

沒藥 에탄올 추출물의 항비만에 관한 연구

백선재^{1#}, 김동희^{2,3*}

1 : 선재한의원, 2 : 대전대학교 한의과대학 병리학교실,
3 : 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명 의학연구 지역혁신 센터

The Study on anti-obesity of Myrrh ethanol extract

Seon-Jae Baek^{1#}, Dong-Hee Kim^{2,3*}

1 : Seonjae Clinic of Korean medicine, 2 : Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University,
3 Traditional and Biomedical Research Center(TBRC), Daejeon University

ABSTRACT

Objectives : The objective of this study was to investigate the effect of Myrrh 80% ethanol extract on adipocyte differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 cell.

Methods : Myrrh was prepared by extracting with 80% ethanol. Cell viability was assessed by MTT assay using 3T3-L1 cells. Anti-obesity activity was measured in lipid droplets and triglyceride (TG) accumulation in 3T3-L1 cells. We also analyzed the expression of C/EBP β , C/EBP α , PPAR γ , SREBP1c, and aP2 by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). In addition, we observed the production of fatty acid, acetyl-CoA carboxylase and Oil-red O staining

Results : No cytotoxicity from Myrrh 80% ethanol extracts was observed at the concentration of 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) in 3T3-L1 cells. Treatment with Myrrh significantly suppressed the terminal differentiation of 3T3-L1 in a dose-dependent manner, as confirmed by a decrease in triglyceride and Fatty acid and Acetyl-CoA carboxylase. Also, Myrrh exhibited potential adipogenesis inhibition and downregulated the expression of pro-adipogenic transcription factors, such as sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer binding proteins α (C/EBP α) and C/EBP β , and adipocyte expressed genes, such as adipocyte fatty acid binding protein (aP2) and Fas. In addition, lipid accumulation determined by Oil-red O staining showed that Myrrh extract had inhibitory effects on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.

Conclusions : These results suggest that Myrrh suppresses obesity factors in 3T3-L1 cells. Myrrh may be a useful medical herbs for attenuating metabolic diseases such as obesity.

Key words : adipocyte differentiation, adipogenesis, Myrrh, 3T3-L1 cell obesity

I. 서 론

肥滿(obesity)은 세계적으로 급속하게 증가하고 있어 중요한 건강문제로 대두되고 있다. 세계보건기구 (WHO)는 2015년에 세계 성인 인구의 약 23억 명이 과체중이 될 것이며, 비만인은 7억 명 이상에 달할 것이라고 예상하였다¹⁾. 최근 우리

나라도 생활 여건 향상에 따른 식습관의 서구화와 운동부족, 각종 정신적 스트레스 등으로 비만 환자가 증가하고 있다.

비만이란 장기간 에너지 섭취량이 소비량을 초과하여 과잉의 에너지가 지방으로 전환되어 피하와 복부에 축적되어 대사 장애를 유발하며, 이로 인해 당뇨병, 심혈관장애, 폐쇄성 수면 무호흡증, 뇌졸중, 암 뿐만 아니라²⁻⁴⁾ 파킨슨질환⁵⁾과 알츠

*Corresponding author : Dong-Hee Kim, Traditional and Biomedical Research Center(TBRC RIC), Daejeon University.
· Tel : +82-42-280-2623 · Fax : +82-42-280-2624 · E-mail : dhkim@dju.kr

#First author : Seon-Jae Baek, Seonjae Clinic of Korean medicine
· Tel : +82-53-635-6456 · E-mail : ttankboy@daum.net

· Received : 10 June 2016 · Revised : 3 July 2016 · Accepted : 18 July 2016

하이머질환⁶⁾과 같은 신경퇴행성 질환의 발병율을 증가시키는 위험 인자로도 알려져 있다.

비만 치료는 일반적으로 식이요법과 운동요법을 통해 개선시키고 있으나, 필요시 약물요법과 수술요법 등을 활용하고 있다⁷⁾. 그러나 현재 양방에서 비만 치료를 위해 활용되고 있는 Sibutramine과 Orlistat은 심혈관계 및 소화기 장애 등의 부작용을 유발할 수 있어 장기적인 사용은 금하고 있다⁸⁾.

한의학에서 肥滿은 《內經》⁷⁾에 “膈肉堅皮滿者肥”로 최초로 언급된 이래 肥⁷⁾, 肥人⁷⁾, 肥白人⁸⁾, 肌膚盛⁹⁾, 肥貴人^{10,11)}, 肥胖¹²⁻¹⁴⁾ 표현되어 왔으며, 先天稟賦, 飲食失調, 久臥久坐, 活動減少, 外感濕邪, 內傷七情 등으로 인한 氣虛, 氣滯, 痰濁, 水濕, 血瘀 등이 병인, 병기로 인식되었다^{8-10,13,15-17)}. 이에 대한 실험적 연구로 防己黃芪湯^{18,19)}, 枸杞子¹⁹⁾, 消脹飲子²⁰⁾, 五苓散, 五苓散加蒼朮²¹⁾, 體感薏苡仁湯²²⁾, 大柴胡湯²³⁾, 加味黃連地黃湯²⁴⁾ 등과 사상처방 중 太陰調胃湯²⁵⁾, 十二味寬中湯²⁶⁾, 涼膈散火湯²⁷⁾, 清肺瀉肝湯²⁸⁾ 등의 항비만 효능이 검증된 바 있다.

沒藥은 橄欖科 (감람나무: Burseraceae)에 속한 低矮灌木 혹은 喬木인 몰약나무와 애륜모 몰약나무의 幹枝에서 얻은 樹脂로, 內服하면 活血祛瘀, 止痛, 消瘡癰疽하고 外用하면 消腫生肌한다고 알려져 있다²⁹⁾. 沒藥의 국내 연구결과 효능으로는 항암³⁰⁾, 혈관 신생억제³¹⁾, 살균³²⁾, 피부재생³³⁾, 진통³⁴⁾, 소염³⁵⁾, 항염증³⁶⁾, 항산화 및 화장품 약리 활성³⁷⁾ 등이 보고되었으나 비만에 대한 연구 결과는 아직까지 이루어지지 않았다.

이에 본 저자는 비만의 병기 중 하나인 어혈을 제거하는 沒藥의 효능에 착안하여 지방 전구 세포인 3T3-L1 세포를 이용하여 비만 유발 인자, 유전자 발현량 및 Oil red-O 염색 등을 통한 항비만 효능을 확인하였으며, 유의적인 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

사용된 시약은 gel red (Sigma Co., U.S.A.), Oil red O (Sigma Co., U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS: Welgene, Korea), bovine calf serum (BCS: Gibco BRL Co., U.S.A.), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM: Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS: Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), dimethyl sulfoxide (DMSO: Sigma Co., U.S.A.), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), streptomycin (Hyclone Co., U.S.A.), agarose (FMC Co., U.S.A.), total RNA prep kit (Intronbio., Korea), Fatty acid detection kit (Genbio Co., U.S.A.), ACC detection kit (Sigma Co., USA)을 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), deep-freezer (Sanyo Co., Japan),

thermocycler system (MWG Biotech Co., Germany), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 시료의 조제

본 연구에 사용한 沒藥 (Myrrh)은 (주)음니허브에서 구입하였고 대전대학교 TBRC-RIC에서 정선 후 사용하였다. 沒藥 100 g에 80% 에탄올 1,000 ml을 넣고 2시간 동안 환류추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 13.5 g의 분말을 얻었다 (수득률 13.5%). 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80°C)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

3. 세포 배양 및 세포 분화

실험에 사용된 3T3-L1 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 동결된 3T3-L1 세포를 해동시킨 후 50 ml 튜브에 옮기고, PBS 9 ml을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 세포가 있는 튜브에 10% bovine calf serum (BSA)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml을 넣어 부유시켰다. 100 mm dish에 9 ml의 배지를 넣고, 부유시킨 세포 1 ml을 넣어 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다. 세포 분화는 3T3-L1 세포의 밀도가 80%가 된 것을 확인 후 differentiation media (DM, 10% FBS, 10 µg/ml insulin, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM IBMX)으로 교체 하여 몰약 추출물을 각각 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도로 처리하고 2일간 배양하였다. 이후 Differentiation maintain media (DMM, 10% FBS, 10 µg/ml insulin)으로 교체하고 몰약 추출물을 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도로 처리하였으며, 2일 간격으로 DMM과 몰약 추출물을 교체하여 7일 동안 배양하였다.

4. 세포독성 측정

3T3-L1 세포는 10% bovine calf serum (BCS)과 1% antibiotics (A/A)로 조성된 DMEM으로 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였으며, 96 well plate에 104 cells/well씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 몰약 추출물을 각각 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 µl의 WST solution을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 450nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

5. Triglyceride (TG) 측정

Triglyceride를 측정하기 위해서 triglyceride detection kit을 사용하였다. 분화된 3T3-L1 세포를 PBS로 세척하였고, lipid extraction buffer 100 µl를 넣은 후 30분 동안 90~100°C에 두었다. 아이스박스에 옮긴 뒤 1분 동안 shake 하였다.

96 well plate에 50 μ l씩 옮긴 뒤 lipase solution 2 μ l를 넣고 10분 동안 상온에 두었다. kit의 master mix를 50 μ l 씩 넣고 상온에서 30분 동안 암소에 두었다. 과정 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 유전자 발현량 측정

실험종료 후 분리한 비장조직을 동결시킨 뒤 total RNA prep kit을 이용하여 RNA를 추출하였다. 역전사 반응은 추출한 RNA를 RT premix kit의 mixture를 사용하여 first-strand cDNA를 합성하였으며 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다. RT-PCR은 DNA polymerase 1U/tube에 250 mM dNTPs mix, RT buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 30 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)를 포함한 mixture에 각 샘플과 primer를 넣고 PCR을 시행하였다. 사용된 primer는 아래와 같다(Table 1). 1% agarose gel에 전기영동 후 유전자발현의 여부를 UV로 촬영하여 각 그룹별로 band를 확인하고, RNA 발현을 나타내었다.

Table 2. The Sequences of Primers

| Primer | F/R | Sequences |
|----------------|-----|----------------------------|
| aP2 | F | GTGGGAACCTGGAAGCTTGT |
| | R | TGCTCTTCACCTTCCTGTGC |
| C/EBP α | F | GGTGCTGGAGTTGACCAGTG |
| | R | CGGAATCTCCTAGTCTGGC |
| C/EBP β | F | CCTTATAAACCTCCCCTCG |
| | R | TCCAGGTAGGGCTGAAGTC |
| FAS | F | GTTCGACCTGGTCTCAACT |
| | R | GACTCCATCACGAATGCCAG |
| PPAR γ | F | GAGCCGTGACCACTGACAAC |
| | R | TTGGCTGGTGCCAGTAAGAG |
| SREBP1c | F | GTGTGCACCGTAGTCTGGG |
| | R | CAGGTCAGCTTGTTGCGAT |
| β -actin | F | TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT |
| | R | CCTAGAAGCACTGCGGTGCACGATG |

7. Fatty acid 측정

Fatty acid를 측정하기 위하여 fatty acid detection kit을 사용하였다. 3T3-L1 세포를 96 well plate에 104 cells/well로 분주하여 2일간 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 세포의 밀도가 80%이 된 것을 확인 후 DM으로 교체하여 몰약 추출물을 각각 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도로 처리하고 2일간 배양하였다. PBS로 세척한 후 DMM으로 교체하여 몰약 추출물을 각각 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도로 처리하였으며, 2일 간격으로 DMM과 몰약 추출물을 교체하여 7일 동안 배양하였다. 배양 후 free fatty acid (FFA) reagent A solution 100 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 반응 후 FFA reagent B solution 50 μ l를 넣고 다시 37 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 반응하였다. 이를 상온에서 5분 동안 둔 후 plate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. Assay for Acetyl-coenzyme A Carboxylase (ACC) 측정

3T3-L1 세포를 96 well plate에 104 cells/well로 분주하여 2일간 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 세포의 밀도가 80%이 된 것을 확인 후 DM으로 교체하여 몰약 추출물을 각각 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도로 처리하고 2일간 배양하였다. PBS로 세척한 후 DMM으로 교체하여 몰약 추출물을 각각 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도로 처리하였으며, 2일 간격으로 DMM과 몰약 추출물을 교체하여 7일 동안 배양하였다. 배양 후 ACC detection kit을 이용하여 ACC를 측정하였으며, ACC의 양은 대조군의 값에 대한 백분율로 나타내었다.

9. Oil red O 염색

몰약 추출물이 3T3-L1 세포의 분화를 억제하는지 여부를 확인하기 위하여 분화된 3T3-L1 세포에서 형성되는 중성지방을 특이적으로 염색하는 Oil red O 염색법을 시행하였다. 배양된 세포의 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후 10% formalin용액을 넣은 뒤 1시간 동안 고정 시켰다. 고정액을 제거하고 증류수로 세척한 후 Oil red O 염색약을 넣고 2시간 동안 염색하였다. 염색 후 증류수로 세척하고, 염색된 세포를 현미경을 이용하여 관찰하였다.

10. 통계처리

본 연구에서 얻어진 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 평균값 사이에 대한 유의성은 SPSS 11.0의 unpaired student's t-test를 사용하여 p<0.001, p<0.01 및 p<0.05의 신뢰수준에서 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. 세포 독성

대조군을 100.0 \pm 5.9%로 하였을 때, 몰약 추출물 1 μ g/ml 농도 처리군은 98.1 \pm 4.6%, 10 μ g/ml 농도 처리군은 99.2 \pm 4.4%, 100 μ g/ml 농도 처리군은 99.5 \pm 6.9%로 나타나, 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

2. Triglyceride의 생성에 미치는 영향

대조군을 100.0 \pm 1.6%로 하였을 때, 몰약 추출물 1 μ g/ml 농도 처리군은 87.9 \pm 1.4% (* : p<0.05), 10 μ g/ml 농도 처리군은 81.5 \pm 4.8% (** : p<0.01), 100 μ g/ml 농도 처리군은 78.8 \pm 2.7% (** : p<0.01)로 감소하여, 농도 의존적으로 유의성 있는 결과가 나타났다(Fig. 2).

3. 지방세포 분화에 관련된 전사인자에 미치는 영향

지방세포 분화와 관련된 전사인자인 C/EBP β , C/EBP α , PPAR γ , SREBP1c, aP2, fas의 유전자 발현량을 측정된 결과,

몰약 추출물 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 모두 현저한 감소가 나타났다(Fig. 3).

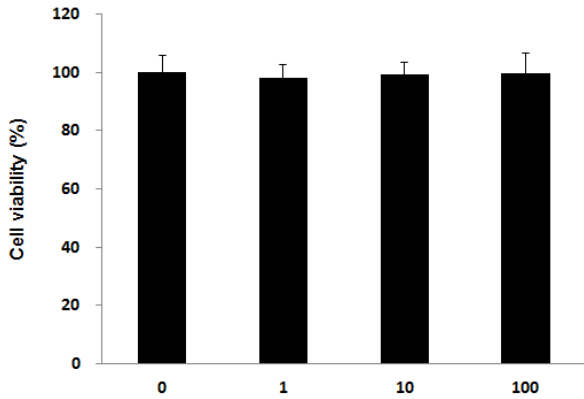


Fig. 1. Effects of Myrrh extract on the cell viability in 3T3-L1 cells. The cells were treated with 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ and 100 $\mu\text{g/ml}$ of Myrrh for 24hr. Cell viability was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

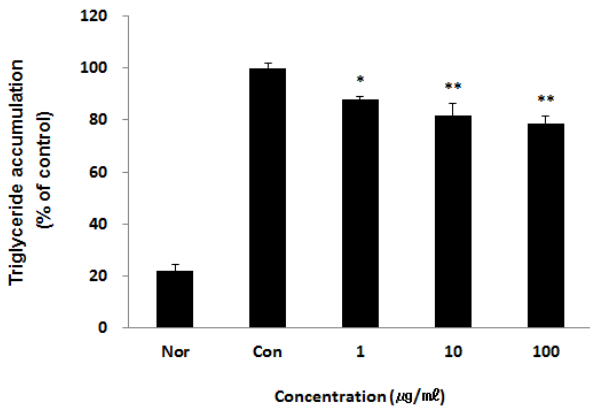


Fig 2. Inhibitory effect of Myrrh on the triglyceride (TG) accumulation in 3T3-L1 cells. The rates of TG accumulation were analyzed by ELISA reader. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. (Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control).

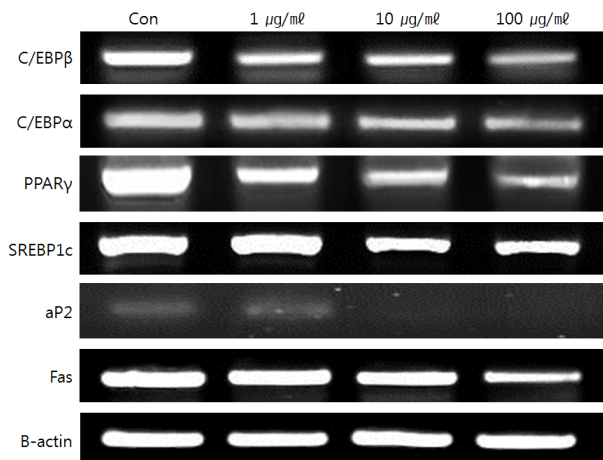


Fig 3. Effect of myrrh on the mRNA expression of adipogenic transcription factors. C/EBP β , C/EBP α , PPAR γ , SREBP1c, aP2 and FAS. Total RNA was isolated and reverse-transcribed. The β -actin was used as an internal control.

4. Fatty acid의 생성에 미치는 영향

대조군은 $149.1 \pm 7.3 \mu\text{M}$ 생성을 나타낸 반면, 몰약 추출물 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리군은 $141.1 \pm 6.4 \mu\text{M}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리군은 $137.7 \pm 5.8 \mu\text{M}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리군은 $130.1 \pm 3.4 \mu\text{M}$ (* : $p < 0.05$)로 감소하여, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서만 유의성 있는 결과가 나타났다(Fig. 4).

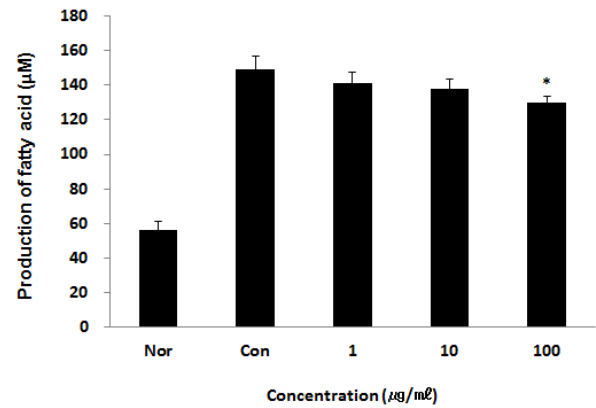


Fig 4. Effect of Myrrh on the fatty acid production in differentiated 3T3-L1 cells.

The cells were treated with different concentrations of the Myrrh for 9 day after initiation with DMM. The rates of fatty acid production were analyzed by ELISA reader. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. (Significance of results, * : $p < 0.05$ compare to control).

5. Acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 생성에 미치는 영향

대조군을 $100.0 \pm 3.1\%$ 로 하였을 때, 몰약 추출물 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리군은 $95.8 \pm 3.0\%$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리군은 $87.4 \pm 2.5\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리군은 $79.0 \pm 5.6\%$ (* : $p < 0.05$)로 감소하여, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서만 유의성 있는 결과가 나타났다(Fig. 5).

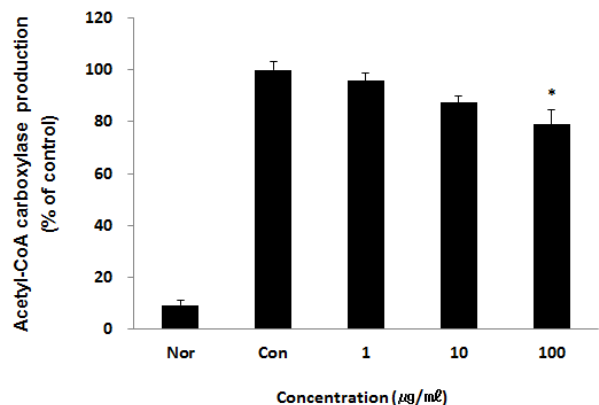


Fig 5. Effect of Myrrh on the Acetyl-CoA carboxylase production by differentiated 3T3-L1 cells.

The cells were treated with different concentrations of Myrrh for 9 day after initiation with DMM. The rates of ACC production were analyzed by ELISA reader. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. (Significance of results, *** : $p < 0.001$ compare to control).

6. Oil red O 염색에 의한 세포내 지방구 함량에 미치는 영향

Oil red-O 염색에 의한 몰약 추출물이 세포내 지방구 함량에 미치는 영향을 확인한 결과, 대조군과 비교하였을 때, 몰약 추출물을 처리한 군에서 농도 의존적으로 지방구가 감소하는 것을 육안으로 확인 할 수 있었다(Fig. 6).

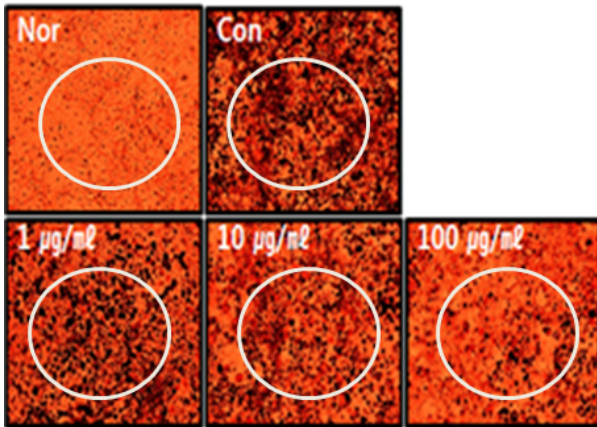


Fig 6. Inhibitory effect of Myrrha on the lipid droplet formation in 3T3-L1 cells. The intracellular lipid droplets were detected by Oil red O staining and optically observed by an inverted microscope ($\times 2.5$).

IV. 고 찰

肥滿은 음식의 섭취와 소비 사이의 에너지 불균형 상태를 의미한다. 현재까지 肥滿에 대한 원인으로는 유전적, 환경적, 심리적 요인과 에너지 대사의 불균형 등으로 초래되며, 당뇨병, 이상 지질혈증, 고혈압, 골관절염 등의 질병의 위험도를 증가시킬 수 있다고 알려져 있어 안전하고 효과적인 비만 치료제의 연구가 활발히 진행되고 있다.

한의학에서 肥滿의 원인으로 氣虛, 濕, 痰, 瘀血, 七情內傷 등이 있지만, 근본적인 병리 상태를 脾胃의 機能失調로 인해 氣虛를 초래하게 되고, 痰, 濕, 瘀血 등은 그의 병리적인 산물이라고 하는 견해가 있다. 또한 《血瘀論》에서 “濕濁, 痰飲皆爲有形之物, 痰濁一旦深入血分, 一則阻滯脈絡氣機, 脈絡氣機受阻, 則血必瘀滯; 二則痰濁與血相結, 形成痰瘀膠結阻塞脈絡, 血必瘀滯.”라고 하여 비만의 병리적인 산물인 痰과 瘀血의 상관성을 제시한 바가 있다³⁸⁾. 증상에 따라 虛證과 實證으로 나누며 虛證에는 健脾, 益氣, 補腎, 溫養, 養陰, 實證에는 燥濕化痰, 利水, 消導, 活血化痰 등의 치법을 많이 사용한다³⁹⁾.

본 연구에서 사용한 沒藥은 性味が 苦, 平 無毒하고 肝·脾로 歸經하며, 內服하면 活血祛瘀, 止痛, 消瘡癰疽하고 外用하면 消腫生肌한다⁴⁰⁾. 沒藥의 主治에 대해 『日華本草』⁴¹⁾는 “破癥結宿血 消腫毒”, 『本草綱目』⁴²⁾은 “散血消腫 定痛生肌 沒藥敗血 能止痛 消腫生肌”, 『本草述』⁴³⁾은 “久服舒筋膜通血脈”, 『本草衍義』⁴⁴⁾는 “通滯血”, 『海藥本草』⁴⁵⁾는 “推陳置新 能生好血”, 『藥性本草』⁴⁶⁾는 “心腹血瘀 筋骨疼痛 痛不可忍”이라 하였다.

본 연구에 사용된 지방전구세포인 3T3-L1 세포는

dexamethasone, IBMX, insulin 및 FBS에 의해 다양한 전사인자들이 유도되면서 지방세포로 분화되는데, 이러한 지방세포의 분화에는 peroxisome preiferator activated receptor (PPAR) δ , sterol regulatory element binding protein (SREBP)1c 등의 전사인자들이 작용하면서 진행된다. 이때, 분화된 지방세포 내의 지방구 (lipid droplet)는 지질대사 및 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{47,48)}. 이러한 전사인자들은 지방세포로 분화가 유도되는 중에 다른 시점에서 발현되면서 서로의 상호작용을 통하여 여러 지방세포 특이 유전자들의 발현이 조절되고, 지방대사의 활성화와 지방세포로 형성이 이루어진다⁴⁸⁾.

Adipogenesis는 지방전구세포 (pre-adipocyte)가 지방세포 (adipocyte)로 만들어지는 분화 과정으로서 세포형태, 다양한 유전자 발현 및 호르몬 민감성 등의 변화를 동반하게 된다^{49,50)}. 분화된 지방세포 내의 지방구 (lipid droplet)는 지질대사 및 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. TG는 TG-rich lipoprotein 의해 유도되고, 에너지 원료로 사용되며, 후에 남은 TG는 지방세포에 저장된다^{49,50)}.

Adipogenesis 과정에서는 peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ) 및 cytidine cytidine adenosine adenosine thymidine (CCAAT)/enhancer binding proteins (C/EBP α , C/EBP β 및 C/EBP δ) 등과 같은 분화유도인자가 작용하게 되는데, adipogenic transcription factor로써 이들을 조절하여 adipogenesis를 조절할 수 있다⁵¹⁾. Adipogenesis 과정 중 C/EBP- β 및 C/EBP- δ 가 최초로 발현되면 이를 통해 지방 분화의 중추적인 역할을 하는 C/EBP- α 와 PPAR- γ 의 발현이 유도되어 상호작용하면서 상승효과를 일으켜 지질 대사에 나타나는 fatty acid synthase (FAS)와 fatty acid binding protein 4 (aP2) 등의 지방분화 마커 유전자들의 발현을 촉진 시키게 된다^{52,53)}. 이때 fatty acid는 지방세포가 분화되는 동안 PPAR- γ 의 리간드로 작용하여 활성화시키며, 더하여 지방의 축적은 PPAR- γ 를 더욱 활성화시키며^{54,55)}, adipocyte fatty acid-binding protein 라고도 불리는 adipocyte protein (aP) 2는 지방세포를 비롯하여 대식세포에서 발현되는 단백질로 발현 시 세포내 지방산의 수송과 대사에 영향을 주며, 세포막을 통한 세포내 지방산의 유입과 유출, 확산에 관여하는 등 다양한 세포 소기관으로의 지방산 이동을 조절한다.

Lipogenesis에 영향을 미치는 sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP1c)의 발현이 촉진되면 SREBP1c는 C/EBP- α 와 PPAR- γ 와 협력하여 aP2와 FAS의 발현을 상승시키는 역할을 한다^{56,57)}. SREBP1c의 발현은 지방세포 분화뿐만 아니라 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 생성과도 관련이 되어져 있다고 알려져 있는데, 간과 백색지방 조직에서 주로 발현되는 ACC는 malonyl-CoA로 전환되어 carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1)의 발현을 저해하여 β -oxidation을 억제한다⁵⁸⁾. 이러한 이유로 ACC의 억제는 대사성 질환과 관련된 비만, 당뇨 등의 유효한 약제 개발을 위한 비만 지표로 유용하게 활용되고 있다⁵⁹⁾. 본 연구결과 3T3-L1 지방 전구세포에서 沒藥은 독성이 나타나지 않았으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 TG 생성과 지방세포 분화에 관련된 전사인자 발현량, fatty acid와 ACC를

감소 시켰다.

이와 같이 沒藥이 비만 유관 인자에 효능을 보임에 따라 지방의 분화를 얼마나 억제하는지를 확인하기 위하여 화합물을 3T3-L1 세포에 처리한 후 지방만을 붉은색으로 염색하는 oil red-O 염색을 시행한 결과, 대조군에 비하여 농도 의존적으로 지방구가 감소하는 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 앞선 3T3-L1 세포 실험결과와 부합되는 결과도 출되어 沒藥이 *in-vitro* 실험에서 항비만에 효능이 있음을 증명함에 따라 추후 전임상 단계인 *in-vivo* 실험을 통해 효능을 검증하고자 한다.

위의 결과를 종합해 보면, 沒藥은 지방전구세포의 독성 평가를 통해 안전한 것으로 확인되었으며, 비만 유발 인자 및 유전자 발현량의 감소 효과가 객관적으로 확인되어 비만에 대한 효과적인 한약재로서의 가능성을 제시해 주고 있으며 향후 임상에서 임상 활용 제고와 더불어 보다 효과적인 비만 치료제 개발을 위한 기초적 자료로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 沒藥의 다양한 효능을 객관적으로 검증하기 위하여 지방전구세포인 3T3-L1 세포를 이용하여 세포 독성 및 Triglyceride, 지방세포 분화에 관련된 전사인자, fatty acid, acetyl-CoA carboxylase 생성량에 대한 연구를 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군에 비해 몰약 추출물은 98% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.
2. 대조군에 비해 몰약 추출물은 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 Triglyceride 생성을 유의성 있게 감소시켰다.
3. 대조군에 비해 몰약 추출물은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 지방세포 분화에 관련된 전사인자 생성을 감소 시켰다.
4. 대조군에 비해 몰약 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 fatty acid 생성을 유의성 있게 감소 시켰다.
5. 대조군에 비해 몰약 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 Acetyl-CoA carboxylase 생성을 유의성 있게 감소 시켰다.

이상의 결과들로 보아 沒藥 에탄올 추출물은 안전하고 항비만 효능이 있음이 실험적으로 규명되었다. 이와 같은 유의적인 결과는 폭넓은 질환에 대한 신규 치료제 개발에 기초적 자료를 제공할 수 있을 것으로 보이며, 한의학적 관점에서는 객관적 규명을 통한 EBM 구축에 일조할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명 의학연구 지역혁신 센터의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

1. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International journal of obesity*. 2008 ; 32(9) : 1431-7.
2. Fied AE, Coakley EH, Must A, Spadano JL, Laird N, Dietz WH, Rimm E, Colditz GA. Impact of overweight on the risk developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch Intern Med*. 2001 ; 161(1) : 1581-6.
3. Must, A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA*. 1999 ; 282(16) : 152-9.
4. Polesel J, Zucchetto A, Montella M, Dal Maso L, Crispo A, La Vecchia C, Serraino D, Franceschi S, Talamini R. The impact of obesity and diabetes mellitus on the risk of hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol*, 2009 ; 20(2) : 35-7.
5. Hu G, Jousilahti P, Nissinen A, Antikainen R, Kivipelto M, Tuomilehto J. Body mass index and the risk of Parkinson disease. *Neurology*. 2006 ; 67(11) : 195-9.
6. Whitmer RA, Gunderson EP, Quesenberry CP, Zhou J, Yaffe, K. Body mass index in mid life and risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Curr Alzheimer Res*. 2007 ; 4(2) : 103-9.
7. Kopelman PG. Medical management of obesity. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2007 ; 68(2) : 89-93.
8. Yoon YS. Effects of Cheongshimyeonja-tang on Body Weight and Serum Lipid Level in High Fat Diet Induced Obese Mice ; Yiksan : Wonkwang University Graduate School, 2011.
9. Wang B. huangdineijing lingshu, Taipei : Taibeizhonghuashuju. 1972 : 155, 209.
10. Li C. Bianzhuyixuerumen, Korea : DS print. 1990 : 108, 278.
11. Zhang J. Zhongjingquanshu, Korea : Iljungsang. 1992 : 353.
12. Zhang JB. Zhangshileijing. Korea : Seongbosa. 1982 : 586.
13. Liang WJ. Huangdineijingsuwenjieshi, Korea : Seongbosa. 1980 : 243.
14. Zhongyiyuanjiuyuanzhubian. Zhongguozhengzhuang-jianbiezhenduanxue. China : Renminweishengshe-chuban. 1987 : 43.
15. Chuan JZ. Chuanjingzhunannuke. Korea : DS print. 1984 : 106.

16. Li FJ. Zhengzhuangjianbiezhiliao. Korea : Seongbosa, 1991 : 77.
17. Liu WS. Hejianliushu. Korea : Seongbosa, 1976 : 82.
18. Zhen SZ. Shishimilu. Korea : Haengrim Seowon, 1982 : 76.
19. Li G. Dongyuanshishu. Korea : DS print, 1983 : 70.
20. Kim TH, Kim HI, Lee KG, Lee SR, Lee CH. Effects of Banggihwanggi-Tang on Obesity-related Enteroendocrine Cells and Neuropeptides in Mice. Korean J. oriental physiology & pathology. 2012 ; 26(4) : 497-505.
21. Song YS. Effects of Bangkihwangkitang and Lycii fructus on the Weight of Obese Rats. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 1991 ; 1(1) : 25-43.
22. Yang JH, Kim SS, Lee JS, Jung SH, Shin HD. An Experimental Study on the Efficacy of Sochangeumja. Journal of oriental rehabilitation medicine. 1992 ; 2(1) : 9-22.
23. Kim JY, Song YS. The Effects of Oryungsan-gagampang on Leptin Levels, Leptin Receptor Levels and Differentiation of 3T3-L1 Adipocyte. Journal of oriental rehabilitation medicine. 1994 ; 4(1) : 69-84.
24. Chio WH, Seo BI. The Effects Of Chekamuiyintang On Biochemical And Histological Changes Of Rats Fed High Diet. Journal of Korean Medicine. 2000 ; 21(3) : 31-9.
25. Han MG, Seo HG, Kim EH. The Effects of Daesiho-Tang on Body Weight and Biochemical Changes of Rats Fed High Diet. The Journal of Korea CHUNA Manual Medicine. 2001 ; 2(1) : 177-86.
26. Yoon YG. Effects of Gamihwangryunjihwangtang on Body Weight, Serum Total Cholesterol, High Density Lipoprotein and Triglyceride in Overweight. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2001 ; 15(1) : 160-3.
27. Lee KJ, Jeon BH, Kim GY. Effects of Taeyeum-joweetang on the obesity of mouse and induced adipocyte 3T3-L1. Journal of Sasang Constitutional Medicine. 1996 ; 8(2) : 219-38.
28. Kim SB, Go BH, Song IB. The effects of proliferation and differentiation on adipocyte 3T3-L1 by prescriptions and Taeyang-In and Taeum-In. Journal of Sasang Constitutional Medicine. 1998 ; 10(2) : 533-64.
29. Heo SY, Kang HS. Experimental Study on the Effect of Chungpesagantang in Obese Rats. Journal of oriental rehabilitation medicine. 1998 ; 8(2) : 106-26.
30. Guójiā-Zhōngyīyàoquǎnlǐjù 《Zhōnghuá-běncǎo》 biānwěihuì. Zhōnghuá-běncǎo. China : Shànghǎi-kēxuéjìshù-Chūbǎnshè. 1999 : 3854.
31. Kim SJ. Effects of Myrrha on Pancreatic Cancer Cells ; Yiksan : Wonkwang University Graduate School, 2013.
32. Kang DI, Kim SH, Sim BS, Choi SH, Ann KS, Geum SH. Study on the inhibitory Effect of Molyaksanon Angiogenesis. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2000 ; 14(2) : 91-108.
33. Baek HS, Kang SK, Eo KS, Jeon YH, Hong JP. Effect of antibacterial effects of myrrh, rhatany, chamomomilla against to oral microorganisms. Journal of Oral Medicine and Pain. 2013 ; 38(4) : 299-312.
34. Nan SW, Lee BK, Jo HK. Acceleration of Wound Healing on Scald Burn Skin Using Irradiation of TDP and Skin Spread of Myrrha. The Korea Journal of Herbology. 2003 ; 18(4) : 263-8.
35. Ann CJ, Ann BC, Park DS. The analgesic effect of aqua-acupuncture with Corydalis Tuber, Olibanum Mastix & Myrrha. The Acupuncture. 1994 ; 11(1) : 145-58.
36. Kang IK, Lee SC, Jeong JP, Son SH. Studies on the clinical and microbiological effect of toothpaste containing theae folium, myrrha, mori radices and cimicifugae rhizoma extract. Journal of Periodontal & Implant Science. 1991 ; 21(1) : 173.
37. Kim MS. Inhibitory Effects of Myrrh on the LPS-induced inflammatory responses ; Yiksan : Wonkwang University Graduate School, 2010.
38. Jiang S. Xueyulun. China : Zhongguoyiyaokeji-Chubanshe, 2001 : 39-40.
39. Jung HS. Efficacy of Alismatis Orientale Rhizoma on Obesity induced by High Fat Diet. The Korea Journal of Herbology. 2013 ; 28(3) : 95-106.
40. Kim DG, Bae GS, Choi SB, Jo IJ, Shin JY, Lee SK, Kim MJ, Kim MJ, Choo GC, Song HJ, Park SJ. Protective effects of Commiphora myrrha on acute pancreatitis. The Korea Journal of Herbology. 2014 ; 29(6) : 15-20.
41. Wu J. Rihuaziji. China : anmeikexuejishuChubanshe, 2005 : 75
42. Li SZ. Bencaogangmu. China : renminweisheng-chubanshe, 1982 : 1957.
43. Liu RJ. Bencaoshu. China : BeijingChubanshe, 2000 : 28.
44. Kou ZS. Bencaoyanyi. China : yishengtang, 1994 : 92.
45. Li X. Changzhijunxiao haiyaobencao. China : RenminweishengChubanshe, 1997 : 7.
46. Zhen Q. yaoxingbencao. China : Shandongkexuejishu-Chubanshe, 1991 : 58.

47. Rosen ED, Walkey CJ, Ouisserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes&Dev.* 2000 ; 14(11) : 1293–307.
48. Jeon T, Hwang SG, Hirai S, Matsui T, Yano H, Kawada T, Lim BU, KiD. Red yeast rice extract suppress adipogenesis by down-regulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 cells. *Life Sci.* 2004 ; 75(26) : 3195–203.
49. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 2004 ; 306(5700) : 1383–6.
50. Halle M, Berg A, Northoff H, Keul J. Importance of TNF- α and leptin in obesity and insulin resistance: a hypothesis on the impact of physical exercise. *Exerc. Immunol. Rev.* 1998 ; 4(1) : 77–94.
51. White UA, Stephens JM. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2010 ; 318(1) : 10–4.
52. El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR gamma and C/EBPalpha. *Journal of Biological Chemistry.* 1999 ; 274(12) : 7946–51.
53. Szatmari I, Rajnavolgyi E, Nagy L. PPAR gamma, a lipidactivated transcription factor as a regulator of dendritic cell function. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006 ; 1088(1) : 207–18.
54. Zhang L, Chawla A. Role of PPAR γ in macrophage biology and atherosclerosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2004 ; 15(10) : 500–5.
55. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994 ; 79(7) : 1147–56.
56. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Molecular and Cellular Biology.* 1999 ; 19(8) : 5495–503.
57. Tang QQ, Zhang JW, Lane MD. Sequential gene promoter interactions of C/EBP β , C/EBP α , and PPAR γ during adipogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004 ; 319(1) : 235–9.
58. Payne VA, Au WS, Lowe CE, Rahman SM, Friedman JE, O'Rahilly S, Rochford JJ. C/EBP transcription factors regulate SREBP1c gene expression during adipogenesis. *Biochemical Journal.* 2010 ; 425(1) : 215–23.
59. Harwood HJ. Acetyl-CoA carboxylase inhibition for the treatment of metabolic syndrome. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2004 ; 5(3) : 283–9.