



Original Article / 원저

HJ01이 OP9세포에서의 지방 분화와 P-407로 유발한 고지혈증 흰쥐에 미치는 영향

박정은¹·한상용²·최은식²·정명수³·김윤경^{2,4*}

1:원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과
2:원광대학교 약학대학 한약학과 방제학교실
3:원광대학교 한의과대학 한의예과, 4:원광한약연구소

Effects of a Herbal Preparation HJ01 on Adipocyte Differentiation in OP9 Cells and the Poloxamer-407 Induced Hyperlipidemia in Mice

Jung-Eun Park¹ · Sang-Yong Han² · Eun-Sik Choi² · Myong-Soo Chong³ · Yun-Kyung Kim^{2,4*}

1 : Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine
2 : Department of Herbal Medicine, College of Pharmaceutics, Wonkwang University
3 : Department of Pre-Herb Medicine, College of Korean medicine, Wonkwang University
4 : Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate the effect of a herbal preparation HJ01 consisting of Salicornia herbacea, Citri Reticulatae Pericarpium, Crataegi Fructus and Glycyrrhizae Radix on adipocyte differentiation in OP9 cells and on poloxamer 407(P-407)-induced hyperlipidemia in mice.

Methods : 1. MTT assay was used to evaluate the potential cytotoxicity of *Salicornia herbacea*, *Citri Reticulatae Pericarpium*, *Crataegi Fructus*, *Glycyrrhizae Radix* and HJ01, respectively. 2. Bone-marrow derived OP9 cells were treated with HJ01, and the alterations in fat storage in the cells were determined by the Oil red O assay. 3. The protein level of CAAAT/enhancer binding protein alpha(C/EBP α), as a adipocyte differentiation marker, was examined using western blot analysis in differentiated OP6 cells. 4. Adult male C57BL6 mice received intraperitoneal injections of P407 to induce hyperlipidemia, simultaneously, were treated with HJ01 for 4 weeks. Then the cholesterol (TC), triglyceride (TG) and high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) levels in sera and liver tissues were measured.

Results : 1. The MTT assay exhibited that *Salicornia herbacea*, *Citri Reticulatae Pericarpium*, *Crataegi Fructus*, *Glycyrrhizae Radix* and HJ01 showed no significant cytotoxicity in tested dosages. 2. Ten days' treatment with HJ01 markedly inhibited the increases in fat storage in differentiated OP6 cells. 3. Four weeks' treatment with HJ01 down-regulated the protein level of CAAAT/enhancer binding protein alpha(C/EBP α) but up-regulated the levels of adiponectin in differentiated OP9 cells. 5. HJ01 inhibited the accumulation of TC and TG in liver tissues and increased serum levels of TC in hyperlipidemic mice.

Conclusions : These results suggest that HJ01 can *in vitro* inhibit adipocyte differentiation and fat storage in OP6 cells, *in vivo* improve the hyperlipidemia induced by P-407 in mice, which may be mediated by promoting glucose uptake and improving a lipid metabolite profile.

Keyword : OP9 cells, HJ01, Poloxamer-407, Hyperlipidemia

I. 서 론

최근 생활수준의 향상으로 위생환경이 개선되고 식생활이 서구화하여 평균수명이 연장되었으며, 질병의 양상 또한 선진국형으로 급격히 변화되고 있으며 성인병이 오늘날 가장 큰 의학적 과제로서 등장하게 되었다.

국내 3대 사망원인질환으로 암과 함께 뇌혈관 질환과 심장 질환으로 꼽을 수 있으며 이중 총 사망자의 20.8%가 뇌혈관 질환 및 심장질환으로 인한 사망이라 한다¹⁾.

고지혈증은 심혈관질환, 뇌혈관질환 및 말초동맥질환의 선행원인으로 지질대사 이상으로 혈청내 cholesterol과 중성지방을 운반하는 지방단백이 증가하여 주요지질(cholesterol, triglyceride, phospholipid, free fat acid)의 혈관내 함량이 현저하게 증가한 상태를 말하며²⁾ 최근 연구들에 의하면 총 콜레스테롤과 LDL콜레스테롤이 증가

와 HDL 콜레스테롤의 감소가 심혈관의 중요한 원인이며 이러한 심혈관질환의 위험도 증가는 콜레스테롤 수치에 정해진 기준이 아니라 증가 및 감소 정도에 따라 지속적이고 단계적으로 위험도가 증가하는 것으로 알려졌다³⁾.

한의학에서는 高脂血症이라는 용어는 없으나, 高脂血症의 증상이 頭暈, 心慌, 肢麻, 胸悶, 胸痛 등으로 나타나므로 痰飲, 心悸, 眩暈, 頭痛, 胸痞, 真心痛, 中風 등의 범주에서 취급하고 있으며⁴⁾, 飲食失節, 運動不足, 七情損傷, 先天不足, 臟腑의 機能失調 등이 원인으로 보고되고 있다고 한다⁵⁾. 고지혈증의 유병률이 증가되는 점을 고려할 때 고지혈증의 적절한 예방과 치료를 필요로 하며 특히 천연물로부터 질병을 예방 또는 억제할 수 있는 생리활성 물질에 대한 연구가 증대되어지면서 생리활성 물질의 보고로 알려진 해양식물의 탐색에 관한 및 해조류로부터 질병을 억제하거나 개선시킬 수 있는 소재를 찾으려는 연구가 활발히 진행되고 있다⁶⁾.

그 중 함초(鹹草, *Salicornia herbacea*)는 명아주과(Chenopodiaceae)에 속하는 일년생 초본으로 통통하고 마디마디 튀어나온 풀이라 하여 '통통마디'라고도 한다⁷⁾. 전체가 다육질이고 녹색

*Correspondence to : Yun-Kyung Kim
Department of Herbal Medicine, College of Pharmaceutics,
Wonkwang University 460 Iksan-daero, Iksan, Jeonbuk,
570-749, Korea
· Tel/Fax: 82-63-850-6803 · E-mail: hestia@wku.ac.kr
· 접수 2013/06/04 · 수정 2013/06/08 · 채택 2013/06/12

인데 가을이 되면 붉은색으로 변하며, 줄기는 직립하고 마디마다 양쪽으로 통통한 가지가 갈라지기도 하며, 높이는 10~30cm의 크기로 자란다. 우리나라 서해안이나 울릉도 등지에 분포하여 염분의 농도가 높은 갯벌에서 생육하여 삼투압을 견디기 위해 식물체 내에 다량의 염분을 축적하고 있어 매우 짭이 많고 소금으로 가득하며, 50%의 높은 식이섬유가 함유되어 있어 미역이나 김 등의 다른 해조류에 비해 2배 이상 함유하고 있으며 Na, Ca, K 및 Mg 등의 천연미네랄, 필수아미노산 및 필수지방산이 풍부하여 예로부터 신장병, 간염, 변비, 숙변 및 위장병 치료제로 널리 이용되어 왔다⁸⁾⁹⁾. 최근 함초에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 주요 연구결과로는 고지방식이에서 고혈당과 고지혈증 예방효과, 항산화작용, 미백효과 등이 연구된 바 있다^{10)~14)}.

또한 이미 선행연구를 통해 확인된 *in vitro* HMG-CoA reductase 저해활성을 보인 황금, 후박, 행인, 황련, 적작약, 목단피, 당귀, 죽여, 계지, 산사와 DPPH소거활성을 보인 황금, 황련, 적작약, 건강, 목단피, 당귀, 죽여, 산사, 계지 등 한약재 중에서 비만억제 작용이 있는 진피, 산사, 감초를 선택하여 배합하고 본 연구에 사용하였다.

진피(陳皮, Citri Reticulatae Pericarpium)는 성숙한 감귤 과실의 껍질로 예로부터 한약재로 사용되어 왔으며, 대한약전에는 주요 플라보노이드 성분인 hesperidin의 함유량이 4%이상으로 천연 바이오플라보노이드와 베타카로틴 등의 유용한 생리활성물질이 풍부하여 항산화작용, 고지혈증 억제작용¹⁵⁾¹⁶⁾, 충치예방효과, 항균작용 등과 고혈압 예방, 혈중 LDL-콜레스테롤 감소작용 및 순환계질관의 예방 및 개선효과 등이 있는 것으로 보고되었다¹⁷⁾¹⁸⁾.

산사(山楂, Crataegi Fructus)는 장미과에 속한 낙엽교목인 *Crataegus pinnatifida* BGE. var. *typica* SCHNEIDER.) 및 동속 근연식물의 열매를 건조한 것으로, 관상동맥의 혈류량을 증가시키고 심근의 산소 소모량을 감소시키며, 심근허혈, 산소결핍에 대한 보호 작용이 있다. 그리고 관상동맥의 혈류량을 증가시키는 동시에 심근의 산소 소모량과 산소 이용률을 감소시킨다. 또한,

혈청 내 총 콜레스테롤과 β -지질단백질의 수치를 낮춘다. LDL-C 및 VLDL-C도 낮춘다. 또한 콜레스테롤과 콜레스테롤 에스테르의 동맥침착을 용량의존적으로 감소시킨다. 산사는 LCAT(lecithin cholesterol acyl transferase)를 활성화시켜 유리 콜레스테롤이 쉽게 침착할 수 없게 하여 죽상동맥경화를 예방할 수 있다. 산사의 죽상동맥경화증을 치료하는 성분은 우루솔산(ursolic acid)이다¹⁹⁾²⁰⁾. 이러한 산사는 소화불량, 고지혈증, 고혈압, 심근경색, 습성이질, 장염, 간염, 황달, 폐경, 산후자궁회복부전 등에 사용할 수 있으며, 인삼을 복용하고 맞지 않는 경우에도 산사로 풀어줄 수 있다고 밝혀져 있다.

감초(甘草, Glycyrrhizae Radix)는 콩과의 다년생 초본으로, 한방에서 모든 약재와 조화를 이루면서 효능을 증가시킬 뿐만 아니라 완화, 진통약으로 각종 동통 및 급박 증상을 완화하는데 내복용 또는 외용으로 사용되고, 그 자체가 독의 중화 작용과 같은 약성이 있다. 식물의 뿌리 및 근경에 트리테르펜(triterpene)계 사포닌(saponin), 글리시리진(glycyrrhizin)이 함유되어 있어 약물 중독, 음식물 중독, 체내 대사물의 중독뿐만 아니라 세균독소에 대한 모든 해독작용을 가지며, 항이노작용 및 갑상선피질호르몬양의 조절 작용이 있다. 감초는 항염증과 항알레르기 반응 작용을 보이며, 아세틸콜린에 대해 길항하는 작용을 나타내며, 아드레날린의 강심작용을 증강시키는 효과가 있다²¹⁾.

기존의 약리효과에 시너지 효과를 더하기 위하여 이들 모두를 포함하는 추출물을 이용하여 *in vitro*에서는 OP9 stroma cell를 통하여 지방세포 분화로 인한 억제효과²²⁾²³⁾와 lipid metabolism²⁴⁾의 가능성을 확인하고 *in vivo*에서는 외인성 고중성지방혈증인 Poloxamer-407^{25)~28)}로 유발한 동물모델에 투여하여 고지혈증에 대한 영향을 관찰하고자 하였다. 이에 유의미한 효과가 관찰되었기에 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시약

Adiponectin은 Cell signaling Technology, Inc.(Massachusetts, U.S.A.)로부터 구입하였으며, PPAR γ 와 C/EBP α 는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다. 고지혈증 유발을 위한 동물모델에는 Sigma에서 구입한 poloxamer-407을 사용하였다. 혈중 지질함량 변화를 측정하기 위하여 Total-cholesterol 함량 변화를 측정하기 위하여 Richmond 등의 효소법에 의하여 조제된 아산제약 kit(AM 202-K, Asan)를 사용하였으며, Triglyceride 함량은 McGowan 등의 방법에 준하여 조제된 아산제약 kit(AM 157S-K, Asan)를 구입하였다. High density lipoprotein(HDL)-cholesterol 함량은 Noma 등의 효소법에 의하여 조제된 아산제약 kit(AM203-K, Asan)를 구입하였다.

2) 한약재

실험에 사용한 함초(鹹草: *Salicornia herbacea* (SH))는 전북 군산시 옥구읍에 위치한 두루식품의 재배품을 입수하였으며, 진피(陳皮: *Citri Reticulatae Pericarpium*(CP), 원산지: 한국), 감초(甘草: *Glycyrrhizac Radix*(GR), 원산지: 중국)는 경북 경찬에 위치한 ㈜옴니허브에서 구입하였으며, 산사(山楂: *Crataegi Fructus*(CF), 원산지: 중국, 북경)는 경북 경산에 위치한 ㈜휴먼허브에서 구입하였다.

3) 동물실험

실험동물은 male C57BL6 (7week) mice를 ㈜오리엔트 바이오로부터 제공받아 일주일 동안 온도 $24.5\pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$ 로 조절되는 동물실에서 물과 식이를 자유롭게 섭취할 수 있는 환경에서 1주일 동안 적응기를 거쳤다.

고지혈증을 유발하지 않은 normal group과 고지혈증을 유발하는 control group 그리고 고지혈증을 유발과 동시에 함초단독, 타사제품, HJ01 0.5배군, HJ01 1배군, HJ01 2배군을 투여하는 총 7그룹으로 나뉘어 각 그룹 당 12마리씩 실험군을 만들었으며 각각의 시료는 1일 2회 경구투여로

4주간 실험을 수행하였다. 고지혈증을 유발하는 물질로는 poloxamer-407을 선택하였으며, 0.5g/kg의 용량으로 1회/3일 복강투여하였다.

4주 동안 체중변화와 식이변화를 1회/week 측정하였으며, 최종일에 실험동물을 하루 절식시킨 후 심장채혈을 한 후 15°C 에서 20분간 방치한 후 3000rpm에서 15분간 원심분리기를 이용하여 serum을 분리하였으며, 분석 전까지 -70°C 에 보관하였다. 본 실험에 사용되는 간조직은 적출하여 질소탱크에 분석 전까지 보관하였다.

2. 실험방법

1) 한약재 추출 및 제조

실험에 사용될 함초 단독, 함초와 그 외 배합된 배합물과 positive control로 현재 유행바이오택에서 판매되고 있는 함초와 폴리덱스트로스 추출물을 파우더로 만들기 위해 각 무게의 15배의 3차 증류수에 30분 동안 냉침한 후에 Heating mantle(Glas-Col, Terre Haute, IN, USA)을 이용하여 40°C 에서 2시간 동안 환류추출하였다. 얻어진 추출액을 Advantec No.2 110mm filterpaper로 여과한 후 여액을 감압농축기(Rotavapor R-124, Buchi, Switzerland)로 60°C 에서 감압농축한 후 동결건조기(Bondiro, IIShin Freeze Dryer, KOREA)로 건조하여 최종적으로 파우더 형태로 각각의 실험약물을 얻었다(Table 1.). 완성된 시료는 실험에 사용하기 전까지 -15°C 냉동고에 보관하였으며, 사용하기 전 3차 증류수로 용해 후 사용하였다.

2) OP9 세포주의 배양

함초 단독, 함초와 그 외 배합된 배합물과 positive control 추출물이 지방세포 대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 mouse 유래 OP9 세포를 사용하였다. Mouse 유래 OP9 세포는 열에 비활성된 20% Fetal Bovine Serum(Gibco), 100U/ml Penicillin-Streptomycin이 포함된 Alpha Minium Essential Medium (Gibco)을 사용하여 성장시켰으며, 사용된 α -MEM에는 ribonucleosides와 deoxyribonucleosides가 함유

되지 않는 배양액을 사용하였다. 배양의 조건은 5% CO₂와 95%의 공기를 포함하는 가슴 조건하에서 37°C 온도를 유지하여 배양하였다.

3) MTT 분석

OP9 세포의 생존율은 여러 농도의 추출물 처리하여 24시간 배양 후 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 요약하면, 지수성장을 하는 세포들은 20% FBS를 함유한 α -MEM 배지에서 3×10^4 cells/well의 밀도로 현탁하여 96well plate에 이식하고 24시간 배양 후 여러 가지 농도로 약물을 처리하였다. 24시간 동안 노출시킨 후 세포에 100 μ l의 MTT용액을 넣어 4시간 동안 37°C를 유지하는 배양기에 배양하였다. 반응이 끝난 후 MTT희석액을 조심스럽게 제거하고 각 well에 100 μ l의 DMSO를 첨가하여 15-20분간 plate shaker로 흔들어 준 후 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

4) 지방세포 분화 유도

1×10^6 cells/well에 OP9 세포를 2일 동안 20% FBS, 2mM L-glutamine, 100U/ml Penicillin-Streptomycin이 포함된 α -MEM 배지에서 배양한 후 분화를 유도하였다. 분화유도는 10% FBS가 포함된 α -MEM 배지에 1 μ g/ml insulin, 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-methylxanthine이 포함된 배양액에 2일 동안 배양한 후 10% FBS가 포함된 α -MEM 배지에 1 μ g/ml insulin 포함되어 있는 배양액에 2일 동안 배양한 후 10% FBS가 포함된 α -MEM 배지에 3일 동안 배양을 하여 분화를 유도하였다.

5) pH 측정

각 추출물들이 지방세포의 pH 변화에 미치는 영향을 분석하기 위하여 미분화시킨 배양액과 10% FBS가 포함된 α -MEM 배지에 1 μ g/ml insulin, 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3-

isobutyl-methylxanthine이 포함된 배양액에 2일 동안 분화시킨 후 10% FBS가 포함된 α -MEM 배지에 1 μ g/ml insulin 포함되어 있는 배양액에 2일 동안 분화를 유도한 배양액을 모아 pH meter를 이용하여 세포 밖의 pH변화를 측정하였다.

6) Oil red O staining

1×10^6 cells/well의 OP9 세포를 6cm dish에 이식한 후 분화를 유도하며 동시에 각 추출물의 최종농도가 100 μ g/ml이 되게 하여 처리한다. 7일 동안의 분화를 유도한 후 10% formalin으로 20분 동안 고정시키고 1 \times PBS로 3번 세척한 후 1ml의 Oil red O solution(Sigma, O0625)를 첨가하여 60분 동안 염색시키고 1 \times PBS를 이용하여 3번 세척한다. 세척 후 건조한 다음 isopropanol로 지방을 염색한 Oil red O solution를 추출하여 ELISA reader로 500nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

7) Western blot analysis

OP9세포의 분화가 끝난 후 Scrapper를 이용하여 세포를 모은다. 모아진 세포는 잔류물질을 제거하기 위하여 1 \times PBS를 사용하여 2-3번 세척한다. Radio Immuno Precipitation Assay lysis Buffer(RIPA lysis Buffer, 1% Nonidet P-40, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15M NaCl, 0.01M Sodium phosphate pH7.2, 2mM EDTA)로 세포를 용해시킨 후 Sonic & Materials INC에서 구입한 Ultrasonic Processor (VC-130PB)로 분쇄 후 12000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 취하여 -70°C에 보관하였다. 각 시료를 Bradford 방법에 따라 정량하고 9% SDS-PAGE에 전기영동하여 단백질을 분리한 다음 Transfer Buffer를 이용해 PVDF-membrane에 분리된 단백질을 전사시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 T-TBS(Blocking Buffer)로 room temperature에서 1시간 동안 충분히 흔들면서 방치하였다. 반응이 끝난 후 Blocking buffer에 1:1000으로 희석된 1차 항체를 넣고 4°C에서

반응시켰다. 반응 후 T-TBS로 7분 간격으로 3번 세척하고 blocking buffer에 1:5000으로 희석한 2차 항체를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응을 시켰다. TBS-T로 10분 간격으로 3번 세척한 후 ECL kit를 사용하여 발색을 시켜 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

8) 혈청, 조직분리 및 효소원의 조제

시료 투여가 끝난 실험동물을 주사기를 이용하여 심장으로부터 혈액을 채취하여 상온에서 30분간 방치한 후 원심분리기를 이용하여 4℃, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 혈청을 얻었다. 얻어진 혈청은 분석하기 전까지 -70℃ deep freezer에 보관하였다.

9) Liver로부터 Total Lipid 추출

적출된 간조직은 Folch et al.(1957) 방법에 의해서 Total lipid 추출하였다. Total lipid 추출하기 위해서 질소 탱크에 보관되어 있는 간조직을 ice에서 해동시킨 후 chloroform과 methanol을 2:1로 준비되어 있는 용액을 조직 샘플 1g당 20ml을 넣어 균질기로 균질화시킨 후 실온에서 15-20분 동안 orbital shaker에 놓아둔다. 10분 동안 원심분리를 하여 liquid 층만 남겨두고 다른 층은 피펫을 이용하여 버린 후 남아있는 Liquid 층에 0.2배의 0.9% NaCl solution으로 세척을 한 후 2000rpm에서 원심분리한다. 원심분리 후 남아있는 chloroform과 methanol의 잔류를 없애기 위해 건조시킨 후 methanol과 water를 1:1비율로 섞인 용액으로 지질을 녹여 Total-cholesterol, Triglyceride, High density lipoprotein (HDL) - cholesterol를 측정하였다.

10) 지질함량의 측정

Total-cholesterol은 Richmond 등의 효소법에 의하여 조제된 아산제약 kit (AM 202-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. Triglyceride 함량은 McGowan 등의 방법에 준하여 조제된 아산제약 kit (AM 157S-K, Asan)를 사용하여 실험하였으며 High density lipoprotein(HDL)-cholesterol 함량

은 Noma등의 효소법에 의하여 조제된 아산제약 kit (AM203-K, Asan)를 사용하여 실험하였다.

11) 통계 분석

결과는 평균값 ± 표준편차로 표현하였다. 통계 분석은 Student's t-test와 One-way ANOVA를 이용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 선호도조사

함초의 약리적 효능을 보존한 상태에서 선행 연구로 인해 in vitro HMG-CoA reductase 저해활성과 DPPH소거활성을 가지는 한약재들을 선택하여 함초와 배합하여 선호도 조사를 수행하였다.

2012년 4월 30일 시행된 선호도조사에서 함초단독과 진피와 함초, 산사와 함초, 감초와 함초 각 한약재를 1:1의 비율로 배합하여 90℃, 100ml의 물에 3분 동안 우려낸 후 거름망으로 걸러 비교분석한 결과 함초 단독보다는 진피와 함초, 산사와 함초, 감초와 함초 배합이 만족스러운 결과를 얻었다.

이를 바탕으로 진피, 함초, 산사비율이 3: 2: 1인 배합과 진피, 함초, 산사, 감초비율이 3: 2: 1: 0.5인 배합에 대한 평가를 함초단독 추출물과 20대에서 선호도를 비교분석한 결과 진피, 함초, 산사비율이 3: 2: 1인 배합은 19.23%, 진피, 함초, 산사, 감초비율이 3: 2: 1: 0.5인 배합은 61.54%로 높은 만족도를 얻었으며, 남성보다는 여성이 더 선호하는 경향이 있었다. 이에 진피, 함초, 산사, 감초비율이 3: 2: 1: 0.5인 배합 물을 HJ01이라 하였으며, HJ01이 지방세포 분화와 고지혈증 mouse 모델에서 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 본 연구에 사용된 한약재의 수율은 Table 1에 나타나 있다.

Table 1. Extraction Yield of Medicinal Herbs Used in This Study

Latin Name	Korean Name	Medicinal capacity(g)	Dry powder(g)	Yield(%)
Citri Reticulatae Pericarpium	진피(陳皮)	100	35.48	35.48
Crataegi Fructus	산사(山楂)	20	8.41	42
Glycyrrhizae Radix	감초(甘草)	100	21.95	21.95
Salicornia herbacea	함초(鹹草)	200	35.64	17.82
-	HJ01	214	60.5	28.27

*Abbreviation: Citri Reticulatae Pericarpium: CP, Crataegi Fructus: CF, Glycyrrhizae Radix: GR, Salicornia herbacea: SH

2. HJ01과 함초, 진피, 산사, 감초추출물이 세포 생존율에 미치는 영향

HJ01과 함초, 진피, 산사, 감초 단독이 세포 생존율을 미치는 영향을 확인하기 위하여 각 추출물의 농도가 50, 100, 200, 400, 600 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하

여 MTT assay를 수행한 결과, 어떠한 추출물도 처리되지 않은 대조군의 세포생존율을 100%로 나타냈을 때 함초와 감초의 경우는 농도의존적으로 생존율이 감소되었으나 진피와 산사의 경우 생존율이 더 높은 결과로 proliferation이 일어났음을 확인할 수 있었다. HJ01의 경우 농도의존적인

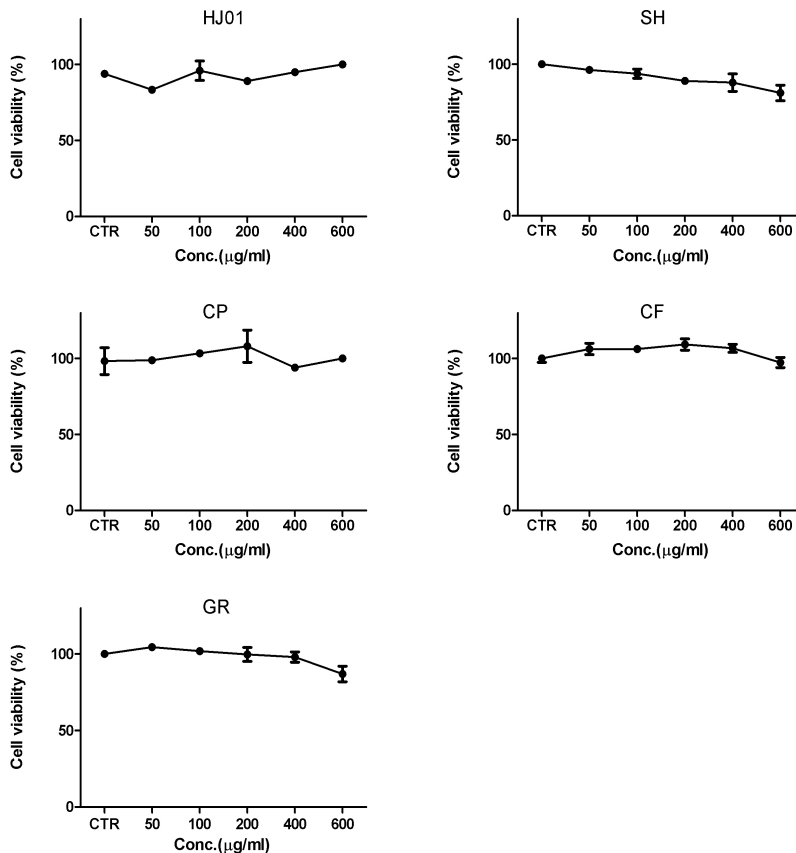


Fig. 1. Effect of water extractions on cell viability in OP9 cells. Cells were treated with various concentration of water extractions. The cell viability was evaluated by MTT assay as described in materials and methods. Values are mean \pm SD of duplicate.

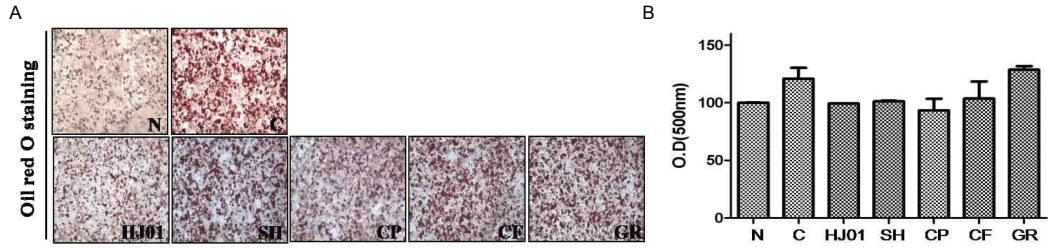


Fig. 2. Effect of extractions on fat accumulation in OP9 cells adipocyte differentiation. Cells were incubated with 100 μ g/ml concentration of each extractions. For OP9 cells differentiation into adipocyte, Cells were cultured in α -MEM medium containing 1 μ g/ml insulin, 1 μ M dexamethasone and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine for 2 days, and then in α -MEM medium containing 1 μ g/ml insulin for 2 days. After then α -MEM medium for 3days. N: Negative control, C: Positive control, SH: Salicornia herbacea, CP: Citri Reticulatae Pericarpium, CF: Crataegi Fructus, GR: Glycyrrhizae Radix. The Oil red O stain were accomplished as described in materials and methods. Values are mean \pm SD of duplicates. Significance; * indicates significance for the difference between normal and control group (* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001). # indicates significance for the difference between control and extraction treatment group(# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001).

경향성은 보이지 않으나 각 농도에 의해 세포생존율에는 영향을 미치지 않았다. 각 추출물의 100 μ g/ml 농도에서 함초, HJ01의 생존율은 각각 93.8%, 96% 세포생존율로 추출물에 대한 독성은 없는 것으로 확인하였으며 100 μ g/ml 농도로 다음 실험을 계획하였다(Fig. 1).

3. HJ01과 함초, 진피, 산사, 감초추출물이 지방 세포 분화에 미치는 영향

HJ01, 함초, 진피, 산사, 감초 추출물이 지방세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 OP9 세포에 최종농도가 100 μ g/ml로 처리하여 세포내 축적된 지방 (lipid droplet)을 관찰하고 그 양을 측정하였다.

10일 동안 분화를 유도함과 동시에 각 추출물을 처리한 후 Oil red O staining을 하여 분석한 결과, 분화를 유도하지 않는 negative control군보다 분화를 유도한 positive control군에서 lipid droplet이 현저하게 증가되어 분화가 유도되었음을 확인하였으며(Fig. 2A) 분화를 유도한 후 HJ01, 함초, 진피, 산사, 감초추출물을 처리 한 경우 산사와 감초를 제외하고는 lipid droplet의 생성이 감소됨을 확인하였다. 이에 Oil red O staining된 세포를 Isopropanol로 유리시켜 optical density를 측정한 결과 분화를 유도하지 않는 negative control군과 분화를 유도한 positive control군에서

negative control군의 지방축적이 100%일 때 분화가 유도된 positive control은 120%로 분화가 유도되었으며 함초의 경우는 101%, HJ01은 99.3%까지 억제 되었으나 유의성 있는 결과는 얻지 못하였다(Fig. 2B).

4. 지방세포 분화로 추출물이 세포 밖 pH변화에 미치는 영향

지방세포 분화를 유도하여 HJ01, 함초, 진피, 산사, 감초 추출물이 세포 밖의 pH에 미치는 영향을 확인하기 위하여 분화를 유도하지 않고 추출물을 처리한 군과 분화 유도과 동시에 추출물을 처리한 군의 배양액을 모아 pH meter를 이용하여 세포 밖의 pH변화를 측정하였다. 그 결과 지방세포 분화에 있어서 세포 밖의 pH 변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인하였다(Fig. 3).

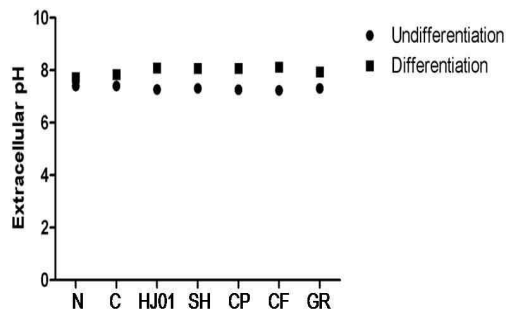


Fig. 3. Extracellular pH transition on adipocyte differentiation.

5. HJ01이 Adipocyte differentiation, glucose uptake, lipid accumulation에 미치는 영향

HJ01, 함초, 진피, 산사, 감초 추출물이 지방세포 분화를 유도하는 데에 있어서 transcription factor 중 하나인 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)활성화로 인해 일어나는 adipocyte differentiation, glucose uptake, lipid accumulation 중 direct target을 찾기 위하여 western blot analysis를 통하여 분석하였다. Adipocyte differentiation marker로는 C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein), STAT1, STAT 5A, STAT 5B 등이 이에 속하며, glucose uptake marker로는 GLUT4, IRS-1/2, adiponectin 등이 포함되며, lipid accumulation marker로 ap2, PEPCK, Leptin 등이 포함된다. PPAR γ 는 함초단독에 비하여 HJ01에서 감소하는 효과를 보였으며 이에 따른 adipocyte differentiation를 거치는 C/EBP α 또한 감소함을 보였다. Glucose uptake에 관여하는 adiponectin은 PPAR γ , C/EBP α 와는 반대로 HJ01에서 증가함을 보였다. 이들의 결과 HJ01은 세포 내의 glucose를 uptake를 하면서 지방분화를 감소시킴을 확인 할 수 있었다(Fig. 4).

6. P-407로 고지혈증을 유발한 동물모델에서 지

질함량 변화 측정

HJ01이 함초 단독보다 지방세포 분화를 억제한다는 결과를 바탕으로 mouse에 외인성 고중성 지방혈증인 P-407로 고지혈증 모델을 만들어 혈청과 liver조직에서의 지질 함량지방을 측정하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

7주령된 Male C57BL7 mice에 Poloxamer-407로 4주 동안 3일에 1회 복강주사하여 고지혈증을 임의적으로 유발하고 동시에 함초단독과 비교실험을 위한 타사제품과 HJ01 0.5배군, HJ01 1배군, HJ01 2배군을 1일 2회 경구투여(Table 2.)하였다. 최종일에 절식을 한 후 심장체혈로 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고 간조직을 적출하여 Folch et al.(1957)에 의한 방법에 따라 지질을 분리하여 혈청과 지질로부터 Total-cholesterol, Triglyceride, High density lipoprotein(HDL)-cholesterol를 분석하였다.

혈청에서의 지질 함량 변화를 확인한 결과 대조군에 비해 P-407로 고지혈증을 유발시킨 그룹에서 total-cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol의 수치가 유의성 있게 증가함을 보여 고지혈증 모델이 만들어졌음을 확인하였으며, 추출물에 대한 효과를 관찰하기 위하여 고지혈증을 유발시킨 그룹과 고지혈증을 유발시킴과 동시에 약물을 투여한 그룹을 비교하였다. 그 결과 HJ01

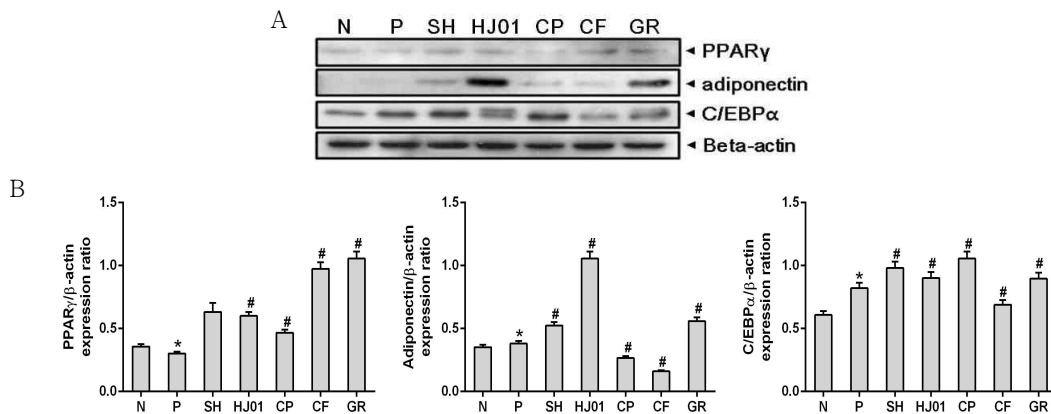


Fig. 4. Effect of water extractions on protein expression in OP9 cell. (A) Level of protein expression in OP9 cell by western analysis. (B) Quantitative analysis by Image J Program. Significance; * indicates significance for the difference between normal and control group($p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). # indicates significance for the difference between control and extraction treatment group(# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$). Error bars indicate SDs; $n = 3$.

Table 2. Treatment Group

Name	Dose(g/kg/day)
HJ01 (×0.5)	0.1
HJ01 (×1)	0.2
HJ01 (×2)	0.43
Salicornia herbacea	0.67
Other product	0.56

The mice were orally administrated HJ01 various concentration, Salicornia herbacea and other product.

를 투여한 그룹의 혈중 total-cholesterol의 함량이 유의성 있게 증가되었고, HJ01의 농도가 증가함에 따라 total-cholesterol의 함량이 유의성 있게 감소하는 결과를 확인할 수 있었다. 혈중 HDL-cholesterol의 함량은 혈중 total-cholesterol과 같은 경향성을 보이거나 HJ01 1배군을 투여한 그룹에서 유의성 있었다. 하지만 혈중 Triglyceride의 함량변화는 확인하지 못하였다 (Fig. 6).

간 조직에서의 지질함량변화를 측정된 결과 P-

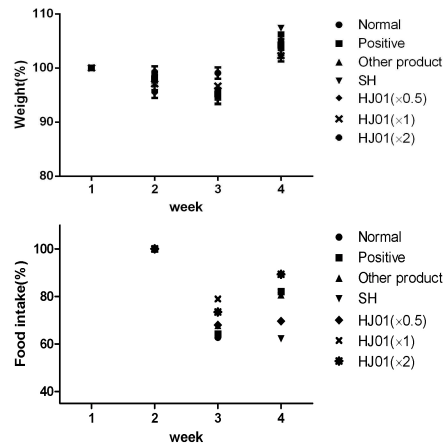


Fig. 5. Mouse weight(%) and Food intake (%) change in hyperlipidemia model. Body weight and food intake was measured once a week for four weeks. $n=12$

함량은 대조군과 비교하여 차이가 없었으나 triglyceride, HDL-cholesterol의 함량은 유의성 있게 증가하였는데 고지혈증을 유발한 후 HJ01

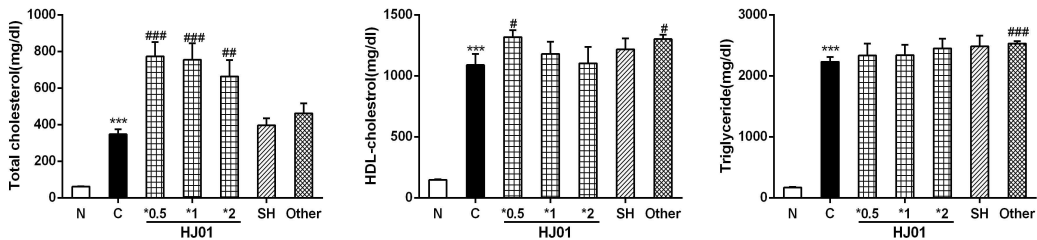


Fig. 6. Total-cholesterol, Triglyceride, High density lipoprotein (HDL) - cholesterol transition in the serum of hyperlipidemia model. * indicates significance for the difference between normal and control group ($p<0.05$, $^*p<0.01$, $^{***}p<0.001$). # indicates significance for the difference between control and drug orally administrated group ($^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$, $^{\#\#\#}p<0.001$). Error bars indicate SDs; $n=12$

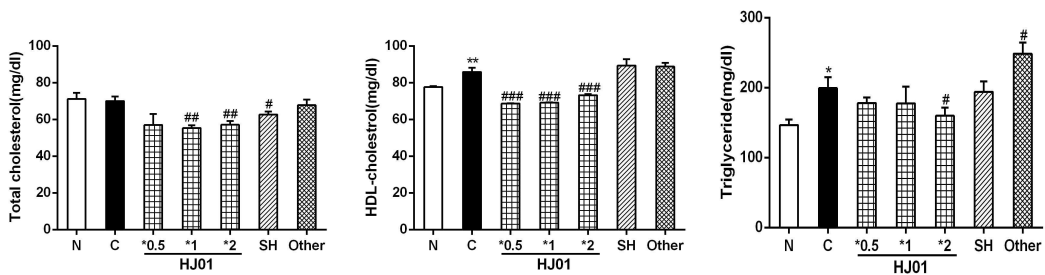


Fig. 7. Total-cholesterol, Triglyceride, High density lipoprotein (HDL) - cholesterol transition in the liver tissue of hyperlipidemia model. * indicates significance for the difference between normal and control group ($p<0.05$, $^*p<0.01$, $^{***}p<0.001$). # indicates significance for the difference between control and drug orally administrated group ($^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$, $^{\#\#\#}p<0.001$). Error bars indicate SDs; $n=12$

407로 고지혈증을 유발한 그룹의 total-cholesterol 을 투여하였을 때 total-cholesterol은 1배군과

2배군에서 유의성 있게 감소되는 것을 확인할 수 있었으며 HDL-cholesterol의 경우 0.5배군, 1배군, 2배군에서 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있었다. Triglyceride 함량은 단독으로 함초만 투여한 경우 변화가 없었으며 타사제품이 유의성 있게 높이는 결과를 보였으나 HJ01을 투여한 경우에는 유의성 있는 결과는 확인하지 못하였지만 Triglyceride 함량을 낮추는 경향성은 보였다 (Fig. 7).

또한 4주간의 몸무게 변화와 사료 손실량을 분석해 본 결과 4주에는 몸무게가 증가함을 확인할 수 있었으나 그룹별로 차이는 없었으며, 일반먹이 섭취에 따른 변화에서는 첫주에 비하여 섭취량은 감소하였으나 4주차에서는 함초단독과 HJ01 0.5 배군에서 대조군에 비해 감소됨을 확인하였다 (Fig. 5).

이상의 결과 HJ01은 고지혈증에서 간조직의 콜레스테롤과 Triglyceride 축적을 억제하며 혈중으로 콜레스테롤이 분비되어 체내에서 사용될 수 있도록 하는 것으로 생각된다.

IV. 결 론

고지혈증에 상용할 수 있는 한약추출물을 개발 목적으로 군산지역의 특산물인 함초와 선행연구를 통하여 약리효과가 입증된 진피, 산사, 감초를 배합하여 가장 선호도가 높았던 함초, 진피, 산사, 감초를 2: 3: 1: 0.5의 비율을 택하여 효능을 검증하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

OP9 stroma cell에서 지방세포 분화유도와 지방축적에 대한 효능시험 결과 함초 단독보다는 HJ01에서 분화 유도가 억제됨을 확인하였으며, 지방세포분화와 관련된 transcription factor인 PPAR γ 는 HJ01처리군에서 down-regulation하였으며, glucose uptake에 관여하는 adiponectin은 HJ01처리하였을 때 up-regulation함을 보였다.

P-407로 고지혈증을 유발시킨 mouse에 HJ01 투여하였을 때 간조직의 콜레스테롤과 Triglyceride 축적을 억제함을 확인하였으며 이는 혈중으로

콜레스테롤이 분비되어 체내에서 사용될 수 있도록 하는 것으로 생각할 수 있다.

이상의 결과로 HJ01은 지방세포에 대해서는 지방세포로의 분화를 억제하며 이 때 세포의 glucose uptake를 촉진시키는 것으로 생각되므로 이를 토대로 후속연구가 필요할 것으로 사료되며 여성들의 비만예방 목적으로 활용가능성이 있다.

감사의 글

본 연구는 전라북도 생물산업진흥원과 군산시청의 고부가가치식품 가공기술개발지원사업의 지원을 받아 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 김영식. Practice Guidelines for Assessments and Recommendations of Laboratory and Physical Measurements in Korea National Screening Program. Ulsan:Ulsan university. 2009.
2. 김재중. 고지혈증의 특성과 치료. 서울:약업신문사. 1994:50-3.
3. 이애경. 건강검진의 질 향상을 위한 검진기관의 질 관리 방안. 서울:국민건강보험공단. 2007:238.
4. 전국한의학대학 심계내과학교실편. 동의심계내과학. 서울:서원당. 1995:437-63.
5. 고지혈증치료지침 제정위원회 편. 고지혈증과 동맥경화증. 서울:신광출판사. 1998:27-28.
6. Joo DS, Lee JK, Chol YS, Cho SY, Je YK, Chol JW. Effect of seatangle oligosaccharide drink on serum and hepatic lipids in rats fed a hyperlipidemic diet. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2003;32:1364-9.
7. 김경란, 장미진, 최상원, 우미희, 최정화. 효소처리한 함초 열수추출물이 고콜레스테롤 식이 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 2006;35:55-60.
8. Rhee MH, Park HJ, Cho JY. Salicornia herbacea: botanical, chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant. J Med Plants Res. 2009;3:548-55.

9. Shin KS, Boo HO, Jeon MW, Ko JY. Chemical components of native plant, *Salicornia herbacea* L. Korean J Plant Res. 2002;15:216-20.
10. Park SH, Ko SK, Choi JG, Chung SH. *Salicornia herbacea* prevents high fat diet-induced hyperglycemia and hyperlipidemia in ICR mice. Arch Pharm Res. 2006;29:256-64.
11. Chung YC, Chun HK, Yang JY, Kim JY, Han EH, Kho YH, Jeong HG. Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from *Salicornia herbacea*. Arch Pharm Res. 2005;28:1122-6.
12. Sung JH, Park SH, Seo DH, Lee JH, Hong SW, Hong SS. Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *Salicornia herbacea*. Biosci Biotechnol Biochem. 2009;73:552-6.
13. Ha BJ, Lee SH, Kim HJ, Lee JY. The role of *Salicornia herbacea* in ovariectomy-induced oxidative stress. Biol Pharm Bull. 2006;29:1305-9.
14. Kong CS, Kim YA, Kim MM, Park JS, Kim JA, Kim SK, Lee BJ, Nam TJ, Seo Y. Flavonoid glycosides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells. Toxicol In Vitro. 2008;22:1742-8.
15. Kim JH, Wang SG. Effects of Mugwort, Dried Orange Peel and Duchung on Lipid Metabolism in Hyperlipidemia Rats. Korean J Nutr. 1997;30:895-903.
16. Park CH, Jeong HK, Jeong YS, Hong JH, Lee GD, Park CD. Effects of Citrus Peel Ethanol Extract on the Serum Lipid and Body Fat of High-fat-diet-fed Rats. Korean J Food Preserv. 2011;18:567-74.
17. Kurowska EM, Borradaile NM, Spence JD, Carroll KK. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juice in rabbits. Nutr Res. 2000;20:121-9.
18. 최중환, 이규문, 김현주, 김승환, 김학성, 노재섭, 오기완, 이경순. 진피 복합체 복용과 운동이 비만 여성의 체격, 체지방 및 혈중지질에 미치는 영향. 생약학회지. 2002;33:57-63.
19. 권순혁, 김경범.山楂가 흰쥐의 식이성 高脂血症에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2010;24:67-73.
20. Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. J Ethnopharmacol. 1995;49:57-68.
21. 정보섭, 신민교. 도해 향약(생약)대사전. 전주:영림사. 1998:684-7.
22. Saitoh Y, Xiao L, Mizuno H, Kato S, Aoshima H, Taira H, Kokubo K, Miwa N. Novel polyhydroxylated fullerene suppresses intracellular oxidative stress together with repression of intracellular lipid accumulation during the differentiation of OP9 preadipocytes into adipocytes. Free Radic Res. 2010;44:1072-81.
23. Ryden M, Dicker A, Götherström C, Aström G, Tammik C, Arner P, Le Blanc K. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2003;311:391-7.
24. Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Tzekov A, Park C, Choi K, Bickel PE. OP9 mouse stromal cells rapidly differentiate into adipocytes: characterization of a useful new model of adipogenesis. J Lipid Res. 2006;47:450-60.
25. Johnston TP. The P-407-induced murine model of dose-controlled hyperlipidemia and atherosclerosis: a review of findings to date. J Cardiovasc Pharmacol. 2004;43:595-606.
26. Joo IW, Ryu JH, Oh HJ. The influence of Sam-Chil-Geun (*Panax notoginseng*) on the serum lipid levels and inflammations of rats with hyperlipidemia induced by poloxamer-407. Yonsei Med J. 2010;51:504-10.
27. Lee YS, Kim YW, Kim SG, Lee I, Lee MG, Kang HE. Effects of poloxamer 407-induced hyperlipidemia on the pharmacokinetics of carbamazepine and its 10,11-epoxide metabolite in rats: Impact of decreased expression of both CYP3A1/2 and microsomal epoxide hydrolase. Eur Neuropsychopharmacol 2012;22:431-40.
28. Vaidya H, Rajani M, Sudarsanam V, Padh H, Goyal R. Antihyperlipidaemic activity of swertiamarin, a secoiridoid glycoside in poloxamer-407-induced hyperlipidaemic rats. J Nat Med. 2009;63:437-42.