大韓本草學會誌 제28권 제1호(2013년 1월)
Kor. J. Herbology 2013 ; 28(1) : 23-31

ISSN 1229-1765
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2013.28.1.23.

白茅根 靑皮 吳茱萸 複合方(YY312)의 고지방식이로 유도된 마우스와 3T3-L1 세포에서 항비만 효과

강인숙[1#], 황근영[1], 최아영[1], 노국환[1], 최지현[1], 심여문[3], 박유경[2], 오명숙[3*]

1 : 경희대학교 의과대학 생화학분자생물학교실, 2 : 경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과,
3 : 경희대학교 약학대학 한약학과

Anti-obesity effects of herbal extract YY312 in C57BL/6 mice fed a high-fat diet and 3T3-L1 cells

Insug Kang[1#], Keun-Young Hwang[1], A-Young Choi[1], Kughwan Roh[1], Ji Hyun Choi[1], Yeomoon Sim[3], Yoo Kyoung Park[2], Myung Sook Oh[3*]

1 : Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Kyung Hee University,
2 : Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University,
3 : Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to determine the anti-obesity effect and molecular mechanism of YY312, a herbal extract composed of Imperatae Rhizoma, Citri Unshius Pericarpium Immaturus, and Evodiae Fructus, on a high-fat diet-induced animal model and on 3T3-L1 cells.

Methods : C57BL/6 mice were fed for 6 weeks with a normal diet or a high-fat diet (HFD). Then they orally administered daily with 300 mg/kg YY312 for next 10 weeks. Body weight and food consumption were recorded weekly and daily, respectively. Tissue weights, serum lipid, and glucose levels were analyzed at the end of the study. Additionally, the effects of YY312 on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells were examined. After differentiating 3T3-L1 cells were treated with YY312, Oil-red O staining, RT-PCR, and Western blotting were performed for lipid accumulation, mRNA expression of adipogenesis gene, and AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation, respectively.

Results : YY312-administered mice showed a significant reduction of body weights and abdominal adipose tissue weights. YY312 also reduced the serum levels of triglycerides and total cholesterol, compared with the HFD group. Treatment with YY312 inhibited lipid accumulation and blocked expression of adipogenic transcription factors and lipogenesis genes, including peroxisome proliferator-activated receptor γ , CCAT/enhancer binding protein α and fatty acid synthase. YY312 increased AMPK phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes.

Conclusions : This study showed that herbal extract YY312 has an anti-obesity effect *in vitro* and *in vivo*. Thus, YY312 could be developed as a supplement for reduction of body weight gain induced by an HFD.

Key words : YY312, high-fat diet, obesity, C57/BL6 mice, body weight, 3T3-L1 adipocyte differentiation

서 론

비만은 선진국과 개발도상국에서 건강을 위협하는 중요 질병의 하나로 체내 지방의 축적량이 과다한 경우를 말한다[1,2].

* 교신저자 : 오명숙. 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 약학대학 한약학과 본초학교실
· Tel : 02-961-9346 · E-mail : msohok@khu.ac.kr
제1저자 : 강인숙. 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 의과대학 생화학분자생물학교실
· Tel : 02-961-0922 · E-mail : iskang@khu.ac.kr
· 접수 : 2012년 12월 9일 · 수정 : 2013년 1월 9일 · 채택 : 2013년 1월 12일

비만은 특히 고혈압, 심혈관질환, 당뇨병 같은 대사질환과 일부 암 등의 유병율과 밀접한 상관관계가 있고 비만으로 야기되는 재정적 부담과 인명적 손실은 막강하다[3,4]. 비만은 복잡하고 다양한 요인들의 상호 복합적인 작용에 의해 발생하지만 과다한 에너지 섭취와 부족한 신체활동 생활습관에 의한 낮은 에너지 소비가 가장 큰 원인으로 제시되고 있다[5,6]. 따라서 비만의 예방 및 치료를 위해서는 식이를 조절할 것을 권장해 왔으나 단순한 열량섭취 제한은 체지방뿐만 아니라 체단백질의 손실을 가져올 수 있으므로 효과적으로 비만을 예방 치료할 수 있는 약물이나 음식에 관심이 집중되고 있다[7].

비만 치료 약물의 타깃은 다양하며 만성비만 치료제로 임상에서 사용되는 sibutramine(Reductil)은 세로토닌 재흡수 억제제로 식욕을 감소시키며 orlistat(Xenical)는 소장에서 지질분해를 억제하여 지방 흡수를 감소시키는 작용으로 항비만 효과를 나타낸다[8]. 하지만 이러한 비만 치료제는 체중감소의 효과에도 불구하고 부작용의 사례들이 보고되어 사용이 제한되고 있다[9]. 특히, sibutramin은 심혈관질환 위험성 때문에 미국, 유럽 및 국내에서 판매가 금지되었다. 따라서 독성이 적으면서 체중감소에 효과적인 한약을 이용한 비만 치료 약물 개발에 관심이 높아지고 있다[10,11].

고대 한의학 문헌에서는 비만이 肥, 肥胖, 肥人, 肉人, 肥貴人 등으로 표현되어 왔다[12]. 비만의 원인에 대하여 고찰해 보면 〈皇帝內經素門〉에 '數食甘味' '膏粱之疾'이라 하고, 〈皇帝內經靈樞〉에 '探於取與'라고 쓰여 있으며, 朱는 '氣虛生寒 寒生濕', 劉는 '血實氣虛', 張은 '多氣虛之證 然肥人多濕多滯', 陳은 '多痰乃 氣虛', 李는 '氣結而 肺盛肺金克肝木 故痰盛', 傅은 '痰涎甚多 乃脾土之內病也'라 하였으니, 이것을 종합해 보면 비만의 원인은 주로 氣虛, 濕, 痰이라는 것을 알 수 있다[13]. 따라서 비위 기능의 실조로 인한 氣虛로 생성된 濕, 痰, 瘀 등의 병리적 산물이 기부나 복막, 장부 등에 유체되어 생성된 비만은 補氣健脾, 溫陽, 補血養陰, 祛濕利水, 淸積熱, 消導, 化痰, 活血化瘀 방법으로 치료할 수 있다[14].

白茅根은 벼과(Gramineae)의 다년생 초본인 띠(*Imperata cylindrica* Beauvois var. *koenigii* Durand et Schinz ex A. Camus)의 뿌리줄기로, 甘, 寒의 性味로 心, 肺, 胃經에 작용하여 淸熱하고 凉血生津하며 또한 膀胱經에 작용하여 利尿와 동시에 導熱下行하는 약초로 알려져 있다[15]. 백모근 추출물 혹은 백모근에서 분리된 생리활성물질은 신경보호, 간보호 효과가 있는 것으로 보고되었다[16-18]. 靑皮는 운향과(Rutaceae)의 귤나무(*Citrus unshiu* Markovich 또는 *Citrus reticulata* Blanco)의 덜 익은 열매껍질로, 性味가 苦辛, 溫하고 氣는 峻烈하여 沈降下行하므로 疏肝破氣, 散結消堅, 止痛, 消積化滯하는 효능이 있다고 알려져 있다. 약리작용으로는 소화촉진, 거담, 이담, 혈압상승, 장관평활근 억제, 기관지수축 길항작용 등이 있다[15]. 또한, 청피 추출물은 항염증, 항산화작용을 나타내는 것으로 보고되었다[19-21]. 吳茱萸는 운향과(Rutaceae)의 오수유(吳茱萸) *Evodia rutaecarpa* Bentham, 석호(石虎) *Evodia rutaecarpa* Bentham var. *officinalis* Huang 또는 소모오수유(疎毛吳茱萸) *Evodia rutaecarpa* Bentham var. *bodinieri* Huang의 열매로, 苦, 辛味로 辛散, 苦降하고 性이 大熱燥烈하여 疏肝下氣에 뛰어나 溫中祛寒하고 降逆止嘔하며 疏肝解鬱, 行氣燥濕하는 약초로 알려져 있다. 오수유는 건위 · 구충 · 해독 및 이뇨제로 사용하며 진통, 강압, 기관지확장, 중추신경계흥분, 체온상승, 자궁수축작용이 있으며[15], 오수유 추출물은 신경보호, 위보호, 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었다[22-24].

白茅根, 靑皮, 吳茱萸의 항비만 효과에 대해 이전에 연구된 바로는 白茅根은 보고된 유사한 연구 결과가 없고, 靑皮의 생리활성물질인 carotenoid β -cryptoxanthin의 복부 지방세포 비대 억제를 통한 항비만 효과[25] 및 吳茱萸의 주요 알칼로이드인 evodiamine의 vanilloid receptor agonist 작용을 통한 capsaicin과 유사한 항비만 효과[26] 외 대사질환에 대한 효과는 알려진 바가 거의 없다.

본 연구에서는 비만유도 동물 모델과 3T3-L1 지방세포분화 모델에서 白茅根, 靑皮, 吳茱萸 복합추출물인 YY312의 항비만 효과를 조사하였다. 고지방식이를 투여하여 비만을 유도하는 동물모델에서 YY312를 매일 경구 투여하여 체중 증가에 미치는 효과를 조사하였다. 또한, YY312가 고지방식이 동물모델의 지방 축적과 혈장 내 지방과 당에 미치는 효능을 조사하고자 YY312를 경구 투여한 고지방식이 쥐의 체지방 축적 및 혈장 내 중성지방(triglycerides), 콜레스테롤(cholesterol), 혈당(blood glucose), HDL-콜레스테롤 양에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 YY312의 작용기전을 이해하기 위해 3T3-L1 세포의 지방세포분화에 대한 효과와 마우스 지방조직과 3T3-L1세포에서 AMP-activated protein kinase(AMPK) 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 시료(YY-312)는 유유 중앙연구소(Suwon, Korea)에서 제조한 것을 제공받아 사용하였다. 白茅根(중국), 靑皮(제주), 吳茱萸(중국) 각 약재를 각각 8배수의 70% 에탄올에 넣고 4시간동안 2번 환류추출한 뒤 여과(300 mesh) 하였다. 여과액을 혼합하고 감압농축, 동결 건조하였고, 수득율은 각각 30%, 27%, 37%였고, 개별 추출분말을 백모근 50%, 청피 20%, 오수유 30% 함량으로 혼합하여 매 실험 시 용매(증류수)에 녹여 사용하였다.

2) 시약

세포배양에 필요한 Dulbeco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal calf serum(FCS), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(P/S)은 Life Technologies사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. 혈장내 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 혈당은 효소반응을 이용하는 아산제약(Seoul, Korea) 키트를 구입하여 사용하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO), MTT, 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX), Dexamethasone (DEX), insulin, Oil-red O 은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Phospho-AMPK(Thr172), Phospho-acetyl-CoA carboxylase(ACC)(Ser79), β -actin 항체는 Cell Signaling Technology사(Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용

하였다.

2. 방법

1) 동물실험 사육 및 식이

실험동물은 20-25g의 6주령 C57BL/6 마우스를 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 동물실에서 자유로이 먹이와 물을 섭취하게 하고 일주일 후에 다음과 같이 4군(군당 10마리)으로 나누어 6주 동안 정상일반식이(Normal Diet, ND)와 45% 고지방식이(High-Fat Diet, HFD)를 주었다. 6주 후 마우스를 무게에 따라 다시 sorting하여 HFD의 경우 평균 36-37g이 되도록 케이지에 5마리씩 넣고 한 그룹에 케이지 2개 (10마리씩)로 나누어 본 실험을 착수하였다. YY312를 정수된 물에 녹여 300 mg/kg 용량으로 매일 일정한 시간에 경구로 10 주간 투여하며 마우스의 체중변화와 섭취량을 관찰하였다. 양성대조군으로 사용하는 sibutramine은 5 mg/kg 용량으로 YY312처럼 경구투여하였다. 정상식이와 45% 고지방식이는 피드랩(Hanam, Korea)에서 구입하였다. 정상식이 AIN-93G는 10% 지방 칼로리를 포함하며 고지방식이는 45% 지방 칼로리를 포함하였다. 식이의 탄수화물 급원으로는 옥수수전분, 단백질 급원으로는 casein, 지방 급원으로는 라드 및 대두유를 사용하였다. 무기질과 비타민은 AIN-93G diet 구성에 따라 혼합한 것을 식이에 섞었다. 체중은 주 1회 2시간 절식 후 같은 시각에 측정하였으며, 식이섭취량은 매일 일정시간에 측정한 후 급여량에서 잔량을 감하여 계산하였다. 실험기간동안 음수는 멸균 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였고 YY312와 sibutramine은 매일 같은 시간에 경구투여하였다. 동물실의 온도는 24 ± 2℃, 습도는 55 ± 5%를 유지하였으며 매일 광주기와 암 주기를 12 시간이 되도록 조절하였다. 실험기간 동안 매일 일정시간에 식이 잔량을 측정하여 일일 식이섭취량을 산정하였으며, 체중은 1 주일에 두 번씩 일정한 시간에 측정하였다. 실험 프로토콜은 경희대학교 동물실험윤리 위원회에 승인을 받고 진행하였다.

2) 시료채취 및 혈액지표 분석

10주간의 실험기간이 종료된 동물들은 밤 동안(12시간) 절식 후 에테르를 흡입시켜 마취시킨 후 희생하였다. 실험동물의 각 장기조직은 채혈 후 즉시 적출하여 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 세척한 후 표면의 습기를 제거하고 무게를 측정하였다. 무게측정 후 -80℃ deep freezer에 보관하여 차후 분석실험에 사용하였다. 혈액 지표 분석을 위하여 쥐의 안와정맥에서 채취한 전혈을 1,500 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 아산 셋트 중성지방, 포도당(혈당), 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤을 구입하여 ELISA reader로 측정하였다.

3) 세포배양

(1) 3T3-L1 세포 배양 및 분화유도

3T3-L1 preadipocytes를 10% calf serum과 1%(v/v) P/S을 함유한 DMEM을 사용하여 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 세포가 100% confluent한 2일 후, 10% FBS과 0.5 mM IBMX, 1 μM DEX, 10 μg/mL insulin을 혼합한 분화유도 DMEM으로 교환하여 분화유도를 시작하였다. 분화유도 2일 후, 배지를 insulin(10 μg/mL)이 포함된 DMEM 으로 교환하였고, 이후 2일 동안 매일 10% FBS/DMEM 배지로 교환하여 주었다. 8일후에 분화가 거의 완성되었다. YY312는 처음 분화유도 DMEM을 교환할 때 세포에 첨가하였고 2일에 한 번씩 세포에 처리하였다.

(2) Oil-red O staining

YY312가 3T3-L1 지방세포의 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 Oil-red O staining을 수행하였다. 세포배양 및 분화유도 중에 따라 YY312를 다른 농도(0, 50, 100 μg/mL)로 처리하였다. 8일 후 배양액을 제거하고 PBS용액으로 2회 세척한 뒤 10% formalin을 넣고 1시간동안 상온에서 세포를 고정시켰다. 세포를 PBS로 두 번 세척한 뒤에 지방구를 0.6% Oil-red O 용액으로 염색하였다. 염색 후 60% isopropanol과 증류수로 세척하고 염색된 지방구를 역전사 현미경으로 사진을 찍었다.

(3) 세포 생존율 측정

96 well plate에 3T3-L1 preadipocytes $5x10^3$ cells/well로 분주하고 48 시간 후, YY312 10, 50, 100, 200 μg/mL 농도별로 24 시간 동안 처리하였다. 1 mg/mL의 MTT를 처리하여 3 시간 배양 후, DMSO를 이용해 용해시켜 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(4) Western Blotting

세포를 ice-cold PBS로 2회 세척 후 0.25% Trypsin-EDTA로 세포를 분리하여 원심분리(13,200 rpm, 2 min, 4℃)한 뒤 상층액인 지방층을 제거하였다. 침전물을 ice-cold PBS로 2회 세척 후 Protein lysis buffer(50 mM Tris-HCl pH 7.5, TritonX-100, 150 mM NaCl 0.5%, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)를 처리하여 4℃에서 용해시킨 후 원심분리(14,000 rpm, 10 min, 4℃) 하여 단백질을 분리하였다. 단백질 정량은 표준용액과 Bio-Rad protein kit(Hercules, CA USA)를 이용하여 Bradford법으로 정량 하였다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(10-12%)를 이용하여 각 샘플 당 50 μg씩 loading하여 단백질을 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 단백질을 전이하였다. 그 후, buffer에 5% skim milk(PBS containing 0.5% Tween 20)를 용해한 TBST용액으로 1시간 동안 blocking 을 하였고 1차 항체와 4° C에서 overnight 반응시킨 후, membrane을 HRP가 중합된 2차 항체에 60분간 반응시켰고, enhanced chemiluminiscent(ECL, Amersham-pharmacia Biotech, UK)를 이용해 발색한 후 X-ray 필름에 감광시켜 chemiluminescent detection system을 이용하여 현상하였다.

(5) RT-PCR

3T3-L1 지방세포에서 Trizol 시약(Sigma)을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. RT-PCR 키트(Bioneer Corp, Korea)를 사용하여 1 μg RNA를 역전사로 cDNA를 만들었다. PCR을 위한 primer sequence는 다음과 같다: peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ), forward

5'-TTG CTG AAC GTG AAG CCC AT-3' and reverse 5'-GTC CTT GTA GAT CTC CTG GA-3'; CCAT/enhancer binding protein α (C/EBPα), forward 5'-GAA CAG CAA CGA GTA CCG GGT A-3' and reverse 5'-CCA TGG CCT TGA CCA AGG GAG-3'; fatty acid synthase(FAS), forward 5'-TGC TCC CAG CTG CAG GC-3' and reverse 5'-GCC CGG TAG CTC TGG GTG TA-3'; GAPDH, forward 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' and reverse 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATG CCA TCA C-3'. PCR 생성물은 ethidium bromide 염색 후에 1.5% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은 mean±Standard Error of the Mean(SEM)으로 표시하였다. 본 연구의 통계처리는 SPSS 12.0 프로그램을 사용하였으며, 각 실험군 간의 유의적 차이는 one-way ANOVA를 실시하여 검증하였으며 다군간의 차이는 $p<0.05$수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 평가하였다.

결 과

1. YY312가 체중변화에 미치는 영향

고지방식이로 6주간 비만을 유도한 후에 고지방식이를 공급하면서 마우스에 YY312(300 mg/kg) 또는 양성대조군 sibutramine(5mg/kg)을 경구투여하고 체중증가에 미치는 영향을 1주 간격으로 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. YY312 투여전 체중은 실험군 간에 큰 차이가 없었다. YY312 투여 후 마우스의 체중이 2주까지 일시적으로 감소하는 현상을 보였는데 이는 경구투여에 의한 마우스의 스트레스 때문으로 사료되었다. 10주째 체중을 군간 비교해보면 YY312 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 체중이 10.7% 감소하였다(Fig. 1A). 양성대조군 약물인 sibutramine(5 mg/kg) 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 체중이 10.6% 감소하였다. 따라서 본 실험 결과 YY312는 양성대조군처럼 체중억제에 우수한 효능을 가진 것으로 나타났다. 하루식이 섭취량에서는 정상식이에 비해 고지방식이 마우스의 경우 식이 섭취량이 적었으나 YY312 투여군의 경우 고지방식이 대조군에 비해 차이가 없었다(Fig. 1B). 양성대조군 sibutramine 투여의 경우 초기에 음식물 섭취가 감소하였으나, 고지방식이 대조군 및 YY312 투여군과 유의한 차이가 나타나지 않았다.

2. YY312의 조직무게에 미치는 영향 분석

YY312 투여 10주후 마우스의 복부지방과 간 무게를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 정상식이군에 비해 고지방식이 대조군의 경우 복부지방이 유의하게 증가하였고($p<0.05$) 간의 무게도 정상식이에 비해 고지방식이 대조군이 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 지방조직의 경우 고지방식이군에 반해 YY312를 투여한 군과 sibutramine을

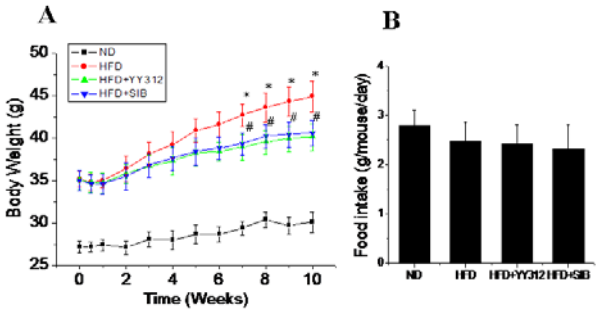

Fig. 1. Effects of YY312 on body weight in the diet-induced obesity. (A) Changes in body weight consuming ND, HFD or HFD with sample 300 mg/kg YY312 or 5 mg/kg sibutramine(SIB) during 10 week period. (B) Food intake per mouse per day was measured. Data are shown as mean±SEM(n=10). *$p<0.05$ compared with the ND groups, #$p<0.05$ as compared with the HFD groups.

투여한 군에서 복부지방이 각각 25.0%와 21.9% 유의하게 감소하였다(Fig. 2A). 간조직의 경우 YY312와 sibutramine 투여군에서 고지방식이 대조군에 비해 감소하는 경향이 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 2B).

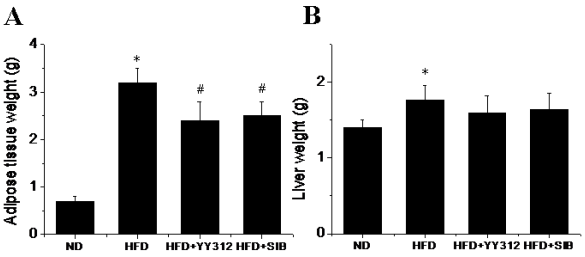

Fig. 2. Effects of YY312 on organ weight in male C57BL/6 mice fed with ND, HFD, HFD+YY312(300 mg/kg), and HFD+SIB(5 mg/kg). (A) Adipose tissues, (B) Liver. Data are shown as mean±SEM(n=10). *$p<0.05$ compared with the ND groups, #$p<0.05$ compared with the HFD groups.

3. YY312가 혈중 지질 및 혈당에 미치는 효과

YY312가 고지방식이로 유도된 비만 쥐의 혈중 지질과 혈당에 미치는 영향을 조사하기 위해, YY312 투여 10주 후 마우스를 밤 동안 (12시간) 절식하고 마우스의 혈액을 채취하였다. 마우스의 혈액을 원심 분리하여 혈청을 모으고 중성지방, 혈당, 콜레스테롤 양을 분석하여 Fig. 3에 나타내었다. 중성지방의 경우 고지방식이 대조군은 정상식이군보다 유의하게 증가하였고($p<0.05$), YY312 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 19.0% 감소하였다(Fig. 3A). 양성대조군인 sibutramine 투여군의 경우 고지방식이 대조군에 비해 17.5% 감소하였다. 따라서 고지방식이 대조군과 비교하여 YY312와 sibutramine이 중성지방 억제효과를 유의하게 나타냄을 보여준다 ($p<0.05$). 총콜레스테롤의 경우 고지방식이 대조군은 정상식이군에 비해 유의하게 증가한 반면($p<0.05$), YY312 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 콜레스테롤이 21.4% 감소하였다(Fig. 3B). Sibutramine 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 19.3%의 감소효과가 나타났다. HDL-콜레스테롤의 경우는 정상식이에 비해 고지방식이 대조군의 감

소하였으며, 고지방식이 대조군에 비해 YY312 투여군은 18.8% 증가하였다(Fig. 3C). Sibutramine 처리군의 HDL-콜레스테롤은 고지방식이 대조군에 비해 18.5% 증가하였다. 혈당의 경우, 고지방식이 대조군은 정상식이군에 비해 유의하게 증가하였고($p<0.05$) 시료 YY312 투여군과 sibutramine 투여군 모두 고지방식이 대조군과 비교하여 혈당 감소효과가 나타나지 않았다(Fig. 3D).

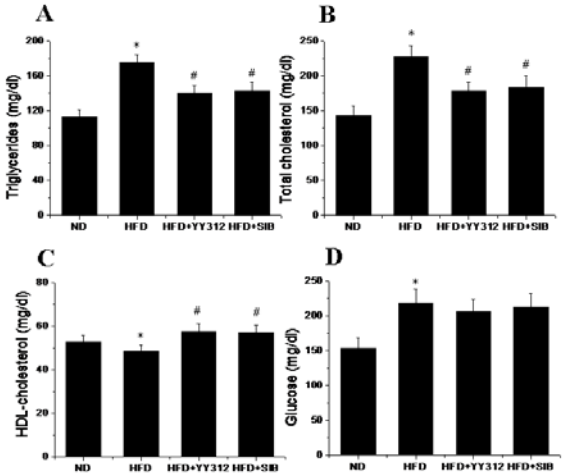

Fig. 3. Effects of YY312 on triglycerides, total cholesterol, HDL-cholesterol, and blood glucose in male C57BL/6 mice fed with ND, HFD, HFD+YY312(300 mg/kg), and HFD+SIB(5 mg/kg). Data are shown as mean±SEM(n=10). $^{*}p<0.05$ compared with the ND groups, $^{\#}p<0.05$ as compared with the HFD groups.

4. YY312의 지방조직에서 AMPK 활성 증가 효과

YY312의 항비만 효과에 대한 작용기전을 조사하기 위해 실험 동물군에서 AMPK 활성화 정도를 조사하였다. 실험 종료 후 쥐의 지방조직에서 Western blotting으로 AMPK

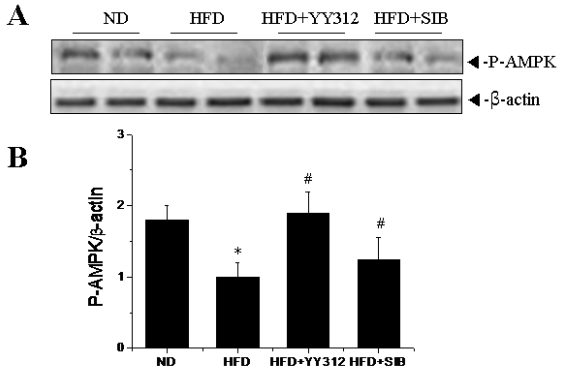

Fig. 4. Effects of YY312 and sibutramine on AMPK phosphorylation in fat tissues of male C57BL/6 mice fed with ND, HFD, HFD+YY312(300 mg/kg), and HFD+SIB(5 mg/kg). (A) Mice tissues were homogenized and equal amount proteins were separated by SDS-PAGE and phospho-AMPK(P-AMPK) and β-actin levels were analyzed by Western Blot. (B) The relative band intensity was determined by densitometry and was normalized to β-actin. Data are shown as mean±SEM(n=10). $^{*}p<0.05$ compared with the ND groups, $^{\#}p<0.05$ compared with the HFD groups.

활성화(인산화)를 분석하였다. 정상식이군에 비해 고지방식이 대조군의 경우 AMPK 인산화가 감소되었고 YY312를 경구 투여한 쥐는 고지방식이 대조군에 비해 AMPK 활성이 회복됨이 관찰되었다(Fig. 4).

5. YY312의 지방세포분화 억제 효과

YY312의 항비만 효과에 대한 기전을 규명하고자 3T3-L1 지방전구세포에 YY312를 0, 50, 100, 200 μg/mL로 처리하여 24시간 동안 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 5A). 조사한 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았고, 낮은 농도(0-100 μg/mL)에서 YY312의 지방세포분화에 미치는 효과를 조사하였다. 3T3-L1 지방전구세포에 YY312를 각각 농도(0, 50, 100 μg/mL) 별로 처리하여 8일 후에 Oil-red O staining을 이용하여 지방분화 억제 효과를 측정하였다. 대조군에 비해 50, 100 μg/mL 농도에서 지방 droplet 크기가 크게 감소하여 효과적으로 지방분화를 억제함을 보여주었다(Fig. 5B). 지방세포분화 억제 효과의 기전을 조사하기 위해 지방세포 분화 동안에 YY312를 각각의 농도(0, 10, 50, 및 100 μg/mL)로 처리하고 8일 째에 지방세포분화 조절 전사인자 PPARγ 와 C/EBPα 와 지방산 합성 효소인 FAS mRNA 발현을 확인하였다. 이들 유전자의 발현은 낮은 농도(10 μg/mL) YY312에서 크게 변화하지 않았고 50, 100 μg/mL YY312에서 대조군에 비해 크게 감소하였다(Fig. 5C). 이로 미루어 보아 YY312는 지방세포분화 조절 유전자 발현을 감소시켜 지방세포분화를 억제함을 알 수 있었다. 다음으로 YY312가 지방세포분화 동안에 AMPK 활성에 미치는 영향을 조사하였다. AMPK 활성은 AMPK와 기질단백질 ACC 인산화 정도로 확인한다. AMPK 활성은 지방세포분화와 지방축적의 중요한 전사인자인 PPARγ 와 C/EBPα 의 조절자로 알려져 있다[25]. 낮은 농도 10 μg/mL YY312에서 AMPK 활성은 크게 증가하지 않았고 50, 100 μg/mL YY312에서 대조군에 비해 크게 증가하였다(Fig. 5D). AMPK 기질단백질 ACC 인산화도 AMPK 인산화와 비슷하게 증가하였다.

고 찰

고대 한의학 문헌에서는 비만이 肥, 肥胖, 肥人, 肉人, 肥貴人 등으로 표현되어 왔는데[12], 비만의 원인은 주로 氣虛, 濕, 痰이라고 할 수 있다[13]. 비만의 병리기전을 氣虛, 濕, 痰과 연결 지어 살펴보면 세 가지로 요약해 볼 수 있다. 첫째, 膏粱厚味한 음식을 과식하거나 영양이 過乘되면 痰濕을 형성하거나 비위의 運化기능이 실조된다. 둘째, 活動過少(久臥久坐)하면 氣虛 혹 氣鬱하게 되고 氣虛氣鬱은 運化 및 轉輸기능이 저하되어 濕痰을 형성하게 된다. 셋째, 內傷七情은 肝脾氣鬱結을 야기하게 되고 肝脾氣鬱結은 비위의 運化 및 升降기능에 영향을 미쳐 濕痰이 생하게 한다[27]. 비만은 상기한 濕, 痰, 瘀 같은 병리적 산물이 기부나 복막, 장부 등에 유체되는 것이다. 따라서, 補氣, 健脾, 祛濕利水, 消導, 化痰 작용을 갖는 한약을 치료제로 사용하였으며, 실제 항비만 효과가 있는 한약재로 人蔘[28], 黃連[29], 苦瓜[30], 枸杞子[31], 側柏葉[32], 木香[33], 小茴香[34] 등이 연구된 바가 있다.

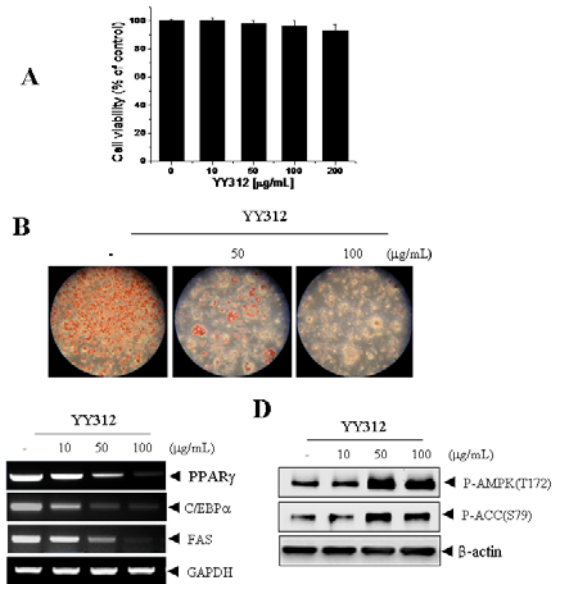

Fig. 5. Effects of YY312 on cell viability, adipogenic differentiation, and AMPK activation in 3T3-L1 cells. (A) 3T3-L1 preadipocytes were incubated with various concentrations(0-200 μg/mL) of YY312 for 24 h and cell viability was measured by MTT. (B-D) Differentiating 3T3-L1 cells were treated with YY312 as indicated for 8 days in adipocyte differentiation induction media. (B) 3T3-L1 adipocytes were stained with Oil-red O at day 8 and microscopically analyzed. (C). Total RNAs from 3T3-L1 adipocytes were extracted at day 8 and PPARγ , C/EBPα , FAS, and GAPDH mRNA levels were analyzed by RT-PCR. (D) 3T3-L1 adipocytes were lysed and cell lysates were analyzed for P-AMPK Thr172(P-AMPK(T172)), phospho-ACC Ser79(P-ACC(S79)), and β -actin by Western blotting. All bands were normalized to the level of GAPDH(C) or β -actin(D) in each lane and the fold band intensity was written under each band.

본 연구에서는 고지방식이에 의해 비만이 유도된 마우스에서 白茅根, 靑皮, 吳茱萸 복합추출물인 YY312의 항비만 효과를 조사하였다. 또한 YY312의 작용기전을 이해하기 위해 3T3-L1 지방세포분화에 대한 효과와 YY312의 지방분화 조절 유전자발현과 AMPK 활성에 대한 효과를 조사하였다.

세포수준에서 비만은 지방조직에서 섬유아 지방전구세포(preadipocytes)의 지방세포(adipocytes) 분화에 의한 지방세포 수와 크기의 증가가 원인으로 작용한다. 지방조직은 단순한 에너지 저장고가 아니라, 내분비 기관으로서 각종 단백질 호르몬들을 분비하여 지방대사와 당대사를 포함한 체내 에너지 대사를 조절하는데 중요한 역할을 한다[35]. 마우스의 섬유아세포에서 유래된 3T3-L1 지방전구세포는 *in vitro*에서 지방세포로 분화되는 특징을 가지기 때문에 지방세포의 성질을 연구하는데 흔히 사용된다[36]. 3T3-L1 세포의 분화는 *in vivo*에서 일어나는 지방분화 과정과 유사한 형태를 보인다[37]. 지방전구세포는 인슐린 자극에 의해 지방세포로 분화가 시작하며 지방세포 분화가 유도되는 동안 C/EBP family, PPARγ , sterol regulatory element binding proteins 1c 등의 전사인자들의 발현과 전사활성이 증가하게 되어 지방세포 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다[37,38]. 지방세포 분화를 억제하는 효능 여부는 항비만 효과를 측정하는데 흔하게 사용되는 방법의 한가지이다.

AMPK는 대사의 핵심 스위치 단백질로 에너지 결핍 조건에서 활성화된 AMPK는 에너지가 소모되는 합성반응은 억제하고 에너지를 생성하는 반응은 증가시켜 세포의 에너지 항상성을 유지하는 역할을 한다[39,40]. 활성화된 AMPK는 ACC와 HMG-CoA reductase 활성을 억제하여 지방산과 콜레스테롤 합성을 억제하고 지방산 산화를 촉진하므로 비만 등 대사질환 치료제 개발의 주요 타깃 단백질이다[41].

본 연구에서 고지방식이에 의해 에너지 균형의 조절이 무너져 마우스의 체중이 증가하였다. 그러나, YY312를 경구투여 받은 마우스는 고지방식이 대조군에 비해 체중증가가 유의하게 감소하였다. YY312에 의한 체중감소의 정도는 양성대조군인 sibutramine 투여군과 비슷하게 나타나 YY312가 체중감소에 효과적임을 보여주었다. 실험동물의 장기와 지방조직 무게를 측정한 결과, 실험군간의 비장, 신장, 고환 등에 무게에는 큰 차이가 없었다. 대조군에 비해 YY312를 투여한 실험군에서 복부지방조직 무게가 sibutramine을 처리한 군과 비슷한 정도로 유의하게 감소하였다. 따라서 YY312의 체중감소 효과는 복부지방조직 무게 감소에 기인할 것으로 추측할 수 있었다. YY312가 혈청의 지질 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈장의 지질함량을 측정한 결과, 혈청지질의 중성지방, 총콜레스테롤 함량 모두 고지방식이 대조군에 비해 낮았으며, HDL-콜레스테롤 함량은 높게 나타났다. 지방축적으로 나타나는 비만에 의한 2차적인 합병증인 고지혈증, 고콜레스테롤증은 임상적으로도 문제시 되고 있으며, 특히 콜레스테롤양은 조절되지 않으면 동맥경화를 포함한 심혈관계 질환을 유발한다. 따라서 YY312는 고지방식이에 의해 비만이 유도된 마우스의 혈중 지질을 양호하게 변화시켜 고지혈증, 고콜레스테롤증을 막아주는 효과가 있음을 추측할 수 있다.

당뇨와 비만 등 대사질환 치료제 개발의 중요한 타깃 유전자인 AMPK는 지방산과 콜레스테롤 합성을 억제하고 지방산 산화를 증가시킨다[39,41]. 고지방식이에 의해 비만이 유도된 마우스는 정상식이군에 비해 AMPK 활성이 감소되었고 YY312 투여군의 경우 AMPK 활성이 정상식이처럼 회복되었다. YY312와는 달리 sibutramine 투여군은 AMPK 활성은 정상식이군에 비해 회복되는 정도가 적어 sibutramine의 항비만 작용에는 AMPK 이외에 다른 요소들이 작용할 것으로 추측할 수 있었다. AMPK는 운동, 저산소, 포도당 결핍과 같이 에너지가 부족한 스트레스 조건에서 세포내 ATP양이 감소하고 AMP양이 증가하는 조건에서 활성화되는 것으로 알려진 단백질이다[39]. 하지만 최근에서 에너지 결핍 외에 외부 자극 조건에서 세포내 칼슘농도의 증가에 따라 AMPK 활성이 증가하는 기전도 밝혀졌다[40]. 따라서 YY312의 작용기전을 이해하기 위해서는 YY312가 AMPK 활성을 증가시키는데 에너지 결핍 또는 세포내 칼슘 증가 중 어떤 경로에 의한 것인지에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다.

마우스의 섬유아세포에서 유래된 지방전구세포 3T3-L1은 *in vitro*에서 분화유도물질(insulin, dexamethasone 및 3-isobutyl-1-methylxanthine)을 첨가하였을 때 지방세포로 전환된다. 지방세포 분화동안 지방조직에 특징적인 유전자들의 발현을 조절하는 전사인자들(C/EBPs, PPARγ 등)의 발현이 증가되며, 3T3-L1 분화는 *in vivo*에서 일어나는 지방분화 과정과 유사한 형태를 보인다[37]. 핵호르몬 수용체 PPARγ 는 지방세포분화의 master regulator 전사인자이며, C/EBPα 는 지방세포의 최종분화(terminal differentiation)

를 유도하는데 중요한 역할을 하는 전사인자이다[38]. YY312는 3T3-L1 지방세포분화를 효과적으로 억제하였으며 PPARγ와 C/EBPα 발현을 억제하였다. 따라서 지방세포분화 억제가 YY312의 항비만 효과의 주요 작용기전임을 추측할 수 있다. 흥미롭게도 지방세포 분화 중에 YY312 처리는 AMPK 활성을 증가시킴이 관찰되었다. 이전의 많은 보고들에서 AMPK 활성은 지방세포분화 동안에 PPARγ과 C/EBPα 발현을 억제하며 지방세포분화를 억제하는 것으로 알려져 있다[42-46]. 따라서 YY312에 함유된 복합 조성물이 AMPK 활성을 증가시키고 C/EBPα와 PPARγ 발현을 억제함으로써 지방세포분화 및 지방조직을 감소시켜 체중감소를 유도한 것으로 사료된다. 또한 지방세포분화 억제 효과 이외에도 지방조직에서 YY312에 의해 활성화된 AMPK는 지방산 산화를 촉진하여 항비만 효과를 나타낼 수도 있을 것으로 생각되며 이러한 가능성에 대한 더 많은 기전 연구도 필요한 것으로 사료된다. 또한 YY312는 혈장의 지질함량에는 양호한 효과를 나타냈으나, 혈당에는 효과가 없었다. 따라서 YY312의 지방세포분화 억제와 지질대사 조절이 항비만효과의 주요한 작용기전으로 생각되며 YY312가 혈당 조절에 효과가 없는 사실을 이해하기 위한 기전 연구도 필요한 것으로 사료된다.

白茅根은 대사질환에 관한 효과에 대해서는 알려진 것이 거의 없으나, 본초학적으로 같은 배속인 凉血止血藥에 속하는 側柏葉 추출물이 체내에서 지방 분해를 촉진시키고 지방의 저장을 감소시켜 비만을 개선시켜 줄 수 있다는 연구 결과가 보도된 바 있다[32]. 또한 白茅根은 甘하면서도 膩하지 않고, 寒性이 胃氣를 阻碍하지 않으며, 利尿작용을 하되 傷陰하지 않으므로 化濕, 利水하는 효능으로 항비만 효과를 보인 것으로 사료된다[15]. 靑皮는 본초학적으로 理氣藥에 속하며, 같은 배속인 木香 추출물도 항비만 활성 효과가 보고된 바 있다[33]. 靑皮는 祛痰, 利膽하고 散結消滯하는 효능이 강하여 食積氣滯證을 主治하고, 또한 破氣散結하는 효능이 있어 氣滯血瘀로 인한 癥瘕積聚 등의 병증을 치료하는데 적용되며[15], 靑皮의 생리활성물질인 carotenoid β-cryptoxanthin의 항비만 효과가 보고된 바 있어[25], 항비만 효과를 보인 것으로 사료된다. 吳茱萸는 溫裏藥에 속하며 동 배속인 小茴香의 항비만 효과가 보고된 바 있다[34]. 吳茱萸는 肝, 脾, 胃, 腎經에 작용하며 大熱燥烈하여 疏肝下氣에 뛰어나 疏肝解鬱, 行氣燥濕하는 작용이 있고[15], 주요 알칼로이드인 evodiamine의 capsaicin과 유사한 항비만 효과가 보고된 바 있어[26], 항비만 효과를 보인 것으로 사료된다.

본 연구에서는 白茅根, 靑皮, 吳茱萸의 개별 추출분말을 白茅根 50%, 靑皮 20%, 吳茱萸 30% 함량으로 혼합하였는데, 吳茱萸는 苦, 辛味로 辛散, 苦降하고 性이 大熱燥烈하며 行氣燥濕하는 작용이 강하여[15], YY312의 君藥이라고 볼 수 있다. 그리고 靑皮는 吳茱萸 보다 그 配伍量이 적고 性味가 苦辛, 溫하고 氣는 峻烈하여 疏肝破氣, 散結消堅, 止痛, 消積化滯하는 작용이 있으니[15], YY312의 臣藥으로써 적용되었다. 마지막으로 YY312에서 白茅根은 吳茱萸, 靑皮와는 다르게 그 性이 寒하니 君藥의 성미와 상반되면서도 같이 응용하여 치료작용을 일으키는 反佐藥이라고 볼 수 있다. 다만 白茅根은 작용이 완화하므로 용량을 많이 사용하여야 하기 때문에 吳茱萸, 靑皮 보다 많은 양이 배오되었다[15].

상기한 바와 같이 YY312에 배오된 白茅根, 吳茱萸, 靑皮는 개별 약물로서도 항비만 효과가 기대되는 약물들이며, 또한 더불어 配伍되었을 때 그 효과가 더욱 뛰어날 것으로 예상되어, YY312의 고지방식이에 의해 유도된 비만 쥐와 3T3-L1 지방세포에 대한 연구를 수행하였고, YY312의 항비만 효과를 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 YY312의 고지방식이에 의해 유도된 비만 쥐에서 항비만 효과와 3T3-L1 지방세포분화 억제 효과에 대한 연구를 수행하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. YY312는 고지방식이에 의한 비만치료 가능성 동물실험에서 고지방식이 대조군에 비해 유의하게 체중을 억제하였고, 혈청 내 중성지방과, 총콜레스테롤 양을 낮추고 HDL-콜레스테롤 양은 증가시키는 효과를 보였다.

2. YY312는 3T3-L1 지방세포 분화를 효과적으로 억제하였고 지방세포분화 전사인자 PPARγ와 C/EBPα 및 지방산 합성효소 FAS 유전자 발현을 억제하였다.

3. YY312를 경구투여한 고지방식이 마우스는 정상식이군처럼 AMPK 활성이 회복되었고 3T3-L1 지방세포분화 동안에 YY312가 AMPK 인산화를 증가시키는 것이 관찰되었다.

이상의 결과에서 YY312는 고지방식이에 의해 유도된 비만 마우스모델에서 항비만 효과와 3T3-L1 지방세포분화 억제 효과를 나타내었으며, YY312에 의한 AMPK 활성화와 PPARγ와 C/EBPα 발현 억제가 항비만 효과의 주요 작용기전일 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국산업기술평가원 ATC 지원 사업에 의해 수행됨.

참고문헌

1. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. Nature. 2000 ; 404 : 635-43.
2. Friedman JM. Obesity in the new millennium. Nature. 2000 ; 404 : 632-4.
3. Rexrode KM, Manson JE, Hennekens CH. Obesity and cardiovascular disease. Curr Opin Cardiol. 1996 ; 11 : 490-5.
4. Byers T, Sedjo RL. Public health response to the obesity epidemic: too soon or too late? J Nutr. 2007 ; 137 : 488-92.
5. Rokholm B, Baker JL, Sørensen TI. The levelling off of the obesity epidemic since the year 1999--a review of evidence and perspectives. Obes Rev. 2010 ; 11 : 835-46.

6. Unger RH. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. Trends Endocrinol Metab. 2003 ; 14 : 398-403.
7. Hofbauer KG, Nicholson JR, Boss O. The obesity epidemic: current and future pharmacological treatments. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007 ; 47 : 565-92.
8. Powell AG, Apovian CM, Aronne LJ. New drug targets for the treatment of obesity. Clin Pharmacol Ther. 2011 ; 90 : 40-51.
9. Padwal RS, Majumdar SR. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. Lancet. 2007 ; 369 : 71-7.
10. Yin J, Zhang H, Ye J. Traditional chinese medicine in treatment of metabolic syndrome. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2008 ; 8 : 99-111.
11. Ahn JS, Do MS, Kim So, Jung HS, Kim YI, Kim HJ, Park KY. Antiobesity Effect of Medicinal Food. 2006 ; 9 : 15-21.
12. Lee JS, Lee SH. The Reductive Effects of Oriental Medicine on the Body Fat and Abdominal Obesity. J Korean Soc Study Obes. 2001 ; 1 : 33-42.
13. Park BJ. Herbal Diet of Obese with Osteoarthristis. J Korean Soc Study Obes. 2004 ; 4 : 201-11.
14. Kim JK, Oh MS, Song TW. Oriental and western study on medication treatment of obesity. J Daejeon Oriental Medicine. 2002 ; 11 : 193-9.
15. Seo BI, Kwon DY, Choi HY, Lee JH, Oh MS, Bu YM. Medicinal Herbology. 8th rev. ed. Seoul : Younglim-Sa. 2012 : 465-8, 485-7, 573-5.
16. Li P, Matsunaga K, Ohizumi Y. Enhancement of the nerve growth factor-mediated neurite outgrowth from PC12D cells by Chinese and Paraguayan medicinal plants. Biol Pharm Bull. 1999 ; 22 : 752-5.
17. Yoon JS, Lee MK, Sung SH, Kim YC. Neuroprotective 2-(2-Phenylethyl)chromones of Imperata cylindrica. J Nat Prod. 2006 ; 69 : 290-1.
18. Mohamed GA, Abdel-Lateff A, Fouad MA, Ibrahim SR, Elkhayat ES, Okino T. Chemical Composition and Hepato-protective activity of Imperata cylindrica Beauv. Pharmacogn Mag. 2009 ; 5 : 28-36.
19. Lee S, Ra J, Song JY, Gwak C, Kwon HJ, Yim SV, Hong SP, Kim J, Lee KH, Cho JJ, Park YS, Park CS, Ahn HJ. Extracts from Citrus unshiu promote immune-mediated inhibition of tumor growth in a murine renal cell carcinoma model. J Ethnopharmacol. 2011 ; 133 : 973-9.
20. Sugiura M, Ohshima M, Ogawa K, Yano M. Chronic administration of Satsuma mandarin fruit (Citrus unshiu Marc.) improves oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat liver. Biol Pharm Bull. 2006 ; 29 : 588-91.
21. Higashi-Okai K, Kamimoto K, Yoshioka A, Okai Y. Potent suppressive activity of fresh and dried peels from Satsuma mandarin Citrus unshiu (Marcorv.) on hydroperoxide generation from oxidized linoleic acid. Phytother Res. 2002 ; 16 : 781-4.
22. Kim ST, Kim JD, Lyu YS, Lee MY, Kang HW. Neuroprotective effect of some plant extracts in cultured CT105-induced PC12 cells. Biol Pharm Bull. 2006 ; 29 : 2021-4.
23. Yu X, Wu DZ. Protective effects of Evodia rutaecarpa water extract on ethanol-induced rat gastric lesions. Zhongguo zhongyao zazhi. 2006 ; 31 : 1801-3.
24. Liao JF, Chiou WF, Shen YC, Wang GJ, Chen CF. Anti-inflammatory and anti-infectious effects of Evodia rutaecarpa (Wuzhuyu) and its major bioactive components. Chin Med. 2011 ; 6 : 6.
25. Takayanagi K, Morimoto S, Shirakura Y, Mukai K, Sugiyama T, Tokuji Y, Ohnishi M. Mechanism of visceral fat reduction in Tsumura Suzuki obese, diabetes (TSOD) mice orally administered β-cryptoxanthin from Satsuma mandarin oranges (Citrus unshiu Marc). J Agric Food Chem. 2011 ; 59 : 12342-51.
26. Kobayashi Y, Nakano Y, Kizaki M, Hoshikuma K, Yokoo Y, Kamiya T. Capsaicin-like anti-obese activities of evodiamine from fruits of Evodia rutaecarpa, a vanilloid receptor agonist. Planta Med. 2001 ; 67 : 628-33.
27. Lee SB, Keum DH, Lee MJ. Oriental and Western Medical Study on the cause and treatment of Obesity. J Dong Guk Oriental Medicine. 1996 ; 5 : 33-52.
28. Bae MJ, Sung TS, Choi C. Effect of Ginseng Fraction Components on Plasma, Adipose and Feces Steroids in Obese Rat Induced by a High Fat Diet. Korean J Ginseng Sci. 1990 ; 14 : 404-15.
29. Xie W, Gu D, Li J, Cui K, Zhang Y. Effects and action mechanisms of berberine and Rhizoma coptidis on gut microbes and obesity in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. PLoS One. 2011 ; 6 : e24520.
30. Shih CC, Lin CH, Lin WL. Effects of Momordica charantia on insulin resistance and visceral obesity in mice on high-fat diet. Diabetes Res Clin Pract. 2008 ; 81 : 134-43.
31. Hwang EY, Hong JH, Choi JH, Lee EJ, Lee IS. Study on Anti-obesity and Hypoglycemic Effects of

Lycium chinense Mill Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2009 ; 38 : 1528-34.
32. Min G. Effects of Biotae Cacumen extract on obesity and lipid metabolism in high fat diet rats. Seoul : Dongguk University. 2003 : 37.
33. Yoon TS, Sung YY, Jang JY, Yang WK, Ji Y, Kim HK. Anti-obesity Activity of Extract from Saussurea lappa. Korean J Medicinal Crop Sci. 2010 ; 18 : 151-6.
34. Seo DJ, Kim JM, Kim TH, Baek JM, Kim TW, Kim HS, Choe M. Anti-Obesity Effects of Foeniculum fructus Water Extract. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2010 ; 39 : 1604-10.
35. Frühbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. Methods Mol Biol. 2008 ; 456 : 1-22.
36. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. Physiol Rev. 1998 ; 78 : 783-809.
37. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes Dev. 2000 ; 14 : 1293-307.
38. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. Genes Dev. 2002 ; 16 : 22-6.
39. Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. Trends Biochem Sci. 2004 ; 29 : 18-24.
40. Hardie DG. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. Int J Obes (Lond). 2008 ; 32 Suppl 4 : S7-12.
41. Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. Cell Metab. 2009 ; 9 : 407-16.
42. Daval M, Foufelle F, Ferré P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. J Physiol. 2006 ; 574 : 55-62.
43. Choi Y, Kim Y, Ham H, Park Y, Jeong HS, Lee J. Nobiletin suppresses adipogenesis by regulating the expression of adipogenic transcription factors and the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). J Agric Food Chem. 2011 ; 59 : 12843-9.
44. Lee YK, Lee WS, Hwang JT, Kwon DY, Surh YJ, Park OJ. Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPKalpha-PPAR-gamma in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPKalpha-COX-2 in cancer cells. J Agric Food Chem. 2009 ; 57 : 305-10.
45. Chen S, Li Z, Li W, Shan Z, Zhu W. Resveratrol inhibits cell differentiation in 3T3-L1 adipocytes via activation of AMPK. Can J Physiol Pharmacol. 2011 ; 89 : 793-9.
46. Hwang JT, Kim SH, Lee MS, Kim SH, Yang HJ, Kim MJ, Kim HS, Ha J, Kim MS, Kwon DY. Anti-obesity effects of ginsenoside Rh2 are associated with the activation of AMPK signaling pathway in 3T3 L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2007 ; 364 : 1002-8.