

## 세포 내 지방생성과 Glut-4 의존성 포도당 운반에 미치는 발효복합한약 물추출물(F-MAPC)의 영향

전서영<sup>1#</sup>, 박지영<sup>1</sup>, 김성옥<sup>1</sup>, 이은실<sup>2</sup>, 구진숙<sup>3</sup>, 김미려<sup>1,4\*</sup>

1 : 한의치료 기술과학화 사업팀(BK 21 Plus) & 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실,  
2 : 영농조합법인 이도, 3 : 안동대학교 자연과학대학 생약자원학과, 4 : (재)대구TP한방산업지원센터

### Water Extract of Fermented New Korean Medicinal Mixture (F-MAPC) Controls Intracellular Adipogenesis and Glut-4 dependent Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes and L6 Myoblasts

Seo Young Jeon<sup>1#</sup>, Ji Young Park<sup>1</sup>, Sung Ok Kim<sup>1</sup>, Eun Sil Lee<sup>2</sup>, Jin Suk Koo<sup>3</sup>, Mi Ryeo Kim<sup>1,4\*</sup>

1 : Team for Scientification of Korean Medical Intervention (BK21 Plus) & Dept. of Herbal Pharmacology, Coll. of Oriental Medicine, Daegu Haany Univ, Daegu, Republic of Korea  
2 : Ido Co. Ltd., Pohang, Gyeongbuk, Republic of Korea  
3 : Dept. of Medicinal Plant Resources, Coll. of Natural Sciences, Andong National Univ, Andong, Gyeongbuk, Republic of Korea  
4 : Oriental Medical Industry Support Center, Daegu Technopark, Daegu, Republic of Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : The aim of this study was to investigate the effects water extract of fermented new korean medicinal mixture, combinations of Mori Folium, Adenophorae Radix, Phllostachyos Folium and Citri Pericarpium (F-MAPC), on adipocyte differentiation, adipogenesis and glucose uptake using undifferentiated 3T3-L1 adipocytes and L6 myoblasts.

**Methods** : Each herb and those mixture were respectively fermented and then extracted with water. We carried on MTT assay for check-up on cell toxicity, Oil Red O staining for determination of cell differentiation and intracellular adipogenesis. Western blot analysis for measurement of pAMPK and pACC, C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  and Glut-4 protein expressions were performed.

**Results** : F-MAPC showed significant inhibitory activity on adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocytes without affecting cell toxicity as assessed by measuring fat accumulation, and this effect was 2 fold higher in 0.2 mg/ml F-MAPC than that of the same dose of each fermented herbal extract alone. In addition, these effects were associated with modulation of adipogenic transcription factors, such as C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , as well as stimulated phosphorylations of AMPK and ACC. Translocation of Glut-4 was significantly increased by 10.2% in L6 cells treated with 0.2 mg/ml F-MAPC compared with that of control.

**Conclusions** : These results demonstrate that F-MAPC may be an ideal candidate for therapy of obesity and diabetes by disturbing the differentiation into adipocytes, as well as the inducement of intramuscular glucose uptake from blood.

**Key words** : Fermentation, Mori Folium, Adenophorae Radix, Phllostachyos Folium, Citri Pericarpium, anti-obesity

### 서론

2010년 국민건강영양조사 발표에 따르면 우리나라 성인의

비만율은 30.8%(남자 36.3%, 여자 24.8%)로서, 남성의 비만율이 여성보다 높게 나타났으며, 특히 19세 이상 남성 비만율은 10년째 지속적인 증가 추세를 보이고 있다<sup>1)</sup>.

\*교신저자 : 김미려, 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, (재)대구테크노파크 한방산업지원센터

· Tel : 053-770-2241 · Fax : 053-770-2241 · E-mail : mrkim@dhu.ac.kr

#제1저자 : 전서영, 대구광역시 수성구 상동 165번지 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

· Tel : 010-2548-8672 · E-mail : seoyid@naver.com

· 접수 : 2013년 12월 12일 · 수정 : 2014년 1월 20일 · 채택 : 2014년 1월 20일

비만은 유전적, 사회적, 환경적 요인 등과 같은 다양한 원인에 의해서 발병하는데, 과도한 에너지 섭취 후 체조직에 과잉의 지방이 축적된 상태<sup>2)</sup>를 의미한다. 비만은 고지혈증, 심장병, 심혈관 질환, 동맥경화 등 각종 대사성 질환과 심각한 합병증을 유발하는데, 정상체중인 사람에 비해 비만인 사람에게 합병증인 고혈압(2.5배), 당뇨병(2.0배), 고중성지방혈증(2.4배) 등이 동반될 위험이 크다고 보고되고 있다<sup>3,4)</sup>.

3T3-L1 전지방세포(preadipocyte)가 지방세포로 분화되는 과정은 세포의 형태, 유전자 및 단백질의 발현, 호르몬 민감성의 변화 등을 수반<sup>5)</sup>하며, CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)과 peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ )를 중심으로 adipogenesis를 조절하면서 분화가 진행 된다<sup>6)</sup>. 이러한 지방세포의 분화를 저해하기 위하여 운동요법, 식이요법, 약물요법 및 외과적 수술 등의 다양한 방법들이 이용되고 있다. 이들 비만조절 요법 중 약물 치료제인 sibutramine (Reductil), orlistat (Xenical)과 같은 제제의 부작용(복통, 변비, 불면, 혈압의 상승 등)이 보고되면서 안전성과 유효성이 입증된 치료제의 개발이 요구되고 있는 실정이다<sup>7)</sup>. 또한, 본 연구에서 양성대조군으로 쓰인 rosiglitazone은 임상에서 잘 알려져 있는 제2형 당뇨병 치료제로 체내 특히, 지방세포에 분포하는 PPAR $\gamma$  수용체와 결합하여 자유지방산 및 tumor necrosis factor  $\alpha$ , resistin, adiponectin 등 인슐린 저항성을 일으키는 매개체의 발현 및 분비를 방해하여 인슐린 감수성을 증가시키는 작용이 있다고 알려져 있다. 그러나 간독성, 말단부종과 심혈관계 질환 및 혈중지질을 증가시키는 등의 치명적인 부작용으로 인해 현재 판매가 중지된 상태이다. 따라서 안전성이 확보된 천연물로부터 항비만을 포함한 항당뇨, 항염증 효능을 보유한 소재 발굴에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

한편, 발효한약이란 한약재를 적정 온도 및 습도의 조건하에서 미생물과 함께 배양할 때 미생물이 가지고 있는 효소에 의해 한약재 중 유기물이 분해, 변화되어 본래의 효과보다 증강되거나 새로운 효능이 생겨 치료에 유용하게 적용되는 한약을 말한다<sup>8)</sup>. 이러한 발효한약은 농약이나 독성과 같은 각종 유해물질로부터 안전하여 부작용이 없고 맛이 순해 소아용으로 적용 가능하며, 저분자화 되어서 탕전에 비해 빠른 약효, 용이한 소화, 유효성분의 증가된 흡수율을 기대할 수 있다. 최근 발효 한약에 대한 연구로는 대사증후군, 보양작용, 만성 피로, 스트레스 등 피로회복, 동맥경화, 심장질환 등 혈액순환 개선, 당뇨 조절, 간 기능 개선 효과 및 면역증강 등 다양한 질병을 대상으로 활발히 진행, 보고되고 있다<sup>9,10)</sup>.

본 연구에서 사용한 상엽(桑葉, Mori Folium)은 뽕나무 *Morus alba* L. 동속 근연식물(뽕나무과, Moraceae)의 잎으로, flavonoid (rutin, quercetin) 성분 및  $\alpha$ -glucosidase 저해기능을 갖는 steroid, amino acid, vitamin과 같은 성분 뿐 만 아니라 다량의 무기질, 섬유소와  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA)도 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다<sup>11)</sup>. 약리작용으로는 항당뇨, 항고혈압, 혈당강하 작용, 체지방 축적 억제 효능<sup>12)</sup> 등이 있으며 한의학적으로는 소산풍열(疏散風熱), 청간명목(淸肝明目), 청선폐열(淸宣肺熱)하여 주로 풍열(風熱)로 인한 풍열표증(風熱表證), 목적종통(目赤腫痛), 외감해수(外感咳嗽)를 치료한다<sup>13)</sup>. 사삼(沙參, Adenophora Radix)은 잔대 *Adenophora triphylla* var. japonica Hara

또는 기타 동속식물(도라지과, Campanulaceae)의 뿌리이다. 주성분으로 뿌리 중의 사삼사포닌인 triterpenoidal saponins이 함유되어 있다. 약리작용으로는 강심작용, 항진균 작용 및 滋肺養陰祛痰, 益胃生津등의 효능이 있어 肺燥肺熱咳嗽, 胃陰虛證에 사용한다<sup>14)</sup>. 또 다른 연구보고에 따르면 사삼 물추출물의 멜라닌 형성 억제 효과<sup>15)</sup> 등이 보고되어 있다. 죽엽(竹葉, Phyllostachyos Folium)은 벼과(Gramineae)에 속하는 여러 해 살이 상록교목인 쑥대의 잎을 건조한 것으로 항균작용, 항염작용 등의 약리작용이 있으며<sup>16)</sup>, 흰 쥐에서 알콜-유도 고지혈증과 간 손상의 예방효과<sup>17)</sup> 등이 보고되어 있다. 진피(陳皮, Citri Pericarpium)는 귤(*Citrus unshiu* Markovich)는 기타 동속 근연식물(산초과, Rutaceae)의 성숙한 과피이다. 약리작용으로 위액분비 촉진작용, 소염 작용, 자궁억제 작용<sup>18)</sup>과 고지방식이를 섭취한 흰쥐의 체내지질대사에 미치는 영향, 비만세포 매개성 염증 질환 치료효과<sup>19)</sup> 등에 관한 실험연구가 보고되어 있다.

상엽, 사삼, 죽엽, 진피의 각각 한약재에 대한 효능 및 응용에 관한 연구는 활발히 이루어지고 있는 반면 상엽, 사삼, 죽엽, 진피를 발효한 복합 물추출물(F-MAPC)에 대한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 발효과정을 거친 이들 한약재 복합 물추출물의 효능을 평가하고자 3T3-L1 지방세포와 L6 근육세포에서 각각 지방생성 및 포도당 운반에 미치는 영향을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재 및 추출방법

본 실험에서 사용한 발효시료는 영농조합법인 이도에서 공급받아 사용하였으며, 상엽(영천산), 사삼(청송산), 죽엽(포항산), 진피(제주산)의 혼합물을 세척, 건조한 시료를 멸균하고, *Aspergillus oryzae*를 첨가하여 발효를 수행한 후, 숙성, 건조 후 재선별, 뒤음 공정으로 각각 진행하였다. 발효된 시료는 상엽, 사삼, 죽엽, 진피를 각각 4:3:2:1의 비율로 혼합하고 10배 중량의 증류수를 가하여 약 96°C에서 8시간 동안 열수 추출법을 시행한 후에 얻어진 추출액을 여과, 농축한 후 동결건조를 통하여 수득율 18.6%의 발효복합한약재 추출물(F-MAPC)의 건조분말을 얻었다.

#### 2) 시약 및 기기

Dexametasone (DEX), 3-isobutyl-1-me thylxanthine (IBMX), 3-[4,5-dimethyl thiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DM SO), insulin, Krebs-Henseleit buffer modified (KHB buffer), Oil-red O 시약은 Sigma Aldrich사(USA)에서 구입하였으며, high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), bovine calf serum (BCS), fetal bovine serum (FBS), penicillin streptomycin (P/S), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), electrochemiluminescence (ECL)은 Thermo Scientific사(USA)에서 구입하였다.

AMP-activated protein kinase (AMPK), pAMPK,

Acetyl CoA carboxylase (ACC), pACC 항체는 cell signaling technology사(USA)에서 구입하였고, proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ), CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), glucose transporter 4 (Glut-4),  $\beta$ -actin 1차 항체 및 2차 항체는 Santa Cruz사(USA)에서 구입하였다. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane은 Roche사(Germany)에서 구입하였다. 양성대조군으로 쓰인 rosiglitazone (Rosi)은 Enzo사(Farmingdale, NY, USA)에서 구입하였으며, 그 외 언급하지 않은 모든 시약들은 분석용 등급 이상으로 구입하여 본 실험에 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 세포배양

#### (1) 3T3-L1 세포 배양 및 분화유도

마우스 지방세포 3T3-L1 세포주는 American type culture collection (ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포는 10% BCS, 1% P/S 을 포함한 DMEM 배지를 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기(MCO-15AC, SANYO, Japan)에서 배양시킨 후 배양액을 분화유도 배양액 (0.5 mM IBMX, 2  $\mu$ M DEX, 2  $\mu$ g/ml insulin / 10% FBS)으로 바꾸어 F-MAPC 약물을 처리하여 2일간 배양한다. 2일 후 2  $\mu$ g/mL insulin/10% FBS 배지로 교환하며, 약물을 이틀에 한 번씩 처리하였다.

#### (2) L6 세포 배양 및 분화유도

랫트 L6 myotube 세포주는 ATCC에서 구입하여 사용하였으며, 선행 연구<sup>20)</sup>와 같이 10% FBS와 P/S이 함유된 DMEM 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양시켜 실험에 사용하였으며, 약물 처리 등은 3T3-L1 세포배양과 동일한 방법으로 수행하였다.

### 2) 세포 생존율 측정

3T3-L1 및 L6 세포를 96well plate에 2\*10<sup>6</sup> cells/ml로 분주하여 안정화시킨 후 F-MAPC 약물을 농도 별로 24 시간 처리하였다. 배양 후 배지를 제거하고 MTT 시약을 0.5 mg/ml 농도로 첨가하고 2시간 뒤 생성된 불용성 결정을 DMSO로 완전히 녹인 다음, microplate reader (TECAN Austria GmbH, Austria)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 실험결과인 세포 생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

### 3) Oil-red O 염색

F-MAPC가 3T3-L1 지방세포의 분화 및 지방축적에 미치는 영향을 조사하기 위해서 Oil-red O 염색을 수행하였다. 세포분화 중에 F-MAPC를 각각 다른 농도(0.05, 0.15, 0.2 mg/mL)로 처리하였다. 10일 후 세포배양액 제거 후 D-PBS로 세척하고 10% formaldehyde가 포함된 cacodylate buffer로 4°C에서 세포를 고정하고, 증류수로 세척하여 지방구를 Oil-red O 염색시약으로 염색한 다음 세척하여 현미경(CK2, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 염색

된 지방세포의 지방함량 측정을 위해 100% isopropyl alcohol로 지방을 추출하여 510 nm 파장에서 분광광도계 (Lambda UV/VIS, Perkin Elmer, USA)로 흡광도를 측정 한 다음, 처리군의 지방량을 대조세포에 대한 %로 표시하였다.

### 4) 세포막 단백질 분리

분화한 L6 세포를 FBS 무첨가 DMEM에서 일정시간 배양한 후, insulin과 0.2 mg/ml 농도의 F-MAPC 약물을 처리하였다. 세포 배양액을 제거하고, KHB buffer로 세척한 후, RIPA buffer를 처리하여 스크레이퍼를 이용하여 세포를 떼어낸 후 용해하였다. 이 균질액을 500×g, 4°C에서 10분간 원심분리한 다음, 그 상층액을 취한 후, 다시 12,000×g, 4°C에서 1시간 동안 원심분리하였다. 그 pellet을 다시 완충액에 균질화한 다음, 15,000×g, 4°C에서 15분간 원심분리하고 그 상층액을 세포막 단백질 분석시료로 이용하였다.

### 5) Western blot 분석

시료 처리 5일 후에 적정량의 단백질을 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-PAGE에 분리한 후, PVDF membrane으로 200 mA로 2시간 동안 전이시켰다. 단백질 전이된 membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하고, 적절한 1차 항체 (pAMPK, AMPK, pACC, ACC, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$ -actin, Glut-4)를 4°C에서 하룻밤 처리하였다. TBS-T로 세척한 후, 1시간 동안 상온에서 2차 항체와 반응시킨 후 세척 하고, ECL 시약을 처리하여 X-ray film에 감광시켜 타겟 단백질 발현량을 관찰하였다.

### 6) 통계학적 검정

통계처리(Student's t-test)는 GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하였고, 대조세포에 대한 유의성 검증은 p<0.05 수준에서 실시하였다.

## 결 과

### 1. 발효복합한약 물추출물(F-MAPC)이 세포생존율에 미치는 영향

F-MAPC가 세포들에게 미치는 독성 영향을 알아보기 위해 3T3-L1 과 L6 세포에 0.05~1 mg/ml 농도의 F-MAPC를 각각 처리하고 MTT 분석법을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 그 결과, 두 세포 모두 F-MAPC의 처리농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다. 따라서 본 실험에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도인 0.2 mg/ml 농도에서 이후 실험들을 진행하였다(Fig. 1).

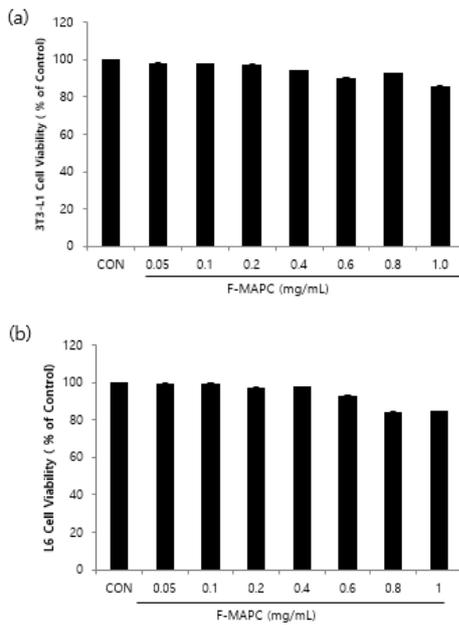


Fig. 1. Effects of F-MAPC on cell viabilities in 3T3-L1 and L6 cells. Data represent the mean  $\pm$  S.E. of duplicate determinations from three separate experiments.

## 2. 단일발효 물 추출물인 상엽(F-M), 사삼(F-A), 죽엽(F-P), 진피(F-C)가 3T3-L1 세포의 지방축적에 미치는 영향

한약재 상엽(F-M), 사삼(F-A), 죽엽(F-P), 진피(F-C)의 단일 발효한 물 추출물이 지방분화 및 지방축적에 미치는 영향을 조사하기 위해서 Oil-red O 염색법으로 세포 내 지방 입자의 크기를 관찰한 결과, 0.2 mg/ml의 농도에서 단일발효 한약재 추출물의 지방축적 억제 정도는 대조세포에 비하여, 발효죽엽(45.3%) > 발효사삼(43.7%) > 발효진피(24.5%) > 발효상엽(23.1%)의 순서로 억제효과를 나타내었으며, 그 중 죽엽(F-P) 단일 발효추출물의 지방축적 억제가 가장 우수하였다(Fig. 2).

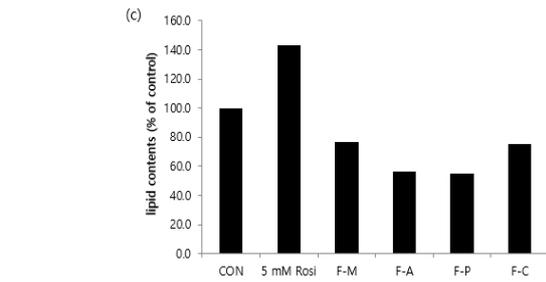
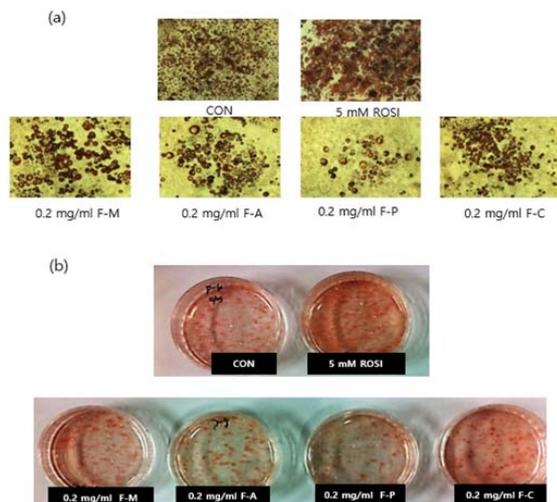


Fig. 2. Effects of each fermented Mori Folium (M), Adenophorae Radix (A), Phlostachyos Folium (P) and Citri Pericarpium (C) extract on cell differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with the same dose (0.2 mg/ml) of single fermented herbal extract, respectively. Images of representative cells (a) captured with a microscope, (b) scanned and (c) quantified by the lipid accumulation using spectrophotometer.

## 3. 발효복합한약 물추출물(F-MAPC)이 3T3-L1 세포의 지방축적에 미치는 영향

F-MAPC 처리 후 Oil-red O 염색을 실시한 결과, 0.05, 0.15, 0.2 mg/ml의 처리농도에서 대조세포에 비하여 36%, 48.8%, 67.4%로 처리농도 의존적으로 지방축적을 억제하는 것으로 나타내었다. 또한 단일 한약재 발효 추출물 0.2 mg/ml 농도처리 시의 평균 지방축적 억제율인 34.3%에 비해 발효복합 추출물 처리 시 지방축적이 2배 이상 억제됨으로써 복합물에서 지방축적 억제효과가 상승적으로 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3).

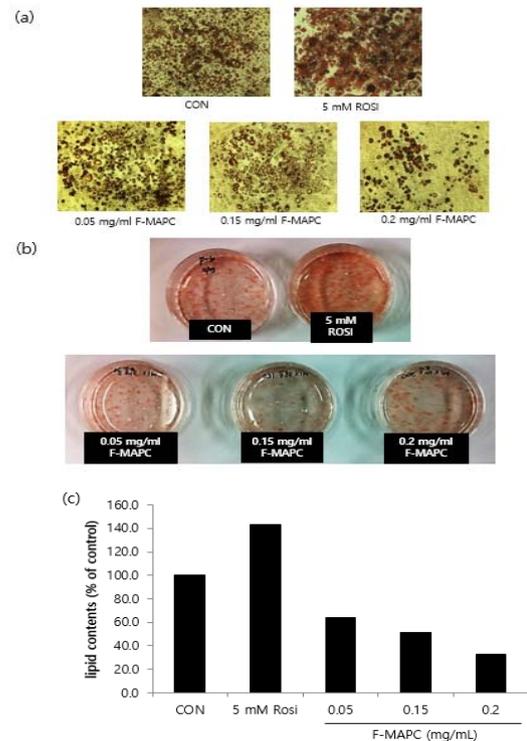


Fig. 3. Effect of F-MAPC on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with various doses (0.05, 0.15 and 0.2 mg/ml) of F-MAPC aqua extract. Images of representative cells (a) captured with a microscope, (b) scanned, and (c) quantified by the lipid accumulation using spectrophotometer.

#### 4. 발효복합한약 물추출물(F-MAPC)이 3T3-L1 지방세포에서 AMPK, ACC, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 단백질 발현에 미치는 영향

F-MAPC 처리가 3T3-L1세포에서 비만관련 지표인 AMPK, ACC, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 의 발현에 대한 영향을 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 그 결과, 3T3-L1 지방세포가 분화하는 동안 처리한 F-MAPC는 대조세포에 비하여 세포 내의 에너지 상태와 관련 있는 AMPK 인산화 뿐만 아니라 지방 생성 및 지방산 산화와 유관한 ACC 인산화를 유의적으로 증가시켰다. 또한, 초기 지방세포 분화 및 지방합성 관련인자인 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 의 발현이 유의적인 수준으로 억제되었다(Fig. 4).

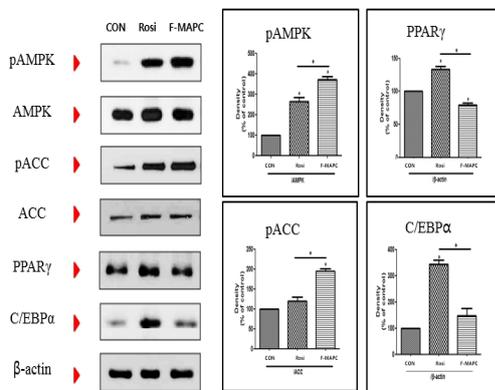


Fig. 4. Effect of F-MAPC on AMPK and ACC phosphorylations, PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  protein expressions in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with 0.2 mg/ml of F-MAPC,  $p < 0.05$  vs CON

#### 5. 발효복합한약 물추출물(F-MAPC)이 L6 세포에서 Glut-4 단백질 발현에 미치는 영향

F-MAPC 처리가 L6세포에서 Glut-4 의존성 포도당 운반에 미치는 영향을 관찰하였다. 세포질에 존재하는 Glut-4 단백질은 인슐린 자극에 의해 세포질에서 세포막으로 이동하여 혈액으로부터 세포내로 포도당을 유입시키는 촉진적 운반 체계의 대표적 단백질이다. Glut-4의 단백질발현을 근관세포인 L6 세포에서 western blot측정한 결과, 0.2 mg/ml의 F-MAPC 처리 농도에서 대조세포에 비하여, Glut-4의 발현이 10.2% 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

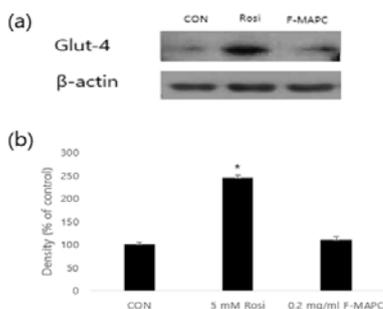


Fig. 5. Effect of F-MAPC on Glut-4 protein expression in L6 cells. L6 cells were treated with 0.2 mg/ml of F-MAPC,  $p < 0.05$  vs CON

### 고찰

비만은 에너지 흡입과 소비의 불균형으로 인한 만성적인 대사질환으로서, 체중증가와 혈중 지방함유량의 증가를 특징으로 하며<sup>21)</sup>, 고혈압, 제2형 당뇨병, 비알코올성 지방간질환, 다낭성 난소증후군, 고지혈증 및 관상동맥 심장질환과 같은 각종 관련 질환의 발병을 초래한다<sup>22)</sup>.

한의학적인 관점에서 肥, 肥人, 肥胖, 肉人, 肥貴人 등으로 표현되는 비만의 원인은 주로 氣滯, 痰濕, 多食 등이라 할 수 있으며, 주로 비위(脾胃)의 운화(運化) 기능실조로 인한 수습(水濕)이나 담탁(痰濁)의 형성으로 인한 발생, 또는 습담(濕痰) 등이 비위의 운화(運化)기능 장애를 일으켜 발생한다고 한다. 치료법으로 허증(虛證)은 익기(益氣), 보신(補腎), 건비(健脾) 시키며, 실증(實證)은 거습(祛濕), 화담(化痰), 활혈(活血), 이수(利水) 하는 방법을 주로 활용하였다<sup>23)</sup>.

발효한약은 효소나 미생물의 작용으로 약물을 발효시켜 본래의 성질을 증진시키거나 약화시키는 등의 새로운 치료효과<sup>24)</sup>를 나타나게 함으로써 임상에서의 목적에 맞도록 만드는 방법으로 높은 체내 흡수율, 적은 부작용 등이 장점<sup>25)</sup>이다. 단일 한약재 발효 후의 효과 증진에 대한 연구는 보고되고 있지만, 복합한약재발효 물추출물의 지방세포 및 근육세포에서의 지방대사, 포도당 운반에 대한 연구는 드물다.

상염은 '따뜻하고 독이 없으며 각기(脚氣)와 수종(水宗)을 없애주고 대장과 소장을 이롭게 하며 하기(下氣)하고 풍통(風痛)을 없앤다' 고 동의보감(東醫寶鑑)에 기록되어 있으며 최근에는 상염의 고지방식이 유도 모델에서 항비만 효과연구<sup>26)</sup> 등에 연구 보고가 있다. 사삼은 거담(祛痰)작용, 강심(強心)작용 등의 효능을 지니며<sup>27)</sup>, 최근 고지방식이 유도된 비만 모델에서 에탄올 추출물의 항비만 효과가 보고된 바 있다<sup>28)</sup>. 죽엽은 청열화담(淸熱化痰), 제번지구(除煩止嘔) 하는 효능이 있으며 관련된 연구로는, 고지방식이 유발 동물모델에서 항비만 효과가 보고되어 있다<sup>29)</sup>. 진피는 메스꺼움, 소화불량, 해수, 가래를 없애주며 이뇨작용의 효과<sup>30)</sup>가 있으며, 진피의 메탄올 추출물은 항비만 및 항고지혈 효과가 있다고 연구 보고되고 있다<sup>31)</sup>. 이와 같이 한약재 각각의 항비만 효과는 지속적으로 동물모델 및 임상시험으로 보고되어지고 있는 반면, 발효라는 특이적인 공정을 추가한 상염, 사삼, 죽엽, 진피의 복합발효 추출물에 대한 비만연구는 보고되어 진 바 없다. 본 실험에 사용된 한약재 복합물은 한의학적 방제원리인 군신좌사(君臣佐使)의 배합원리에 따라 수종(水宗)을 없애주고 대장과 소장을 이롭게 하며 하기(下氣)하는 상염을 군약(君藥), 거담(祛痰)작용을 하는 사삼을 신약(臣藥), 청열화담(淸熱化痰) 하는 기능이 있는 죽엽을 좌약(佐藥), 기가 멎친 것을 풀어주고 비장 기능을 강화시켜 제약을 조화롭게 하는 진피를 사약(使藥)으로 혼합하였다. 실험결과, 지방세포와 근육세포의 세포생존율과 세포독성에 영향을 미치지 않는 0.2 mg/ml 농도의 F-MAPC 처리 시 지방세포에서 지방축적 및 분화억제 효과가 나타났다. 상염(F-M), 사삼(F-A), 죽엽(F-P), 진피(F-C)의 단일발효 물추출물과 F-MAPC를 각각 처리 후 확인된 지방세포 내 지방구를 비교한 결과 F-MAPC의 동일 처리농도에서 더 우세한 지방 축적 억제효과를 나타내었다. 이는 각각의 한약재를 단독으로 사용하였을 때 보다 군신좌사의 한의학적 방제 배합원리에 따라 구성된 복합물에서 시너지

효과가 나타남을 보여 준 것으로 생각된다.

핵 수용체인 PPAR $\gamma$  는 지방세포분화에 중요한 역할을 하는 단백질이며, 당뇨병, 죽상경화증, 암 그리고 염증을 포함하는 다양한 질병치료를 위한 주요 표적단백질이다<sup>32)</sup>. 주로 지방조직에 발현되는 PPAR $\gamma$  는 glucose 신진 대사를 조절하고 이것의 활성은 인슐린 감도를 증가시킨다<sup>33)</sup>. PPAR $\gamma$  와 C/EBP $\alpha$  는 인슐린 신호전달과 관련된 유전자의 발현과 성숙한 지방세포에서 포도당과 지질대사를 조절하여 분화를 더욱 촉진시켜 분화과정을 완성시킨다<sup>34)</sup>. F-MAPC를 처리한 3T3-L1 지방세포에서 이러한 단백질의 발현이 유의적으로 감소하는 것으로 보아 F-MAPC가 지방세포에서 지방축적 및 지방분화를 억제하는 것으로 보인다. 또한, AMPK는 세포내 에너지 항상성을 유지<sup>35)</sup>시키고 이것의 활성화는 포도당 섭취 및 지방산 산화 증가와 간에서의 지방 합성 및 포도당 신생억제 그리고 췌장에서의 인슐린 분비를 조절하는 중요한 매개인자로 작용<sup>36)</sup>한다. 본 실험에서 F-MAPC 처리 후 AMPK와 sterol 조절 요소 결합 단백질 전사 인자인 지방 합성 효소 ACC의 인산화 활성을 증가시키므로 지방세포에서의 지방합성이 억제되어지는 것으로 사료된다.

포도당 수송체 4(Glut-4)는 인슐린에 의해서 근육세포막으로 이동이 유도되어 혈액 속의 포도당을 세포 내로 유입시키는 것<sup>37,38)</sup>으로 알려져 있으며 골격근, 갈색지방과 백색지방 그리고 심장에 분포한다<sup>39)</sup>. 본 실험 결과, 발효복합한약 물추출물인 F-MAPC를 처리 한 L6 세포에서 Glut-4의 발현이 대조세포에 비하여 유의적인 수준은 아니나 다소 증가하는 것으로 보아 F-MAPC가 인슐린이 중재한 포도당 흡수를 도울 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합하여 보면, F-MAPC가 3T3-L1 지방세포에서 중성지방 생성 및 축적을 억제시키는 것을 확인했고, 지방세포의 분화 초기전사인자인 PPAR $\gamma$  , C/EBP $\alpha$  의 저해능을 통하여 지방분화 억제에도 관여한다고 보여진다. 또한, F-MAPC는 L6 근원세포에서 유의적이지는 않지만 Glut-4의 발현을 증가시킨 것으로 보아 세포내 증가된 당의 유입은 혈액 내 포도당 이용을 활성화하고 혈당저하를 초래하여 비만 뿐 아니라 제2형 당뇨병의 개선에도 긍정적인 영향을 미칠 것으로 생각된다.

## 결론

본 연구에서 지방세포 3T3-L1 및 근원세포인 L6에서 발효한 상엽, 사삼, 죽엽, 진피 복합 물추출물(F-MAPC)의 지방생성 및 Glut-4 의존성 포도당 운반에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. F-MAPC는 0.05 mg/ml~1 mg/ml 처리농도에서 3T3-L1 및 L6 세포에 독성을 나타내지 않았다.
2. 상엽(F-M), 사삼(F-A), 죽엽(F-P), 진피(F-C) 단일 발효 물 추출물의 Oil-red O 염색결과 0.2 mg/ml의 농도에서 각각 지방축적 억제 정도가 대조세포에 비하여, 23.1%, 43.7%, 45.3%, 24.5%로 각각 관찰되어, 평균 34.15%의 지방축적 억제 효과를 보였다.

3. 상엽, 사삼, 죽엽, 진피 복합 발효 물 추출물인 F-MAPC의 Oil-red O 염색결과 0.05, 0.15, 0.2 mg/ml의 농도에서 대조세포에 비하여 각각 36, 48.8, 67.4%의 지방 축적 억제를 나타내었으며, 동일 농도(0.2 mg/ml)의 단일발효 물 추출물보다 지방 축적 억제 정도가 평균 33.25%로 2배 더 우수하였다.

4. 상엽, 사삼, 죽엽, 진피 복합 발효 물 추출물인 F-MAPC는 3T3-L1 지방세포에서 대조세포에 비하여 에너지 항상성을 조절하는 AMPK/ACC의 인산화수준을 증가 시켰으며, 지방세포의 분화 초기전사인자인 PPAR $\gamma$  , C/EBP $\alpha$  의 단백질발현 또한 대조세포에 비하여 저해시키는 것을 확인하였다.

5. 상엽, 사삼, 죽엽, 진피 복합 발효 물 추출물인 F-MAPC는 L6 근원세포에서 대조세포에 비하여 인슐린 자극 후 세포막으로 이동된 Glut-4 발현이 10.2% 증가하였다.

이상의 결과에서 발효한 상엽, 사삼, 죽엽, 진피의 복합 물추출물(F-MAPC)은 지방세포 3T3-L1 세포에서 초기지방합성 관련인자인 PPAR $\gamma$  과 C/EBP $\alpha$  의 발현억제 및 AMPK과 ACC의 인산화 증가로 지방합성 억제를 예상할 수 있기 때문에 세포 내 지방축적 억제의 주요한 기전에 작용하며, L6 근원세포에서 포도당 수송 관련 단백질 Glut-4의 발현이 증가를 나타내므로 체지방 축적 억제 및 혈당강하 효과를 통해 항비만 및 항당뇨 치료에 대한 후보 약물로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(No. 2011-0030124)이며, 이에 감사드립니다.

## References

1. Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2009 Korea national health and nutrition and examination survey. Ministry of Health and Welfare, 2010.
2. Grundy SM. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. Am J Clin Nutr. 1998 ; 67 : 563-72.
3. Lew EA. Mortality and weight: insured lives and the american cancer society studies. Ann Intern Med. 1985 ; 103 : 1024-9.
4. Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. Cell. 1996 ; 87 : 377-89.
5. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of

- adipogenesis, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001 ; 16 : 145-71.
6. Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation, *J Nutr*, 2000 ; 130 : 3116-21.
  7. Park YW. Clinical guidelines of treatment of obesity in adults, *J Korean Med Assoc*, 2003 ; 46 : 345-56.
  8. Kim KY, Song HJ. Hanyakpojahak, Seoul : Shinil Firm, 2002 : 547.
  9. Kim DH, Han SB, Park JS, Han MJ. Fermentation of antler and its biological activity, *Nat Prod Sci*, 1994 ; 98 : 25-6.
  10. Choi HJ, Kim EJ, Han MJ, Baek NI, Kim DH, Jung HG, Kim NJ. Hepatoprotective effect of fermented artemisia princeps pampanini by lactic acid bacteria, *Nat Prod Sci*, 1993 ; 38 : 245-53.
  11. Kimura M, Chen F, Nakashima N, Kimura I, Asano A, Koya S. Antihyperglycemic effect of N-containing sugars derived from mulberry leaves in streptozotocin induced diabetic mice, *J Traditional Med*, 1995 ; 12 : 214-16.
  12. Lee WC, Kim AJ, Kim SY. The study on the functional materials and effects of mulberry leaf, *Food Sci Industry*, 2003 ; 36 : 2-14.
  13. Kim DG, Kim MB, Kim H, Park JH, Lim JP, Hong SH. Herb medicinal pharmacognosy, 3rd rev. ed, Seoul : Shinilbooks, 2005 : 77-9.
  14. Kim DG, Kim MB, Kim H, Park JH, Lim JP, Hong SH. Herb medicinal pharmacognosy, 3rd rev. ed, Seoul : Shinilbooks, 2005 : 394-5.
  15. Lim NY, Kwon GJ, Kim YS, Baik SK, Lim JR, Mun YJ, Woo WH. Inhibitory effect of methanolic extract from Adenophorae Radix on melanogenesis, *Korean J Oriental Physiol Pathol*, 2004 ; 18 : 747-53.
  16. Compilation Committee of Korean Herbology. Korean herbology, Seoul : Younglimsa, 2010 : 206-7.
  17. Lee JM, Seo BI, Park JH, Roh SS. Effects of water extracts from Phyllostachys Folium on hyperlipidemia and liver damage induced by alcohol, *Kor J Herbology*, 2011 ; 26 : 31-6.
  18. Kim DG, Kim MB, Kim H, Park JH, Lim JP, Hong SH. Herb medicinal pharmacognosy, 3rd rev. ed, Seoul : Shinilbooks, 2005 : 220-1.
  19. Park SH, Yun SH, Kwon YM, Yeom SR, Kwon YD, Shin BC. Anti-inflammatory effect of Citrus Unshiu, *J Rehabil Med Herb*, 2005 ; 15 : 25-37.
  20. Lee ES, Uhm KO, Lee YM, Han M, Lee M, Park JM, Suh PG, Park SH, Kim HS. CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007 ; 361 : 854-8.
  21. Devlin MJ, Yanovski SZ, Wilson GT. Obesity: what mental health professionals need to know, *Am J Psychiatry*, 2000 ; 157 : 854-66.
  22. Barness LA, Opitz JM, Barness EG. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects, *Am J Med Genet A*, 2007 ; 143 : 3016-34.
  23. Jo HG, Kim BT. Causes and treatment of obesity and literature review on stage, *Korea Inst Sci Technol Inform*, 1992 ; 1 : 61-71.
  24. Chae US. Haneuihakgaeron, Seoul : Daeseoungmunhwasa, 1997 : 294.
  25. Jung YJ, Han Do, Choi BH, Park C, Lee HJ, Kim SH, Hahm DH. Effect of fermented herbal extracts, HP-1 on enzyme activities and gene expressions related to alcohol metabolism in ethanol-loaded rats, *Korean J Oriental Physiol Pathol*, 2007 ; 21 : 387-91.
  26. Hwang MY, Kim YH. Motion for consideration of obesity pathophysiology(I), *J Jeahan Oriental Med Acad*, 1984 ; 8 : 77-83.
  27. Park YK, Yoo HH, Beak SH, Lee SH, Kim CM, Lee KS, Park MK, Park JH. Quality control of Adenophorae Radix, *Kor J Pharmacogn*, 2003 ; 34 : 10-3.
  28. Lee SE, Lee EH, Lee TJ, Kim SW, Kim BH. Anti-obesity effect and action mechanism of Adenophora Triphylla Root ethanol extract in C57BL/6 obese mice fed high fat diet, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013 ; 77 : 544-50.
  29. Koide CL, Collier AC, Berry MJ, Panee J. The effect of bamboo extract on hepatic biotransforming enzymes -findings from an obese-diabetic mouse model, *J Ethnopharmacol*, 2011 ; 133 : 37-5.
  30. Yook CS. Encyclopedia of pharmacognosy, Seoul : Kyoung Won Publishing Company, 1997 : 273-4, 282, 305.
  31. Yang G, Lee J, Jung ED, Ham I, Choi HY. Lipid lowering activity of Citri Unshii Pericarpium in hyperlipemic rats, *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2008 ; 30 : 783-91.
  32. Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors, *The Lancet*, 1999 ; 354 : 141-8.
  33. Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism, *Trends Pharmacol Sci*, 2004 ; 25 : 331-6.
  34. Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression, *J Nutr*, 2000 ; 130 : 3122-6.
  35. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway new players upstream and downstream,

- J Cell Sci, 2004 ; 117 : 5479-87.
36. Nam KC, Kim MS, Lee WJ, Jang PG, Han SM, Koh EH, Park JY, Lee KU. Hypothalamic AMPK activity in diabetic rats. J Kor Diabetes Assoc. 2004 ; 28 : 468-77.
  37. Ishikura S, Bilan PJ, Klip A. Rabs 8A and 14 are targets of the insulin-regulated Rab-GAP AS160 regulating GLUT4 traffic in muscle cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007 ; 353 : 1074-9.
  38. Rowland AF, Fazakerley DJ, James DE. Mapping insulin/GLUT4 circuitry. Traffic. 2011 ; 12 : 672-81.
  39. Bell GL, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. J Biol Chem, 1993 ; 268 : 161-4.