쉽게 접근이 가능한 천연물을 찾고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

세포 실험에 사용한 시약은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)와 Oil red-O, serum triglyceride detection kit, 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone crystalline, insulin from bovine pancreas, DL-isoproterenol hydrochloride (Sigma, USA)를 사용하였고, 실험에 사용된 세포주는 3T3-L1 (mouse embryonic fibroblast cell line)을 미국 세포주은행(American Type Culture Collection: ATCC, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 세포 배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), bovine calf serum (BCS), fetal bovine serum (FBS), antibiotics (penicillin 100 units/mL, streptomycin 100 units/mL)은 HyClone (Thermo, USA) 제품을 구입하여 실험에 사용하였다. Hormone sensitive lipase (HSL), peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ), β-actin에 대한 항체 및 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 사용하였다. 실험에 사용한 primer는 lipoprotein lipase (LPL), PPAR-α, PPAR-γ, leptin으로 Genotech (Korea)에서 구입하였다. Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche, Germany)와 High Fidelity PCR Master (Roche, Germany)를 사용하여 유전자 발현 정도를 확인하였으며, TG accumulation

rate를 측정하기 위하여 UV/vis-spectrophotometer (SHANGHAI instruments Inc., UNICO, China)와 EILSA reader (PerkinElmer, VICTOR3, USA)를 사용하였다.

2.2. 후박의 유효성분 추출

건조된 후박 200 g을 분쇄하여 분말화한 후, 증류수 3 L를 첨가하여 3 h 동안 100 °C에서 추출하였다. 추출이 완료된 후, 부직포를 이용하여 1차 여과를 수행하고 4,500 rpm에서 60 min 동안 원심분리 하였다. 상층액을 회수하여 1 µm 크기의 여과지를 이용하여 감압 여과 하였다. 회수한 여과액을 감압 농축하여 파우더 4 g을 얻었다.

2.3. 세포 배양

실험에 사용된 세포는 Human keratinocyte (HaCaT) 과 지방 전구세포인 3T3-L1을 사용하였으며 HaCaT 세포의 경우에는 10 % FBS, penicillin (100 units/mL), stryptomycin (100 units/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 5 % CO₂, 37 °C에서 배양하였으며 3T3-L1 세포는 10 % bovine calf serum, penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 units/mL)이 첨가된 DMEM으로 5 % CO₂, 37 °C에서 배양하였다. 3T3-L1의 지방세포로의 분화는 100 µM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 250 nM dexamethasone, 3.3 µM D-biotin, 1 % bovine serum albumin (BSA), 10 µg/mL insulin solution from bovine pancreas (MDI)와 10 % FBS를 함유한 배지로 유도하였으며, 10 % FBS와 10 µg/mL insulin을 함유한 DMEM 배지로 교체하여 주면서 분화 정도를 관찰하였다.

2.4. 후박 추출물의 세포 생존율 평가

MTT 정량은 Mosmann[11]의 방법을 변형하여 실시하였다. 실험에 사용된 세포로는 HaCaT 세포와 지방 전구세포인 3T3-L1을 이용하였다. HaCaT 세포와 3T3-L1을 1 × 10⁴ cells/well의 농도로 준비한 96-well plates에 후박 추출물을 농도별로 투여하여 CO₂배양기에서 24 h 동안 배양하였다. MTT 용액(5 mg/mL)을 첨가하고 4 h 후 배양액을 제거하고 100 µL acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 570 nm에서 ELISA reader (VICTOR3, PerkinElmer, USA)로 흡광을 측정하였다.

2.5. 후박 추출물의 지방 축적 억제 효능 평가

세포 내에 형성되는 지방의 축적 정도를 평가하는 방법으로 Oil-red-O 염색을 수행하였다. 3T3-L1을 1 × 10⁵

cells/well의 농도로 준비하여 농도 별로 후박 추출물을 처리하고 24 h 동안 배양하였다. PBS로 각 well을 세척하고 4 % paraformaldehyde를 1 mL씩 넣어 5 min 동안 정치한 후, 제거하고 4 % paraformaldehyde를 1 mL씩 첨가하여 1 h 동안 실온에서 정치하였다. Paraformaldehyde를 제거하고 60 % isopropanol을 첨가하여 세척한 후, 각 well이 완전히 마를 때까지 실온에 방치하였다. 건조된 각 well에 Oil-red-O working solution을 1 mL씩 넣고 1 h 동안 염색한 후, 증류수로 4회 반복하여 세척하였다. 세척한 well이 완전히 마른 후에 100 % isopropanol을 2 mL씩 넣어 염색된 시약을 용출시켜 500 nm에서 흡광을 측정하여 지방 축적 정도를 평가하였다.

2.6. 후박 추출물의 세포 내 TG Contents 측정

3T3-L1 cell을 회수하여 1 % Triton X-100 이 함유된 PBS를 넣어 용해시켜 준비하고 TG의 농도는 GPO-tinder를 이용한 serum triglyceride detection kit를 이용하여 측정 하였다. 우선 TG reagent에 10 mL의 증류수를 넣고, free glycerol reagent에 40 mL의 증류수를 각각 넣어주어 reconstitute reagents를 만든 후 0.8 mL의 free glycerol reagent에 각각 10 µL water (blank), 10 µL glycerol standard (2.5 mg/mL standard), 10 µL sample을 넣고 37 °C에서 5 min 동안 반응시키고 540 nm에서 초기 흡광(IA)을 측정하였다. 그 후 0.2 mL의 TG reagent에 각각 10 µL water (blank), 10 µL glycerol standard (2.5 mg/mL standard), 10 µL sample을 넣고 37 °C에서 5 min 동안 반응시키고 540 nm에서 최종 흡광(FA)을 측정하였다. TG의 양을 glycerol 정량 곡선을 이용하여 계산하였다.

2.7. Western Blot Analysis

시료는 24 h 동안 처리한 3T3-L1 세포를 RIPA buffer (0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 1 % NP-40, 1 mM PMSF)로 용해하고 원심분리 하였다. 회수한 상층액을 12 % SDS-PAGE를 이용하여 전기영동하고 이를 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 이를 5 % skim milk가 함유된 Tris 완충용액에서 PPAR-γ (sc-7273), HSL (sc-74489), β-actin (sc-1615) 항체와 각각 반응시킨 후 2차 HRP-항체를 가하고 WEST-ZOL Western blotting detection system (chemiluminescence reagent, Intron, Korea)을 사용하여 Kodak X-ray film에 감광시킨 후 현상하였다

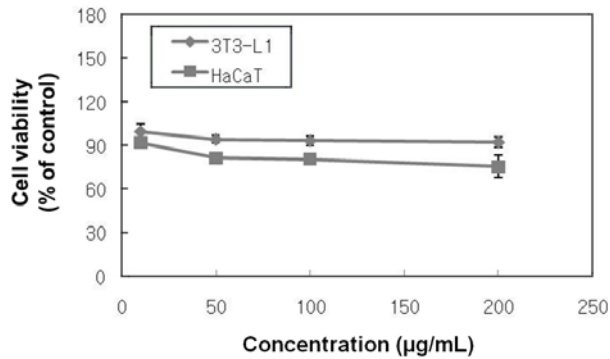


Figure 1. Cytotoxic effects of *Magnolia officinalis* extract on the 3T3-L1 and HaCaT cells.

2.8. RNA 분리 및 RT-PCR

RNA의 추출은 acid guanidinium-phenolchloroform (AGPC) 법에 의한 total RNA 추출시약(RNAiso Plus, TaKaRa, Japan)을 사용하였다. cDNA 합성은 Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit를 이용하여 cDNA를 합성하였으며, High Fidelity PCR Master와 제작된 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. cDNA 합성은 1 µg의 total RNA로 50 °C에서 1 h, 85 °C에서 5 min 동안 가열시킴으로써 반응을 중지시켰다. PCR 증폭은 94 °C에서 50 s 동안 denaturation 시키고 55 °C, 50 s 동안 annealing, 72 °C에서 50 s 동안 extension시켰다. 이를 30회 반복 하였으며 final extension은 72 °C, 5 min 동안 수행하였으며 증폭된 결과물은 2 % agarose gel에서 전기영동 하여 유전자 발현을 chemiluminescent detection system (ChemiDoc XRS system, Bio-Rad Laboratories, USA)로 확인하였다. Leptin, PPAR- α , lipoprotein lipase (LPL)의 oligonucleotide 서열은 leptin: sense: 5'-GGAATTCAGAAAATGTGCTGGAG-3', antisense: 5'-GGAATTCTCAGCATTCAGGGCTAAC-3', PPAR α : sense: 5'-CCTGTCTGTCGGGATGTCACACAATGC-3', antisense: 5'-GCAACTTCTCAATGTAGCCTATGTTT-3', LPL: sense: 5'-GGCCGCAGCAGACGCAGGAAGAGATTT-3', antisense: 5'-AAGAAGGAGTAGGT TTTATTTGTGGAA-3' GAPDH: sense: 5'-AAATTCAACGGCACAGTCAA-3', antisense: 5'-GTCTTCTGGGTGG CAGTGAT-3'이다.

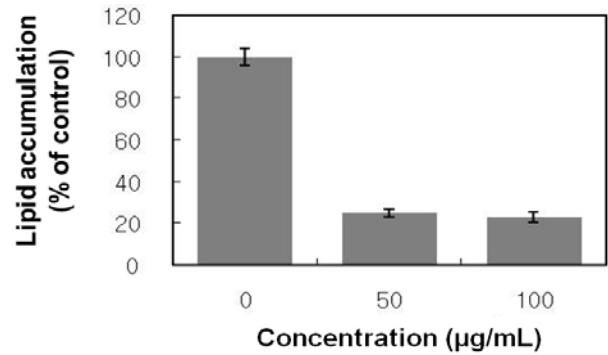


Figure 2. *Magnolia officinalis* extract inhibits lipid accumulation of 3T3-L1 cells.

3. 결과 및 고찰

3.1. 후박 추출물의 세포 생존율 평가

HaCaT세포와 3T3-L1 세포에 후박 추출물을 농도별로 처리한 후, 농도 증가에 따른 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 HaCaT 세포의 경우에는 최고 시료 처리 농도인 200 µg/mL에서 약 75 %의 세포 생존율을 보였으며, 3T3-L1 세포의 경우에는 최고 시료 처리 농도인 200 µg/mL에서도 92.2 %의 세포 생존율을 나타내었다. HaCaT 세포와 3T3-L1 세포에 10 ~ 100 µg/mL의 시료를 처리하였을 때, 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다(Figure 1).

3.2. 후박 추출물의 지방 축적 억제 효능 평가

지방 전구 세포에 MDI를 처리하여 분화를 유도하여 지방세포로 전환된 3T3-L1에 후박 열수 추출물을 농도별로 처리한 후 세포 내에 형성된 lipid droplet의 양을 간접적으로 측정하였다. Oil-Red-O 시약은 fat-soluble dye로, 지방 세포로 분화된 3T3-L1 세포에 세포의 생존율에 거의 영향을 미치지 않는 농도인 50, 100 µg/mL을 처리하여 세포 내에 형성된 lipids와 neutral TG를 Oil-Red-O 시약으로 염색하고 isopropanol로 회수한 후 흡광으로 확인한 결과, 후박 추출물 50 µg/mL에서 76 %, 100 µg/mL에서 78 %의 세포 내 지방 축적 억제 효능을 나타내었다(Figure 2). 이는 분화를 유도한 3T3-L1 세포에 후박 추출물을 처리하였을 때, 처리하지 않은 지방세포에 비해 lipid droplet의 크기가 작은 형태로 분산되어 존재하는 것을 현미경 상으로 관찰 할 수 있다(Figure 3).

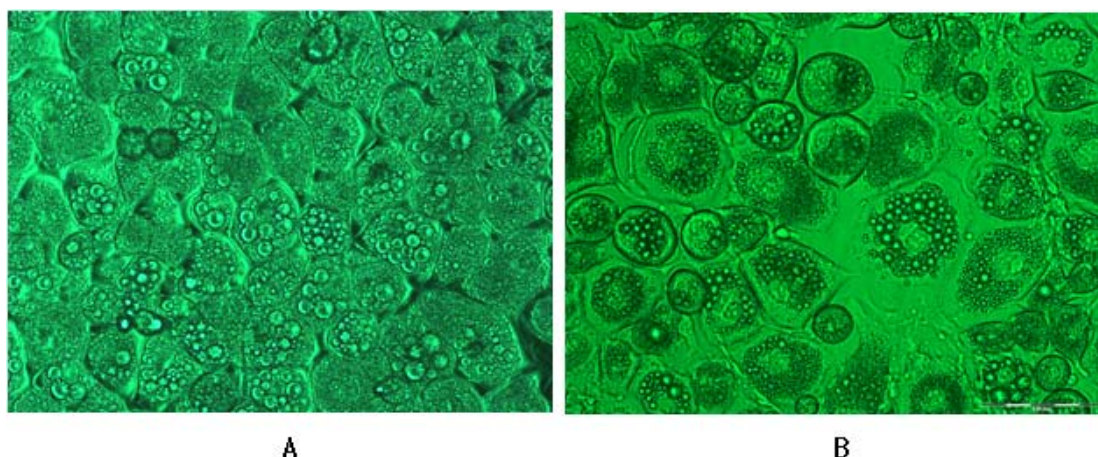


Figure 3. *Magnolia officinalis* extract reduces size of intracellular lipid droplet. A: control, B: *Magnolia officinalis* extract 100 µg/mL.

3.3. 후박 추출물의 세포 내 TG Contents 측정

지방 세포로 분화가 유도된 3T3-L1 세포 내에 생성된 TG contents 측정은 효소학적 측정법을 이용하였으며, 세포 내에 존재하는 lipoprotein lipase의 작용에 의하여 TG가 glycerol과 FFA로 분해되게 된다. 분해된 glycerol을 glycerol kinase (GK)와 glycerol phosphate oxidase (GPO), peroxidase 등의 효소 반응에 의해 최종적으로 생성된 quinoneimine dye를 흡광으로 확인하는 방법으로 후박 열수 추출물을 농도별로 처리하여 세포 내에 형성된 TG contents를 측정된 결과, 후박 열수 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포 내의 TG contents 수준이 감소하는 양상을 보였으며, 최고 시료 처리 농도인 100 µg/mL에서 control 대비 약 35 %의 TG contents 감소를 나타내었다(Figure 3).

3.4. PPAR-γ/HSL 단백질 발현 저해 효과

지방 세포로 분화가 유도된 3T3-L1 세포에서 지방 분화 촉진에 관여하는 요인으로 PPAR-γ와 HSL, C/EBP-α 등을 들 수 있다. 세포 내 TG contents의 감소와 지방 축적 억제 효능 평가 결과로 후박 열수 추출물은 세포 내 지방 생성을 억제하거나, 지방 세포로의 분화를 억제할 것으로 사료되어 관련된 단백질 발현과의 연관성을 확인하였다. 후박 열수 추출물을 농도별로 처리하여 PPAR-γ와 HSL의 단백질 발현을 확인한 결과, 후박 추출물의 농도가 증가함에 따라 HSL의 단백질 발현이 control과 대비하여 8배 증가하였으며, PPAR-γ의 경우에는, 후박 열수 추출물을 100 µg/mL 처리한 세포에서 PPAR-γ 단백질의 발현이 89 % 감소되는 결과를 나타냈다(Figure 4).

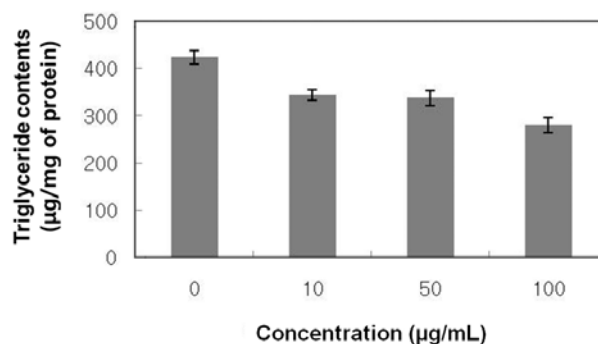


Figure 4. *Magnolia officinalis* extract inhibits intracellular TG contents of 3T3-L1 cells.

3.5. Leptin/PPAR-α/Lipoprotein Lipase mRNA 발현 저해 효과

후박 열수 추출물이 지방세포 분화에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 실험 결과 지방 세포로의 분화에 관여하는 유전자인 PPAR-α와 leptin, LPL의 발현이 분화 전의 지방 전구세포에 대비하여 발현이 증가하는 것으로 나타났으며, 후박 열수 추출물을 100 µg/mL로 처리한 세포에서는 분화 전의 지방 전구세포에서의 발현과 유사한 수준으로 나타나, 후박 열수 추출물을 처리하면 지방세포로의 분화와 관련된 유전자의 발현이 억제되어 지방 생성이 감소하는 것으로 사료된다(Figure 5).

4. 결 론

이와 같은 결과에서 후박 추출물의 3T3-L1 세포에 대

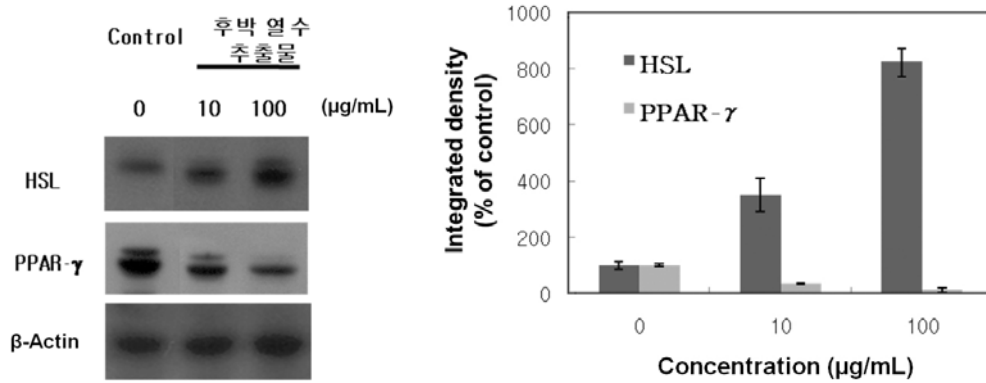


Figure 5. Effects of *Magnolia officinalis* extract on expression of HSL and PPAR- γ in 3T3-L1 cells. HSL: hormone sensitive lipase, PPAR- γ : peroxisome proliferator activated receptor- γ .

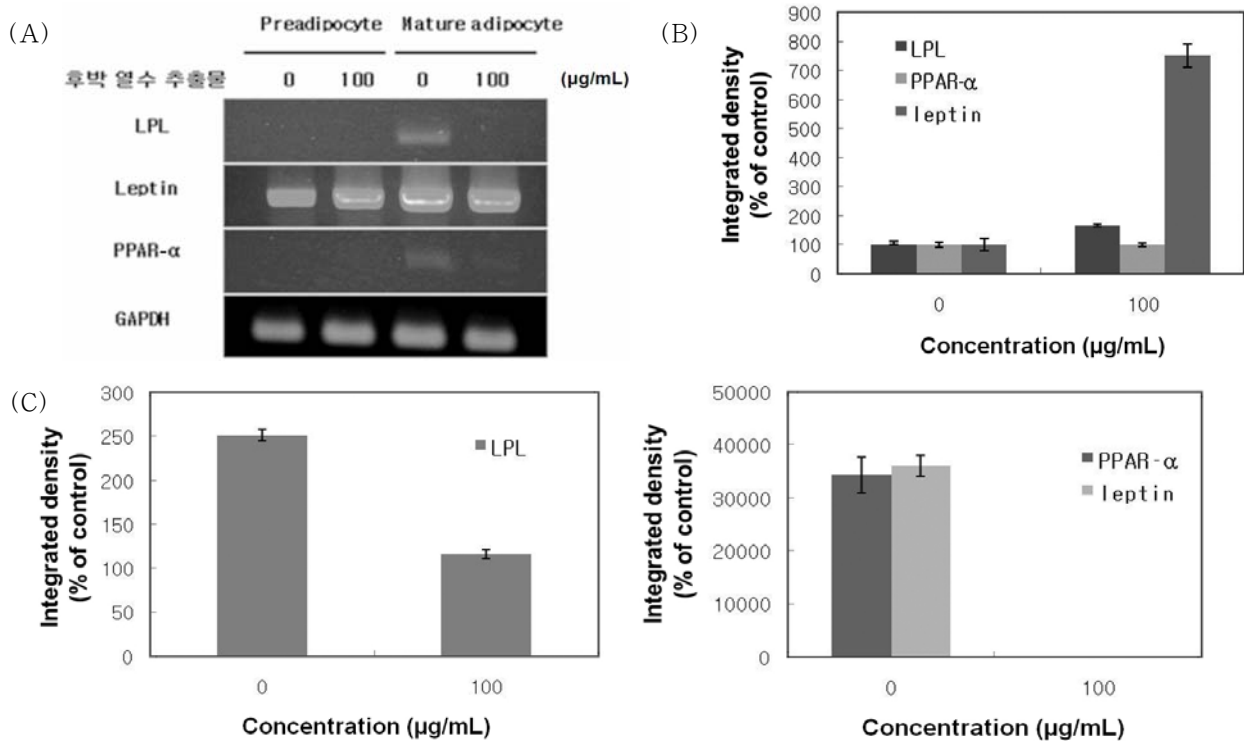


Figure 6. Effects of *Magonalia officinalis* extract on mRNA expression of LPL, leptin and PPAR- α in 3T3-L1 cells, A: mRNA expression level, B: preadipocyte, C: mature adipocyte.

한 효능은 지방 세포로의 분화에 관여된 유전자의 발현을 억제하여 분화를 억제하며, 분화가 일어나 세포 내에 생성되는 지방을 HSL 발현의 증가를 가져와 지방의 분해를 촉진하는 효능을 나타내는 것으로 판단된다. 따라서 후박 추출물의 지방 생성 억제 효능을 이용하여 새로운 천연 소재로의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. P. B. Snyder, J. M. Esselstyn, K. Loughney, S. L. Wolda, and V. A. Florio, The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in the regulation of adipocyte lipolysis, *J. Lipid Res.*, **46**, 494 (2005).
2. D. S. Gray, Diagnosis and prevalence of obesity,

- Med. Clin. North Am.*, **73**, 1 (1989).
3. G. Ailhaud, P. Grimaldi, and R. Negrel, Cellular and aspects of adipose tissue development, *Annu. Rev. Nutr.*, **12**, 207 (1992).
 4. F. M. Gregoire, C. M. Smas, and H. S. Sul, Understanding adipocyte differentiation, *Physiol. Rev.*, **78**, 783 (1998).
 5. X. Guo and L. Kan, Analysis gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation, *Gene.*, **251**, 45 (2000).
 6. Z. Cao, R. M. Umek, and S. L. McKnight, Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells, *Genes Dev.*, **5**(9), 1538 (1991).
 7. W. C. Yeh, Z. Cao, M. Classon, and S. L. McKnight, Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins, *Genes Dev.*, **9**(2), 168 (1995).
 8. Q. Q. Tang, M. S. Jiang, and M. D. Lane, Repressive effect of Sp1 on the C/EBP α gene promoter: role in adipocyte differentiation, *Mol. Cell. Biol.*, **19**(7), 4855 (1999).
 9. J. Y. Yang, M. A. Della Fera, S. Rayalam, and C. A. Baile, Enhanced effects of xanthohumol plus honokiol on apoptosis in 3T3-L1 adipocytes, *Obesity*, **16**(6), 1232 (2008).
 10. S. W. Choi, C. S. Kim, M. S. Choi, B. H. Kim, H. S. Kim, and D. S. Choi, The study for antioxidative effects of *Acanthopanax sessiliflorus* extract as a new cosmetics ingredients using electron paramagnetic resonance, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **31**(1), 73 (2005).
 11. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).