

백출추출물이 TNF- α 유도 지방세포염증과 인슐린저항성 회복에 미치는 영향

빈창현 · 송춘호

동의대학교 한의과대학 경락경혈학교실

Ameliorating Effects of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi on TNF- α -induced 3T3-L1 Adipocyte Dysfunction

Chang-Hyun Bin, Choon-Ho Song

Department of Meridian and Acupoint, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

Objectives : The present study was designed to investigate effects and molecular mechanisms of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi extracts(AMK) on the improvement of adipocyte dysfunction induced by TNF- α in 3T3-L1 adipocytes. We examined whether AMK could directly influence the inflammation and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. **Methods :** Potential roles of AMK in the lipolysis, production of inflammatory adipokines and ROS, expression and phosphorylation of ERK, JNK, and I κ B α protein, and expression of PPAR γ and C/EBP α were investigated in this study. **Results :** Our data demonstrated that TNF- α significantly increased lipolysis, levels of MCP-1, IL-6, and ROS and phosphorylation of ERK, JNK, and I κ B α protein, while TNF- α reduced the expression of PPAR γ and C/EBP α in adipocytes, suggesting that TNF- α induced a condition with the occurrence of inflammation and insulin resistance. Those alterations induced by TNF- α were prevented by the treatment of AMK. AMK down-regulated the phosphorylation of ERK, JNK, and I κ B α protein and up-regulated the expression of PPAR γ and C/EBP α on TNF- α -induced inflammation and insulin resistance. **Conclusions :** Thus, our results indicate that AMK can be used to prevent from the TNF- α -induced adipocyte dysfunction through MAPK, NF κ B and PPAR γ pathways.

Key words : *Atractylodes macrocephala* koidzumi, TNF- α , inflammation, insulin resistance

서론

비만은 지방세포의 수의 증가뿐만 아니라 지방세포 내 지방구의 축적으로 인한 지방세포 크기의 증가가 일어나고 지방세포의 정상적인 기능 이상을 초래한다. 지방세포는 여분의 에너지를 저장하는 역할 이외에 leptin, adiponectin 등을 비롯한 지방세포 유래 호르몬과 아디포카인을 생산하여 내분비기관으로서의 역할을 통해 에너지저장성과 면역기능 등에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁾.

정상적인 지방세포의 기능 이상을 일으키는 주요인자는 아디포카인이라고 명명되는 TNF- α , MCP-1, 그리고 IL-6와 같은 염증성 사이토카인으로, 비만 상태에서 장기적으로 낮은 수준의 만성적인 염증반응을 일으키고, 고인슐린혈증, 제2형 당뇨병과 심혈관 질환 등의 동반질환들의 발생에 기여하는 인슐린 저항성을 유도한다고 알려져 있다^{2,3)}.

특히, TNF- α 는 지방세포 또는 지방세포 내 대식세포에서 분비되어 염증반응과 인슐린저항성의 유도에 중요한 역할을 한다. TNF- α

Received August 31, 2015, Revised September 11, 2015, Accepted September 11, 2015

Corresponding author: **Choon-Ho Song**

Department of Meridian and Acupoint, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan 47227, Korea
Tel: +82-51-850-8643, Fax: +82-51-853-4036, E-mail: chsong@deu.ac.kr

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 지방세포에서 염증성 아디포카인의 생성과 지방분해를 촉진시켜 유리지방산의 생성을 유도하고 지방세포 분화와 지방생성을 억제한다. 또한 비만과 관련된 대사질환에서 낮은 수준의 만성적인 염증, 당 대사 손상, 인슐린저항성의 발병기전에 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 TNF- α 매개 인슐린저항성은 지방세포 내 미토콘드리아의 기능이상과 reactive oxygen species(ROS)의 생성과도 연관되어 있다^{4,5)}.

白朮은 국화과에 속한 다년생초본인 흰삽주 및 동속 근린식물의塊根으로 성미가 甘苦 微溫無毒하고 補脾益氣, 燥濕利水, 固表止汗, 安胎 등의 효능을 가지고 있어 임상적으로 脾胃虛寒과 水濕의 停滯로 인한 다양한 질환에 활용되어 왔으며⁶⁾, 白朮의 주성분은 atracylitol, atractylone, Vitamin A 등으로 알려져 있다⁷⁾.

白朮에 대한 실험적 연구로는 비만세포의 전구염증 사이토카인 생성 억제 효능⁸⁾, 대장암세포에 대한 억제 효능 등에 관한 연구가 진행되었고⁹⁾, 특히 비만 및 지방대사와 관련하여 비만 동물모델과 지방세포모델을 통한 지방세포 생성 억제 효능¹⁰⁾과 지방세포분화 촉진 효능¹¹⁾에 대한 연구 결과가 보고되어 지방세포에 대한 白朮의 효능과 작용기전에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

3T3-L1은 대표적인 지방세포주로서 지방세포 분화연구에 많이 사용되어 왔다. 또한 세포막에 인슐린 수용체와 glucose transporter 4(GLUT4)가 존재하기 때문에 인슐린과 당대사와 관련된 반응에 민감하게 반응한다. 인체대사와 관련하여 insulin signaling, adipokine분비, GLUT4 translocation, lipogenesis와 lipolysis에 대한 연구에 광범위하게 사용되는 세포모델이다¹²⁻¹⁴⁾.

본 연구는 지방세포의 대사이상에 미치는 白朮의 효능을 알아보기 위하여 TNF- α 로 3T3-L1 지방세포의 염증 상태를 유도하고 염증성 아디포카인과 ROS의 생성, 염증과 인슐린저항성 조절을 위한 신호전달 경로에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

3T3-L1 mouse preadipocytes는 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였고, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), bovine calf serum(BCS), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin mixture 및 dimethylsulfoxide(DMSO)는 GibcoBRL(USA)로부터 구입하였다. Insulin, isobutylmethylxanthine(IBMX), dexamethasone(DEX), tetrazolium bromide salt(MTT), dimethylsulfoxide(DMSO),

bovine serum albumin(BSA)는 Sigma(USA)로부터 구입하였다.

2. 시료의 준비

白朮(*Atractylodes macrocephala* Koidzumi)은 (주)옵니허브(Daegu, Korea)에서 규격품을 구입 후 본초감별도감¹⁵⁾에 근거하여 시료의 본초학적 형태와 특징을 확인하고 실험에 사용하였다. 白朮 100 g을 1.5 L의 증류수를 가하여 3시간동안 가열추출하였다. 추출된 용액을 원심분리하여 상청액을 획득하고, 0.2 μ m 여과지에서 여과하여 rotary evaporator(Rotavapor R-100, BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland)로 200 mL가 되도록 감압농축하였다. 실온에서 냉각시킨 뒤 감압필터를 사용, 냉동 건조(Freeze Dryer FD-1, EYELA, JAPAN)하여 29 g의 白朮추출물(AMK)을 획득하였고, 냉동보관(-20°C)하였다가 실험직전 PBS에 희석하여 syringe 필터 후 사용하였고, 白朮추출물의 샘플(DKMP-201507-AMK)은 동의대학교 생리학실험실에 보관되어 있다.

3. 지방세포분화와 TNF- α 및 시료의 처리

지방세포의 분화를 위해 3T3-L1 전구지방세포는 5% CO₂, 37°C 배양기에서 DMEM(10% BCS, 100 unit/ml of penicillin G sodium, 100 μ g/ml of streptomycin sulfate)으로 배양하였다. 100% confluent 해졌을 때 0.5 mM isobutylmethylxanthine(IBMX), 1 μ M dexamethasone(DEX)와 1 μ g/ml insulin의 분화유도물질(MDI)이 포함된 DMEM(10% FBS, 100 unit/ml of penicillin G sodium, 100 μ g/ml of streptomycin sulfate)으로 교환하여 2~3일 동안 분화를 유도하였으며, 그 후 매 2 일 마다 1 μ g/ml insulin 이 포함된 DMEM(10% FBS, 100 unit/ml of penicillin G sodium, 100 μ g/ml of streptomycin sulfate)으로 교환하였다. 3T3-L1 전구지방세포는 분화유도 8-12일 후 성숙지방세포(MA)를 확인한 후 TNF- α , TNF- α 와 AMK(100 μ g/ml)과 AMK(100 μ g/ml)을 처리하고 분석하였다.

4. 지방세포내 지방구 관찰

분화 유도된 후 10일째 3T3-L1 지방세포에 AMK를 농도별(0, 100 and 200 μ g/ml)로 24시간 처리한 후 TNF- α (5 ng/ml)를 24시간 처리하여 지방세포의 기능 이상을 유발하고 지방세포의 형태를 Axiovert 40 CFL 현미경(Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

5. 염증성 아디포카인의 측정

MCP-1과 IL-6의 농도는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent

assay)법을 이용하여 측정하였다. 지방세포에 AMK(100 μ g/ml)를 24시간 동안 전처리한 후 TNF- α (5 ng/ml)을 24시간동안 처리하였다. 세포배양이 끝난 후 상층액을 회수하여 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 분리된 상층액을 -70°C 에 보관하였다가 ELISA kit(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 사용하여 microplate reader(SPECTRAMAX M2, Molecular Devices Co. Ltd. USA) 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준곡선을 이용하여 cytokine의 양을 계산하였다.

6. 세포 내 ROS 측정

지방세포 내 ROS의 분비를 측정하기 위하여 5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate, acetyl ester(CM-H₂DCF-DA)를 사용하였다. CM-H₂DCF-DA는 세포투과성이 있는 비형광 비극성분자로 용이하게 세포 내로 들어갈 수 있으며, 세포 내 esterase에 의해 비형광성 극성분자인 CM-H₂DCF로 분리된 후 세포내의 활성산소에 의해 산화되면 형광성 CM-H₂DCF로 전환되고 이를 fluorometer로 측정하는 방법이다. 3T3-L1 adipocytes는 black 96 well plate에 1×10^5 cells/ml로 분주한 후 12일간 분화하였다. 시료처리 전 serum free DMEM배지로 교환하고 4시간 경과 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 유지하였다. 배양종료 후 PBS로 세척하고 10 μ M CM-H₂DCF-DA를 처리하여 37°C에서 40분동안 배양하였다. 그 후 PBS로 배지에 남아 있는 CM-H₂DCF-DA를 제거한 후 TNF- α 를 처리하여 1시간동안 자극하였다. 얼음 위에서 반응을 정지시킨 후 490 nm(excitation)과 530 nm(emission)에서 fluorometer(SPECTRAMAX M2, Molecular Devices Co. Ltd. USA)를 사용하여 ROS에 의해 산화된 CM-H₂DCF의 양을 측정하였다.

7. Western blotting analysis

지방세포에 AMK(100 μ g/ml)를 24시간 동안 전처리한 후 TNF- α (5 ng/ml)을 15분(ERK, JNK, I κ B α) 또는 24시간(PPAR γ , C/EBP α)동안 처리하였다. 세포 배양이 끝난 후 cold PBS로 세척하여 수거한 세포에 lysis buffer(20 mmol/L Tris-HCl [pH 8.0], 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA), 1 mmol/L NaF, 1% Igepal CA-630, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Na₃VO₄, and protease inhibitor cocktail)를 첨가하여 매 5 분간 vortex하여 얼음에 30 분간 방치하였다. 그 후 12,000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 회수하여 단백질 양을 정량하였다. 각 lysate 25~30 μ g을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 150 V에서 1시간 30분 동안 단백질을 분리하고, 분리된 단백질을 nitrocellulose transfer membranes(Whatman GmbH, Dassel, Germany)로 transfer하였다. 5% skim milk가 첨가된 TBST buffer(10 mmol/L Tris-HCl [pH 7.5], 150 mmol/L NaCl, and 0.05% Tween 20)로 실온에서 1 시간 blocking시킨 다음 1차 antibody를 1:500~1:1,000 희석하여 첨가한 이후 반응시켰다. TBST buffer로 3회 세척한 후 2차 antibody를 1:5,000으로 희석하여 1시간 이상 반응시켰다. TBST buffer로 3회 세척 후 Enhanced chemiluminescent detection kit(Pierce ECL Western Blotting Substrate; Pierce Biotechnology, Rockford, USA)를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 현상하였다. 실험에 사용된 antibody에 대한 정보는 Table 1에 나타내었다.

8. 통계처리

통계분석은 GraphPad Prism[®]5 package(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 평균치 \pm 표준편차로 나타

Table 1. Primary and Secondary Antibodies Used in This Study

| Antibodies | Source | Dilution |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------|
| Primary antibodies | | |
| ERK/p-ERK | Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA | 1:1,000 |
| JNK/p-JNK | Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA | 1:500 |
| I κ B α /p-I κ B α | Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA | 1:1,000 |
| PPAR γ | Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA | 1:1,000 |
| C/EBP α | Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA | 1:1,000 |
| β -actin | Santa Cruz Biotechnology, Burlingame, CA, USA | 1:1,000 |
| Secondary antibodies | | |
| Goat anti-rabbit IgG, pAb | Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA | 1:5,000 |

ERK : extracellular signal-regulated kinase, JNK : c-jun, N-terminal kinase, I κ B α : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha, PPAR γ : peroxisome proliferators-activated receptor, gamma, C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein, alpha.

내었고 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 One way-ANOVA와 Dunnett's Multiple Comparison Test 검정을 실시하였다.

결 과

1. TNF- α 유도 지방세포의 형태에 미치는 영향

AMK의 지방분해에 미치는 영향을 조사하기 위하여 광학현미경 하에서 지방세포의 형태를 관찰하였다. 그 결과 비처리군은 분화 10일째에 지방세포의 비대와 지방세포내 지방구의 생성이 관찰되었다. 반면, TNF- α 처리군은 비처리군에 비해 비대한 지방세포내 지방구의 현저한 소실이 관찰되었으며, AMK 처리군은 농도의 존적으로 지방세포 내 지방구 소실 억제가 관찰되었다(Fig. 1).

2. 지방세포의 염증성 아디포카인의 분비에 미치는 영향

TNF- α 로 유도된 지방세포의 만성적 염증에 대한 AMK의 억제

효과를 확인하기 위하여 지방세포에서 지방세포비대에 따라 생산이 증가하는 염증성 아디포카인인 MCP-1과 IL-6의 양을 조사하였다. 지방세포에 AMK를 농도별(100 and 200 $\mu\text{g/ml}$)로 전처리한 후 TNF- α 의 처리에 의해 지방세포의 염증상태를 유도하였다. 그 결과 MCP-1과 IL-6의 농도는 TNF- α 의 처리에 의해 현저한 증가를 보였고, AMK군에서 유의한 억제효과를 보였다. 그러나, TNF- α 비처리군과 AMK 농도별 단독 처리군은 MCP-1과 IL-6의 농도에 유의한 차이를 보이지 않아 AMK의 단독 처리가 지방세포의 항염증 효과에 어떠한 영향도 미치지 않음을 확인하였다($p < 0.05$, Fig. 2).

3. 지방세포의 ROS생성에 미치는 영향

지방세포 내 ROS는 주로 미토콘드리아에서 생성되는데 TNF- α 로 인한 과다한 ROS의 생산은 직접적으로 미토콘드리아의 기능을 일으키고 ATP 합성이상, 세포내 지질 항상성 조절이상과 인슐린저항성을 초래한다. 지방세포의 ROS 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 AMK를 농도별(100, 200 and 300 $\mu\text{g/ml}$)로 전처리한 후 TNF- α 의 처리에 의해 지방세포 내 ROS 생산증가를 유도하

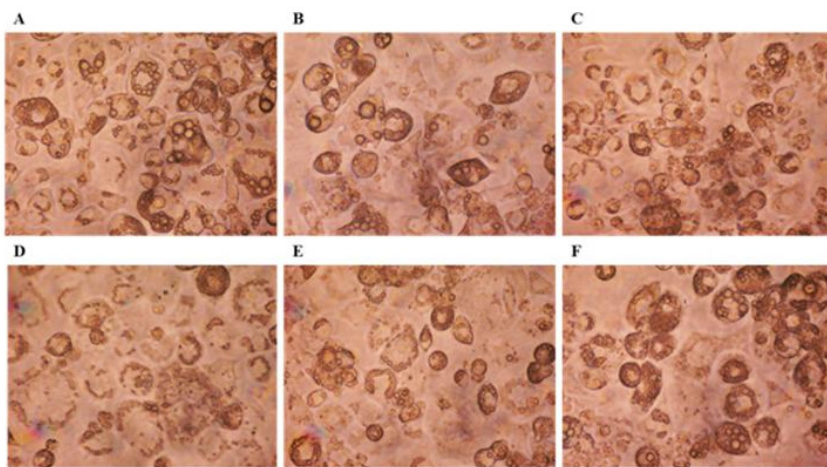


Fig. 1. Photographs of differentiated 3T3-L1 adipocytes for eight days (Olympus, $\times 400$).

The 3T3-L1 adipocytes were treated with or without AMK for 24 h prior to TNF- α (5 ng/ml) treatment for 24 h. (A) Non-treated cells, (B) and (C) The cells treated with 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ AMK, (D) TNF- α treated cells, (E) and (F) The cells treated with 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ AMK for 24 h prior to TNF- α treatment. The cells treated with AMK increased the amounts and diameters of lipid droplet.

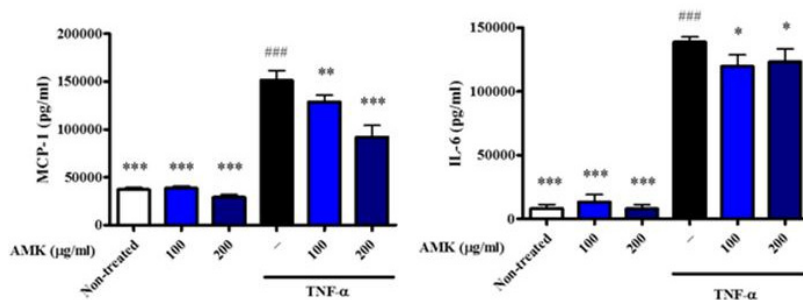


Fig. 2. Effects of AMK on the levels of MCP-1 and IL-6 in TNF- α treated 3T3-L1 adipocytes.

Cytokines were detected by ELISA. Values are expressed as mean \pm SD. # $p < 0.05$ vs. non-treated adipocytes. * $p < 0.05$ vs. TNF- α treated adipocytes. Dunnett's multiple comparison tests after one-way analysis of variance.

였다. 그 결과, ROS 생산량은 TNF- α 의 처리에 의해 현저한 증가를 보였고, AMK군에서 농도의존적으로 유의한 억제효과를 보였다(Fig. 3).

4. 지방세포 내 MAPK와 NF- κ B 신호전달 경로에 미치는 영향

TNF- α 는 지방세포에서 MAPK 경로와 NF- κ B 경로를 활성화시키고, 이러한 신호전달 경로의 활성화는 염증성 아디포카인의 발현을 증가시켜 염증반응을 매개하고 인슐린 신호전달을 방해한다. AMK의 지방세포 내 염증성 아디포카인의 신호전달 경로를 규명하기 위하여 TNF- α 의 세포 내 신호전달 분자인 ERK1/2, JNK1/2 및 I κ B α 의 활성 정도를 단백질 발현과 인산화 발현을 통해 관찰하였다. ERK1/2, JNK1/2 및 I κ B α 의 단백질 발현에는 차이가 없었으나, ERK1/2, JNK1/2 및 I κ B α 의 인산화는 TNF- α 처리에 의해 증가하였고, AMK 처리에 의해 ERK1/2, JNK1/2 및 I κ B α 의 인산화를 억제하였다(Fig. 4).

5. 지방세포의 PPAR γ 와 C/EBP α 신호전달 경로에 미치는 영향

TNF- α 는 지방세포에서 인슐린저항성을 유도하는 것으로 알려져 있는데, 이는 지방세포생성의 주요 조절자인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 활성억제에 의해 매개된다.

AMK의 지방세포에서 인슐린저항성 개선과 관련된 신호전달 경로를 규명하기 위하여 PPAR γ 와 C/EBP α 의 활성 정도를 단백질 발현을 통해 관찰하였다. 그 결과 PPAR γ 와 C/EBP α 의 단백질

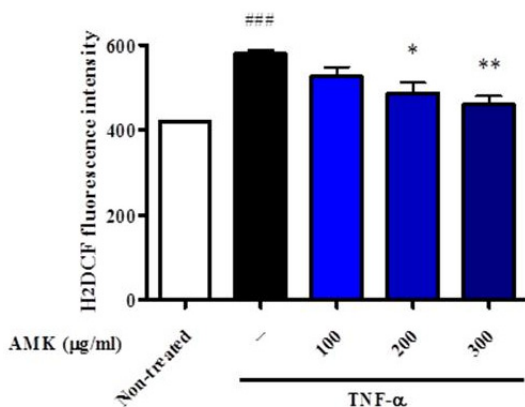


Fig. 3. Effects of AMK on the production of ROS in 3T3-L1 adipocytes. The levels of ROS were detected by ELISA. Values are expressed as mean \pm SD. # p <0.05 vs. non-treated adipocytes. * p <0.05 vs. TNF- α treated adipocytes. Dunnett's multiple comparison tests after one-way analysis of variance.

발현은 TNF- α 처리에 의해 감소하였고, AMK 처리에 의해 증가하였다(Fig. 5).

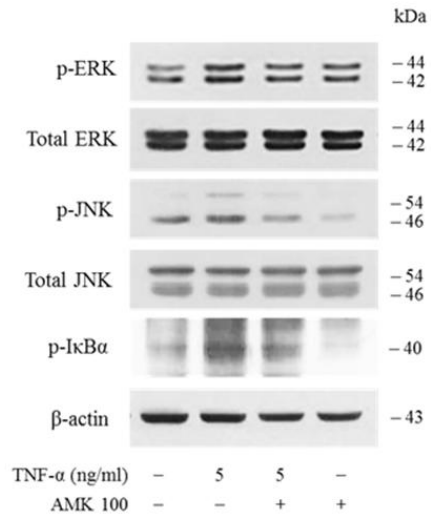


Fig. 4. Effects of AMK on the activation of ERK, JNK, and I κ B α level in TNF- α treated 3T3-L1 adipocytes.

Representative ERK, JNK and I κ B α expression levels. The 3T3-L1 adipocytes were treated with or without AMK for 24 h prior to TNF- α (5 ng/ml) treatment for 15 min. Total protein was analyzed by western blot using phospho-specific or total antibodies against ERK, JNK, I κ B α , and β -actin.

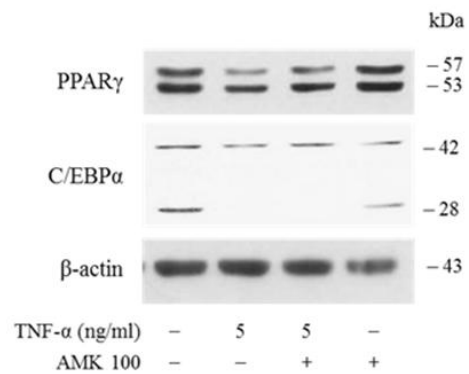


Fig. 5. Effects of AMK on the activation of PPAR γ and C/EBP α level in TNF- α treated 3T3-L1 adipocytes.

Representative PPAR γ and C/EBP α expression levels. The 3T3-L1 adipocytes were treated with or without AMK for 24 h prior to TNF- α (5 ng/ml) treatment for 24 h. Total protein was analyzed by western blot using total antibodies against PPAR γ and C/EBP α , and β -actin.

고찰

지방세포는 에너지 저장소로서의 역할 이외에 식욕조절, 비만, 인슐린 작용과 관련된 다양한 생리활성물질의 내분비, 외분비 기능을 함으로써 내분비기관으로서의 역할을 하고 있다¹⁶⁻¹⁸. 지방세포의 비대와 기능이상은 비만성 대사질환의 발생 위험을 높이고, 이 질환들의 발생에 직접적인 원인을 제공한다. 만성적 염증과 인슐린 저항성을 동반하는 비만성 대사질환은 이상지질혈증, 제2형 당뇨병, 심혈관계질환, 관상동맥질환, 암 등의 대부분의 성인병이 포함된다.

외부 감염원 없이 발생하는 낮은 정도의 만성적 염증은 지방세포의 과다와 비대로 인해 생산되는 저분자 생리활성물질인 염증성 아디포카인 MCP-1, TNF- α 와 IL-6에 의해 유지된다. 이러한 만성적인 염증상태는 세포 내 ROS 과다 생성과 미토콘드리아의 기능 이상을 유발하여 에너지대사 장애를 일으키고 인슐린저항성을 유도한다. 그러므로 지방세포의 만성적인 염증상태의 조절은 에너지 대사 및 인슐린저항성과 관련된 기능장애를 회복하는데 중요한 목표가 될 것으로 생각된다.

白朮은 한의학에서 단독 또는 복합 처방의 구성약물로 소화장애¹⁹, 염증²⁰, 신경정신장애^{21,22}, 피부미백²³ 등의 치료효과가 보고되었고, 임상에서도 비위계통의 기능이상, 기혈순환장애, 수분 및 에너지 대사 조절과 노폐물 배출장애 등의 개선을 목표로 광범위하게 응용되어왔다.

비대한 지방세포에서는 많은 양의 염증성 아디포카인을 분비하는데, TNF- α , IL-6, MCP-1 등의 염증성 아디포카인을 분비를 증가시킨다. 증가된 TNF- α 는 지방분해를 증가시키고 PPAR γ 매개 중성지방의 합성과 저장을 감소시킨다. TNF- α 에 의해 순환 유리 지방산과 근육에서 이소성 중성지방의 증가를 초래함으로써 인슐린저항성의 유발에 기여한다²⁴.

본 연구에서 AMK의 지방분해에 미치는 영향을 조사하기 위하여 TNF- α 처리에 의한 비대한 지방세포 내 지방분해가 관찰되었고, AMK가 지방세포 내 지방분해를 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 또한 TNF- α 는 염증성 아디포카인의 분비를 증가시키고²⁵, adiponectin과 같은 항염증성 아디포카인의 분비를 억제하여 염증반응을 지속시키는 역할을 한다²⁶.

IL-6는 fibroblasts, endothelial cells, monocytes, adipocytes 등과 같은 다양한 세포에서 분비되지만, 비만의 경우 전신지방조직과 복부지방조직에서 분비되는 IL-6의 양이 증가되고, 증가된 IL-6는 간과 지방조직에서 염증과 인슐린저항성을 높이는 것으로 보고되었다^{27,28}. 지방세포에 대식세포의 침투는 비만에서 염증반응을

증가와 관련하여 중요한 과정이다. MCP-1은 chemokine(C-C motif) ligand 2(CCL-2)로 알려져 있으며 강력한 화학주성을 나타내어 지방조직으로 대식세포의 침투를 유도하고 염증상태를 유지시킨다²⁹. 본 연구에서 AMK의 염증 억제 효과를 확인하기 위하여 TNF- α 로 지방세포의 만성적 염증을 유도하고 MCP-1과 IL-6의 양을 조사한 결과, AMK가 염증성 아디포카인의 생산을 유의하게 억제하여 지방세포의 염증반응을 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

비만성 인슐린저항성은 최근 산화적 손상, 미토콘드리아 기능이상과 소포체 스트레스와 같은 세포 소기관의 기능이상과의 연관성에 대해 보고되고 있다³⁰. 지방세포의 비대와 염증은 세포 내 ROS 분비를 자극하고 미토콘드리아의 에너지 조절을 방해하며, ROS는 불리한 대사조건에서 TNF- α 의 생성을 촉진시키고³¹, TNF- α 유도 NF- κ B 활성³²과 인슐린저항성³³에 기여한다. 본 연구에서 AMK의 ROS 억제효과를 확인한 결과 AMK가 TNF- α 처리한 군에 비해 농도의존적으로 ROS 생성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 3).

TNF- α 는 ERK, p38MAPK와 JNK를 포함하는 MAPK 경로와 NF- κ B를 활성화시키는 전구 염증성 신호전달 경로를 활성화할 수 있다. 이 신호전달 경로는 지방조직에서 TNF- α 에 의해 활성화되는 것이 잘 알려져 있고, 인슐린저항성과 당흡수와 관련된 대사 이상을 조절하기 위한 좋은 목표가 된다³⁴⁻³⁶. 본 연구에서 AMK의 TNF- α 에 의해 활성화되는 전구 염증성 신호전달 경로 억제효과를 조사한 결과, AMK는 ERK, JNK, I κ B α 의 활성화를 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과는 AMK가 전구 염증 기전을 억제함으로써 지방세포의 기능 이상을 조절할 수 있음을 나타낸다.

TNF- α 는 지방세포에서 insulin receptor(IR), insulin receptor substrate-1(IRS-1)과 glucose transporter GLUT4 등과 같은 인슐린 민감성과 인슐린 유도 당흡수에 필요한 많은 단백질의 발현을 억제하는데^{37,38}, 이는 TNF- α 신호에 의해 전구염증 신호전달 경로가 활성화되고 그에 따라 지방세포 기능의 주요 조절자인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현이 감소되는 기전을 통해 인슐린 저항성을 증가시킨다^{34,39,40}.

또한 PPAR γ 과 C/EBP α 는 지방조직 생성과 중성지방 합성과 저장을 포함한 성숙지방세포의 기능의 유지에 필수적인 전사 조절자 역할을 한다. 본 연구에서 AMK의 지방세포 필수전사인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 활성화 효과를 조사한 결과, AMK는 TNF- α 에 의해 억제된 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과는 AMK가 지방세포에서 전구 염증 기전을 억제할 뿐만 아니라 염증억제 기전을 통해 인슐린 매

개 지방세포의 기능을 조절할 수 있음을 나타낸다.

결 론

본 연구에서 AMK가 TNF- α 로 유도된 지방세포의 염증과 인슐린저항성 회복에 미치는 영향을 조사하였다. AMK는 TNF- α 로 유도된 지방세포의 지방분해, 염증성 아디포카인의 분비, ROS 생성을 억제하였다. 이러한 항 염증과 항산화스트레스 효과는 ERK, JNK, I κ B α 신호전달 단백질의 활성억제를 통한 PPAR γ 와 C/EBP α 지방세포 핵심 전조절자의 활성을 통해 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 AMK의 효과는 지방세포 대사이상의 조절에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

References

- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010 ; 316(2) : 129-39.
- Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res*. 2008 ; 39(8) : 715-28.
- Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*. 2001 ; 60(3) : 349-56.
- Chen X, Xun K, Chen L, Wang Y. TNF-alpha, a potent lipid metabolism regulator. *Cell Biochem Funct*. 2009 ; 27(7) : 407-16.
- Chen XH, Zhao YP, Xue M, Ji CB, Gao CL, Zhu JG, et al. TNF-alpha induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010 ; 328(1-2) : 63-9.
- Shin MG. *Clinical Herbology*. Seoul:Younggrimsa. 1992 : 172-3.
- Lee SI, Ahn DK, Shin MG. *Clinical Application of Oriental Medicine*. Seoul: Sungbosa. 1982 : 358-60.
- Hong MH, Kim JH, Bae H, Lee NY, Shin YC, Kim SH, et al. Atractylodes japonica Koidzumi inhibits the production of proinflammatory cytokines through inhibition of the NF-kappaB/IkappaB signal pathway in HMC-1 human mast cells. *Archives of pharmacal research*. 2010 ; 33(6) : 843-51.
- Shim AR, Dong GZ, Lee HJ, Ryu JH. Atractylochromene Is a Repressor of Wnt/beta-Catenin Signaling in Colon Cancer Cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2015 ; 23(1) : 26-30.
- Kim CK, Kim M, Oh SD, Lee SM, Sun B, Choi GS, et al. Effects of Atractylodes macrocephala Koidzumi rhizome on 3T3-L1 adipogenesis and an animal model of obesity. *J Ethnopharmacol*. 2011 ; 137(1) : 396-402.
- Han Y, Jung HW, Park YK. The roots of Atractylodes japonica Koidzumi promote adipogenic differentiation via activation of the insulin signaling pathway in 3T3-L1 cells. *BMC Complement Altern Med*. 2012 ; 12 : 154.
- Hare JF, Taylor K. Surface-exposed proteins of 3T3-L1 adipocytes: identification of phosphorylated, insulin-translocated, and recycling proteins. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1992 ; 293(2) : 416-23.
- Lange K, Brandt U. Restricted localization of the adipocyte/muscle glucose transporter species to a cell surface-derived vesicle fraction of 3T3-L1 adipocytes. Inhibited lateral mobility of integral plasma membrane proteins in newly inserted membrane areas of differentiated 3T3-L1 cells. *FEBS Lett*. 1990 ; 276(1-2) : 39-41.
- Robinson LJ, Pang S, Harris DS, Heuser J, James DE. Translocation of the glucose transporter (GLUT4) to the cell surface in permeabilized 3T3-L1 adipocytes: effects of ATP insulin, and GTP gamma S and localization of GLUT4 to clathrin lattices. *The Journal of cell biology*. 1992 ; 117(6) : 1181-96.
- Korea Institute of Oriental Medicine. *Korean Medicinal Materials Volume 1*. Seoul:GeoBook. 2014 : 350-3.
- Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*. 2003 ; 144(9) : 3765-73.
- Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & development*. 2007 ; 21(12) : 1443-55.
- Chen L, Chen R, Wang H, Liang F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int J Endocrinol*. 2015 ; 2015 : 508409.
- Park JJ, Chon NR, Lee YJ, Park H. The Effects of an Extract of Atractylodes Japonica Rhizome, SKI3246 on Gastrointestinal Motility in Guinea Pigs. *J Neurogastroenterol Motil*. 2015 ; 21(3) : 352-60.
- Yu Y, Jia TZ, Cai Q, Jiang N, Ma MY, Min DY, et al. Comparison of the anti-ulcer activity between the crude and bran-proc-

- essed *Atractylodes lancea* in the rat model of gastric ulcer induced by acetic acid. *J Ethnopharmacol.* 2015 ; 160 : 211-8.
21. Zhou Y, Lu L, Li Z, Gao X, Tian J, Zhang L, et al. Antidepressant-like effects of the fractions of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137(1) : 236-44.
 22. Kim HG, Ju MS, Park H, Seo Y, Jang YP, Hong J, et al. Evaluation of Samjunghwan, a traditional medicine, for neuroprotection against damage by amyloid-beta in rat cortical neurons. *J Ethnopharmacol.* 2010 ; 130(3) : 625-30.
 23. Chang YH, Kim C, Jung M, Lim YH, Lee S, Kang S. Inhibition of melanogenesis by selina-4(14),7(11)-dien-8-one isolated from *Atractylodis Rhizoma Alba*. *Biol Pharm Bull.* 2007 ; 30(4) : 719-23.
 24. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunction linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 ; 9(5) : 367-77.
 25. Maury E, Noel L, Detry R, Brichard SM. In vitro hyperresponsiveness to tumor necrosis factor-alpha contributes to adipokine dysregulation in omental adipocytes of obese subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2009 ; 94(4) : 1393-400.
 26. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 ; 285(3) : E527-33.
 27. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1997 ; 82(12) : 4196-200.
 28. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes.* 2007 ; 56(4) : 1010-3.
 29. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation.* 2003 ; 112(12) : 1821-30.
 30. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006 ; 444(7121) : 860-7.
 31. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation.* 2002 ; 106(16) : 2067-72.
 32. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 2006 ; 72(11) : 1493-505.
 33. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature.* 2006 ; 440(7086) : 944-8.
 34. Jain RG, Phelps KD, Pekala PH. Tumor necrosis factor-alpha initiated signal transduction in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Physiol.* 1999 ; 179(1) : 58-66.
 35. Ryden M, Dicker A, van Harmelen V, Hauner H, Brunnberg M, Perbeck L, et al. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha-mediated lipolysis in human fat cells. *The Journal of biological chemistry.* 2002 ; 277(2) : 1085-91.
 36. Chae GN, Kwak SJ. NF-kappaB is involved in the TNF-alpha induced inhibition of the differentiation of 3T3-L1 cells by reducing PPARgamma expression. *Experimental & molecular medicine.* 2003 ; 35(5) : 431-7.
 37. Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *The Journal of biological chemistry.* 1997 ; 272(2) : 971-6.
 38. Ruan H, Hacoheh N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes.* 2002 ; 51(5) : 1319-36.
 39. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science (New York, NY).* 1996 ; 274(5295) : 2100-3.
 40. Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional repression of the C/EBP-alpha and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. Regulation is coordinate and independent of protein synthesis. *The Journal of biological chemistry.* 1992 ; 267(19) : 13580-4.