

3T3-L1 세포에 대한 쯤나무 추출물의 지방축적 억제효과

김세건 · 류동영¹ · 김도국 · 고다형 · 김윤경 · 이영미 · 정현주*
원광대학교 약학대학 한약학과 및 원광한약연구소, ¹목포대학교 한약자원학과

Inhibitory Effect of Heartwood of *Rhus verniciflua* Stokes on Lipid Accumulation in 3T3-L1 Cells

Se-Gun Kim, Dong-Young Rhyu¹, Do-Kuk Kim, Da-Hyung Ko, Yun-Kyung Kim,
Young-Mi Lee and Hyun-Ju Jung*

Department of Oriental Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University,
Sinyong-Dong, Iksan, 570-749, Korea

¹Department of Medicinal Plant Resources, Mokpo National University, 61 Dorim-ri, Chonggye-myon,
Muan-gun, Jeonnam 534-729, Korea

Abstract – The MeOH extract of *Rhus verniciflua* heartwood inhibited lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Chromatographic methods including of silica gel, RP-18 and high-pressure liquid chromatography isolated sulfuretin and fisetin from the extract as active constituents. The isolated compounds, especially sulfuretin, strongly inhibited lipid accumulation in adipocytes. The treatment of sulfuretin and fisetin led to decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ), as an important transcription factor in fat cell differentiation, which was equal to the decrease in the quercetin positive control. The presence of a hydroxyl group (C-5) in quercetin compared to fisetin, and the presence of C-2 double bonds in fisetin compared with fustin increased the inhibitory effect of lipid accumulation.

Key words – *Rhus verniciflua*, flavonoid, sulfuretin, adipocyte, PPAR γ

비만은 현재 인류에게 가장 위협적인 질병 중 하나로¹⁾ 급격한 속도로 증가하고 있으며, 공중보건에서도 중요한 질환으로 여겨지고 있다.²⁾ 비만은 과잉의 지방이 체내 축적되는 것을 뜻하며, 체질량지수 (BMI)가 25-29 kg/m²인 사람은 과체중, 30 kg/m²이상인 사람은 비만으로 정의 된다.³⁾ 또한 비만은 전구지방세포가 지방세포 (adipocyte)로 분화하는 지방세포의 이상발달이라고도 하며 이러한 지방세포에 대한 지방의 축적은 지방세포 수의 증가나 지방세포 크기가 증가됨에 따라 증상이 심해지는 것으로 알려져 있다. 인체에 지방을 축적하는 세포는 hepatocyte (단기 축적)와 adipocyte (장기 축적)로 알려져 있으나 비만과 관련이 있는 것은 주로 adipocyte로 알려져 있다. adipocyte는 preadipocyte 상태로 존재하다가 적절한 환경하에서 분화되어 adipocyte가 되어 세포 내 지방을 축적하는데 adipocyte의 크기 또는 수적

증가가 비만의 정도를 결정짓는 하나의 요인으로 간주되고 있다. 따라서 preadipocyte의 분열 및 adipocyte의 생성을 억제하는 물질은 비만을 예방하거나 치료할 수 있을 것으로 생각 되어지고 있다. 비만과 관련된 질환은 당뇨병, 심혈관 질환 및 이상지질혈증 등이 보고 되어 있다.⁴⁻⁵⁾

현재 폴리페놀성 화합물을 포함한 식이성 항산화제들은 암, 심장질환, 죽상동맥경화증 등과 같이 산화적 스트레스와 관련된 질병에 예방효과를 가지고 있으며, 특히 폴리페놀성 화합물인 플라보노이드는 항바이러스, 항염, 항암효과를 포함한 많은 질병과,⁶⁻⁷⁾ 지질과산화, 혈소판 응집, 모세관 투과성과 리포옥시게네이스 (lipoxygenase)를 포함하는 효소계의 활동을 크게 억제한다고 보고되어 있다.⁸⁾

참쯤나무(*Rhus verniciflua* Stokes, Anacardiaceae)는 낙엽 교목으로서 높이가 20 m에 달하며 수피는 혈액순환약 및 통경의 목적으로 사용되었다.⁹⁻¹⁰⁾ 수피의 활성성분인 urushiol은 강력한 항암효과 및 항산화효과가 알려져 있지만, 단백질과 비특이적인 결합 및 피부 알러지를 발생시키는 문제

*교신저자(E-mail): hyun104@wku.ac.kr
(Tel): +82-63-850-6814

점을 가지고 있어서 의약품으로 개발하기에는 문제점을 가지고 있다. 하지만 수피를 제거한 심재부분에는 Urushiol이 존재하지 않고, 주성분으로는 플라보노이드 계열의 물질들이 항산화 및 항류마티스 활성이 나타나는 것으로 보고 되어 있다.¹¹⁾

본 연구에서는 옷나무 심재의 메탄올 추출물이 3T3-L1 preadipocyte의 분화 및 지방축적을 억제하므로 그 활성 물질을 분리 동정 하였으며 그 작용기전을 추정할 목적으로 지방세포의 분화를 촉진하는 PPAR γ 의 발현정도를 측정하였다.

재료 및 방법

식물재료 - 실험에 사용한 옷나무 심재는 충청북도 제천에 소재한 황금들녘나라에서 구입하여 원광대학교 약학대학 한약학과 권동렬 교수가 동정한 후 사용하였다.

기기 및 시약 - $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) spectra는 JEOL Eclipse 500 FT-NMR spectrometer으로 측정하였고, silica gel과 TLC plate는 Merck사의 것을 사용하였으며, RP-18 gel은 YMC사의 제품을 사용하였다. 세포실험에 사용한 시약인 dexamethasone, 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Oil red-O 및 insulin은 Sigma사 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), trypsin-EDTA, fetal bovine serum (FBS), bovine calf serum (BCS)는 Hyclone사의 제품을 사용하였다.

추출 및 분획 - 수피를 벗기고 음건한 참옷나무 목질부 10 kg을 MeOH로 3회 환류추출하고, 이를 감압농축하여 MeOH ex. 380 g을 얻었다. 이 중 MeOH ex. 322 g을 3차 증류수에 현탁 시킨 다음 계통분획법에 의하여 chloroform (31 g), ethyl acetate (251 g), butanol (16 g), H₂O (24 g)으로 분획하였다.

화합물의 분리 및 정제 - Ethyl acetate fraction(100 g)을 silica gel 744 g을 충전시킨 내경 10 cm의 컬럼에서 CHCl₃ : MeOH : H₂O = 8 : 2 : 1 (하층)의 이동상으로 전개하였다. 용출된 시료는 250 ml씩 소분획하고, thin layer chromatography를 실시하여 분획들을 유사한 그룹으로 합쳐 용출된 순서대로 RVSE-1, RVSE-2, RVSE-3, RVSE-4, RVSE-5의 소분획으로 나누고, 소분획 RVSE-1을 octadecylsilane (ODS) column chromatography (MeOH : H₂O = 55 : 45)를 실시하여 순수한 백색의 화합물 1, 149 mg을 분리하였다. 위에서 얻어진 소분획 RVSE-2를 ODS column chromatography (MeOH : H₂O = 60 : 40)를 실시하고 HPLC로 정제하여 순수한 황색의 화합물 2, 66 mg을 분리하였다.

소분획 RVSE-3을 ODS column chromatography (MeOH : H₂O = 60 : 40)를 실시한 것으로부터는 순수한 오렌지색

의 화합물 3, 158 mg을 분리하였다.

화합물 1 - White amorphous powder, $^1\text{H-NMR}$ (CD₃OD, 500 MHz) δ : 4.47 (1H, d, J = 11.9 Hz, H-3), 4.93 (1H, d, J = 11.9 Hz, H-2), 6.32 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 6.52 (1H, dd, J = 2.3, 8.7 Hz, H-6), 6.80 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5'), 6.85 (1H, dd, J = 1.8, 8.3 Hz, H-6'), 6.98 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 7.71 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5), $^{13}\text{C-NMR}$ (CD₃OD, 125 MHz) δ : 84.3 (C-2), 73.2 (C-3), 193.1 (C-4), 128.8 (C-5), 110.8 (C-6), 163.8 (C-7), 112.1 (C-8), 165.6 (C-9), 102.4 (C-10), 128.8 (C-1'), 114.6 (C-2'), 145.0 (C-3'), 145.8 (C-4'), 114.7 (C-5'), 120.0 (C-6').

화합물 2 - Yellow amorphous powder, $^1\text{H-NMR}$ (CD₃OD, 500 MHz) δ : 6.89 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5'), 6.90 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 6.90 (1H, dd, J = 2.3, 9.6 Hz, H-6), 7.66 (1H, dd, J = 1.8, 8.7 Hz, H-6'), 7.76 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 7.97 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD₃OD, 125 MHz) δ : 146.2 (C-2), 137.2 (C-3), 173.1 (C-4), 126.2 (C-5), 114.7 (C-6), 162.9 (C-7), 101.6 (C-8), 157.2 (C-9), 114.1 (C-10), 123.0 (C-1'), 114.9 (C-2'), 144.9 (C-3'), 147.3 (C-4'), 114.7 (C-5'), 120.3 (C-6').

화합물 3 - Orange amorphous powder, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 6.64 (1H, s, H-2), 6.70 (1H, dd, J = 1.9, 8.7 Hz, H-6), 6.74 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-8), 6.83 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 7.24 (1H, dd, J = 1.9, 8.2 Hz, H-6'), 7.44 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2'), 7.60 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 112.3 (C-2), 146.2 (C-3), 148.6 (C-4), 126.3 (C-5), 125.1 (C-6), 168.0 (C-7), 98.9 (C-8), 166.7 (C-9), 113.8 (C-10), 123.9 (C-1'), 118.5 (C-2'), 146.1 (C-3'), 148.6 (C-4'), 116.6 (C-5'), 125.1 (C-6').

세포배양 - 활성실험에 사용한 3T3-L1 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)에서 구입하여, 인큐베이터 (37°C, 5% CO₂)에서 10% BCS가 포함된 DMEM배지를 사용하여 배양하였다. 3T3-L1 세포를 지방세포로 분화시키기 위하여 4일동안 10% BCS를 사용하였고, 분화 시작점에는 10% FBS 배지 내에 1 μM dexamethasone, 0.5 nM IBMX, 10 $\mu\text{g/ml}$ insulin을 넣어주고, 분화 시작점으로부터 2일 후에 10 $\mu\text{g/ml}$ insulin인 포함된 10% FBS로 갈아주고, 4일 후와 6일 후에는 10% FBS배지로 갈아주었다. 샘플처리는 분화시작일과 2일째, 4일째 되던 날 3회 처리해 주었고, 8일째 되던 날 Oil red O로 염색하여 세포내 지방을 확인하였다.

Oil red O 염색 - 분화시작일로부터 8일째 되던 날 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 상온에서 30분 동안 10%

포르말린으로 세포를 고정하고, Oil red O로 염색시킨 후 60% isopropanol로 세척하고 세포내의 지방은 Olympus (Tokyo, Japan) 현미경을 이용하여 사진촬영 하였다. 염색된 지방들은 isopropanol에 녹여 96 well plate에 옮긴 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot 분석 - 실험이 종료된 세포를 PBS 용액으로 1회 세척한 후 lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.0, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.2 mM PMSF, 1 µg/µl aprotinin, 20 µg/µl leupeptin, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate)를 넣고 얼음 위에서 10분간 용해시킨다. 세포를 수거하여 13,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층액만 취하여 단백질을 정량하였다. Lysate는 loading buffer (1 M Tris, 50% glycerol, 10% SDS, 2-mercaptoethanol, 1% bromophenol blue)와 혼합하여 95°C에서 10분간 가열시킨 후, 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 한 후 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 그 후 membrane은 5% 무지방분유가 첨가된 TTBS (1 M Tris, 5 M NaCl, tween 20) 용액에 넣고 상온에서 1시간 동안 blocking 시킨다. TTBS 용액으로 3회 (각각 10분씩) 세척한 후 일차항체 (PPAR_γ 1 : 250)로 2시간 동안 반응시킨 다음에 다시 TTBS 용액으로 3회 (각각 7분씩) 세척한다. 그 다음에 peroxidase가 포함된 이차항체 (goat anti mouse 1 : 2000)로 1시간 동안 반응시켰고 항체의 검출은 enhanced chemiluminescence 시약을 이용하여 가시화하였고 UVP (Image acquisition and analysis software, Visionwork TMLS)로 정량하였다.

통계처리 - 실험결과는 SPSS ver. 11.5의 one-way ANOVA 분석을 통하여 수행하였고, 각 처리군간의 유의성 검정은 Duncan's multiple test에 의하여 p<0.05에서 실시하였다.

결과 및 고찰

옻나무 심재는 항산화 활성이 우수한 flavonoid 성분이 다량 함유되어 있으며 피부 알러지 반응으로 의약품 개발을 저해 시키는 urushiol 성분이 거의 존재하지 않는다고 보고되어 왔다.¹¹⁾ 특히, 옻나무 심재의 메탄올 추출물은 3T3-L1 cell을 지방세포로 유도하여도 cell내 지방축적이 억제되는 항비만 활성을 나타내므로 활성성분을 규명하기 위하여 물질분리를 시도하였다. 옻나무 MeOH 추출물을 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 잔류물로 분획할 때, 주성분 및 활성이 에틸아세테이트 층에 집중되었기에 에틸아세테이트 분획물에 대한 물질 분리를 반복적으로 실시하였다. 물질분리는 silica gel 및 ODS column chromatography와 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하였으며, 그 결과 3종의 flavonoids를 분리할 수 있었다. 분

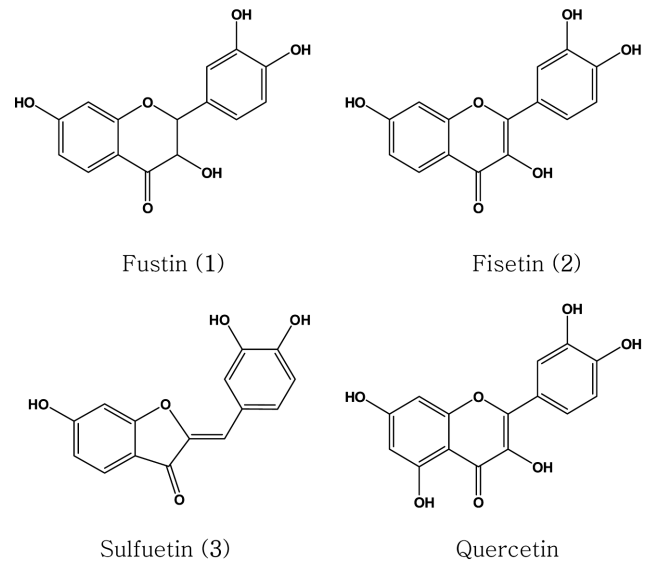


Fig. 1. The structures of the isolated compounds from the heartwood of *R. verniciflua*.

리한 물질은 MP., IR, UV, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR을 측정하여 문헌과 비교한 결과 화합물 1은 dihydroflavonol인 fustin,¹²⁾ 화합물 2는 flavonol계열의 fisetin,¹³⁾ 화합물 3은 aurone 계열의 sulfuretin인 것으로 확인 되었다 (Fig. 1).¹⁴⁾ Fustin과 fisetin은 C-2에 이중결합의 유무만이 차이가 있었고, fisetin은 3T3-L1 cell에 지방분해능이 있다고 보고 되어진 quercetin과 비교할 때¹⁵⁾ C-5 위치에 -OH기 만이 없는 화합물이었다.

3T3-L1 cell을 이용하여 분리된 화합물의 지방생성 억제 활성을 실험한 결과는 Fig. 2와 같이 관찰되었다. 화합물의 농도는 박희준 등이¹⁶⁾ HL-60, HepG2, Primary hepatocyte 등의 cell에 IC₅₀가 300 µM 이상이라 보고한 것을 참고로 3T3-L1 cell에 세포독성이 관찰되지 않는 20 µM의 안전한 농도를 사용하였으며 quercetin을 positive control로 하여 실험하였다. 그 결과 fustin은 활성이 관찰되지 않았으며 fisetin은 negative control에 비하여 약 40% 정도 지방 생성이 감소하였음을 알 수 있었다. 이것은 fustin과 fisetin의 구조적 차이점이 이중결합의 유무에만 있으므로 C-2의 이중결합은 adipocyte의 지방 축적능에 중요한 구조 부분임을 확인할 수 있었다. Fisetin은 positive control로 사용한 quercetin의 구조 중 C-5의 -OH기가 없는 구조로 이러한 구조적 차이는 adipocyte의 생성에도 영향을 미쳐 지방축적 억제 효과를 약 10% 정도 감소시키는 것으로 관찰되었다.

Aurone 계열의 sulfuretin은 분리한 화합물 중 3T3-L1 cell에 지방 축적을 가장 강하게 억제시켰으며, 활성의 크기는 positive control인 quercetin과 동일 정도인 약 50% 정도인 것으로 확인되었다.

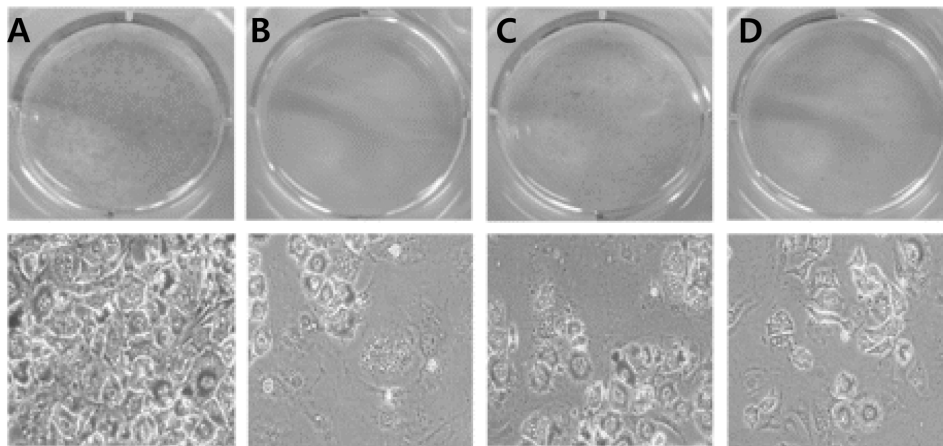


Fig. 2. The effects of the isolated compounds on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Media was removed and washed with PBS. Cells were fixed with 10% formalin and incubated 30 min at room temperature. After incubation, lipid droplets stained with Oil red O for 1 h and washed wells with 60% isopropanol. Stained lipid droplets took pictures with Olympus (Tokyo, Japan) microscope. (A) negative control, (B) positive control (quercetin 20 μ M), (C) fisetin 20 μ M, (D) sulfuretin 20 μ M.

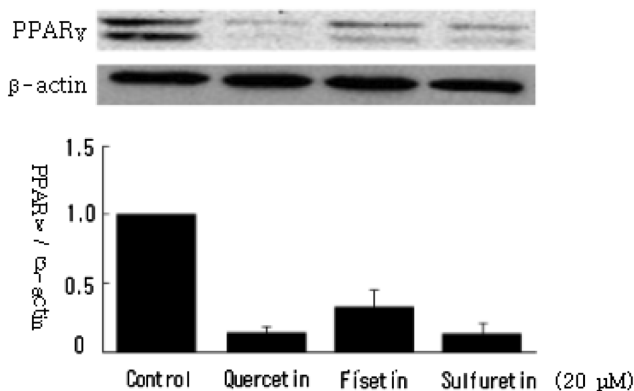


Fig. 3. Effects of fisetin and sulfuretin on expression of PPAR γ in adipocytes. Total protein after lysis were isolated by 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane, blocked for 1 h at room temperature in 5% skim milk. Anti-PPAR γ antibody were added to 1% BSA in PBS-T and incubated with the membrane for 1 h at ambient temperature. The membranes were washed three times for 7 min each in TBST and then incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. The membranes were developed with an enhanced chemiluminescence detection system. Prepared cell lysates were subjected to western blot analysis to detect the expression of key transcription factor in fat cell. Statistical significance: $p < 0.05$.

지방조직에서 주로 나타나는 PPAR γ 는 발현이 증가할수록 세포의 인슐린에 대한 감수성 및 전구지방세포에서 지방세포로 분화를 크게 증가시키는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁻¹⁸⁾ 지방세포생성의 key regulator로 알려진 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor)의 발현에 대한 분리한 화합물의 작용을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 전구지방세포에서

지방세포로 분화억제 활성을 나타낸 fisetin과 sulfuretin에 대한 실험결과, fisetin은 대조군과 비교하여 PPAR γ 의 발현을 약 50% 감소시켰으며 sulfuretin은 약 75% 정도 매우 강하게 억제 시키는 것으로 관찰되었다. 이것은 앞에서 관찰된 3T3-L1 cell의 지방생성능 억제 효과가 PPAR γ 의 발현과 크게 연관되어 있음을 나타내고 있다고 생각되어 졌다. 이상의 결과로부터 율나무 심재로부터 3T3-L1 cell이 adipocyte로 분화 되는 것을 억제 시키는 물질로 fisetin과 sulfuretin이 분리 되었으며 이는 PPAR γ 의 발현이 억제되어 나타나는 결과로 추정되었다.

사 사

본 연구는 사단법인 진안군친환경홍삼한방산업클러스터 사업단의 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Bray, G. A. (2006) Obesity: The disease. *J. Med. Chem.* **49**: 4001-4007.
2. Friedman, J. M. (2000) Obesity in the new millennium. *Nature* **404**: 632-634.
3. Scott, M. and Grundy (2004) Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocr. Metab.* **89**: 2595-2600.
4. Kopelman, P. G. (2000) Obesity as a medical problem. *Nature* **404**: 635-643.
5. Spiegelman, B. M. and Flier, J. S. (1996) Adipogenesis and Obesity: Rounding Out the Big Picture. *Cell* **87**: 377-389.
6. Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources,

- metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**: 317-333.
7. Hertog, M. G and Hollman, P. C. (1996) Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur. J. Clin. Nutr.* **50**: 63-71.
 8. Aherne, S. A. and O'Brien, N. M. (1999) Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells. *Nutr. Cancer* **34**: 160-166.
 9. 이창복 (2003) 대한식물도감. p. 687. 향문사, 서울.
 10. 김만조, 김갑태, 최태봉, 현정오 (1998) 기상요인과 채취시기가 옻나무 칠액채취량 및 칠액의 질에 미치는 영향. *한국자원식물학회지* **11**: 70-79.
 11. Choi, J. W., Yoon, B. J., Huh, K., Park, K. U., Lee, K. T. and Park, H. J. (2002) Anti-rheumatoid effect of sulfuretin isolated from the heartwood of *Rhus verniciflua* in rats and Mice. *Nutraceuticals & Food* **7**: 347-352.
 12. Anees, A. A. (2008) ¹H NMR, spectroscopic and molecular modeling studies on paramagnetic lanthanide(III)-quercetin complexes. *Main Group Chemistry* **7**: 15-30.
 13. Yoshioka, T., Inokuchi, T., Fujioka, S. and Kimura, Y. (2004) Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. *Z. Naturforsch.* **59**: 509-514.
 14. V. Ju'nior, G. M., De M. Sousa C. M., J. Cavalheiro, A., G. Lago, J. H. and H. Chaves, M. (2008) Phenolic derivatives from fruits of *Dipteryx lacunifera* Ducke and evaluation of their antiradical activities. *Helvetica Chimica Acta* **91**: 2159-2167.
 15. Ahn, J. Y., Lee, H. J., Kim, S. N., Park, J. H. and Ha, T. Y. (2008) The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**: 545-549.
 16. Park, H. J., Kwon, S. H., Kim, G. T., Lee, K. T., Choi, J. H., Choi, J. and Park, K. Y. (2000) Phsicochemical and biological characteristics of flavonoids isolated from the heartwoods of *Rhus verniciflua*. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**: 345-350.
 17. Rosen, E. D. (2005) The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**: 31-34.
 18. Evans, R. M., Barish, G. D. and Wang, Y. X. (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* **10**: 355-361.

(2010년 1월 23일 접수)