

## 비파엽추출물의 지방분해효소 조절을 통한 국소 지방분해 효능

이운규 · 최유연 · 양응모

경희대학교 한의과대학 융합한의과학교실

### Effect of *Eriobotrya folium* on Local Fat via Regulation of Lipase Secretion

Woonkyeu Lee, You Yeon Choi, Woong Mo Yang

Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Received: November 6, 2017

Revised: November 25, 2017

Accepted: November 27, 2017

**Correspondence to:** Woong Mo Yang  
Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 23 Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul 02447, Korea  
Tel: +82-2-961-2209  
Fax: +82-2-961-2209  
E-mail: wmyang@khu.ac.kr

Copyright © 2017 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

**Objectives:** In this study, the lipolytic effects of *Eriobotrya folium* extract (EFE) on local fat was investigated in high fat diet (HFD)-induced obesity mouse and 3T3-L1 adipocytes.

**Methods:** C57BL/6J mice (5 weeks) were fed HFD for 6 weeks to induce obesity. EFE (20 mg/ml, 100  $\mu$ l) or saline (100  $\mu$ l) as a normal control was injected into left inguinal fat pad region, 3 times per a week for last 2 weeks. After sacrifice, body weight, and histological changes of the inguinal fat pad were evaluated. The expressions of hormone-sensitive lipase (HSL) and adipose triglyceride lipase (ATGL) in inguinal fat pad were analyzed by Western blotting. Also, lipid accumulation and lipases release were determined in 3T3-L1 adipocytes by oil red o staining.

**Results:** EFE significantly reduced the weight of inguinal fat pad and the size of adipocytes in HFD-induced obesity mice compared to control. The treatment of EFE up-regulated the expressions of HSL and ATGL in inguinal fat pads of obesity mice, as well as 3T3-L1 adipocytes. In addition, EFE inhibited the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes in a dose dependent manner.

**Conclusions:** EFE showed lipolytic effect on local fat of HFD-induced obesity mice by up-regulation of the lipases secretion. This suggests that EFE could be considered as anti-obese substance with lipolytic property on local fat.

**Key Words:** *Eriobotryae folium*, Local fat, Obesity, Hormone-sensitive lipase, Adipose triglyceride lipase

## 서론

비만(肥滿)은 과다한 지방조직의 축적 상태로서, 음식에서 섭취되는 칼로리가 신체 활동 등으로 소비되는 양보다 축적되는 양이 많아 야기되는 대사 불균형 상태로 정의된다<sup>1)</sup>. 연령, 인종, 사회 경제적인 요소, 유전, 신경 내분비 변화 및 장내 미생물 등의 다양한 요인이 비만과 관계되어 있으며<sup>2)</sup>, 최근 20년 사이 우리나라의 비만 유병률은 경제 성장과 더불어 식습관 및 생활습관이 서구화됨에 따라 꾸준히 증가하고 있는 추세이다<sup>3)</sup>. 또한 비만으로 인한 직접 비용은 약 6

천억 원 이상, 비만 관련 질환의 직접 의료비는 1조 9천억 원으로 추산되고 있어 개인적, 국가적 비용 부담이 사회 경제적 문제로 대두되고 있다<sup>4)</sup>.

비만의 위험도는 체중의 절대적 수치가 아닌, 체지방의 상대적 분포 및 양과 연관되는데<sup>5)</sup>, 복부, 둔부 및 대퇴부 같은 특정 부위에 과도하게 지방이 축적된 국소비만은 전신비만 및 비만 관련 질환과도 밀접한 관계가 있다<sup>6)</sup>. 특히 복부 비만은 복강 내 지방의 과잉 축적으로 인한 내장비만으로서 피하지방에 비해 당뇨, 고지혈증, 고혈압 등의 만성 성인질환의 주범으로 주목받고 있다<sup>7)</sup>. 최근에는 삶의 질 향상과

더불어 미의 기준이 마르고 균형 잡힌 체형으로 변화함에 따라 비만치료도 단순히 건강관리와 전신 체중 감량의 차원을 넘어 개개인의 체형 관리라는 미용상의 목적을 위한 국소비만치료로 변해가고 있는 추세이다<sup>8,9)</sup>.

현재 사용되고 있는 국소지방치료로는 지방분해 주사, 삼투압 원리를 이용한 저장성 지방용해(hypotonic pharmacologic lipo-dissolution) 주사, 이산화탄소의 팽창 압력을 이용한 카복시테라피(carboxy therapy), 림프 순환을 촉진하여 지방분해하는 lypolytic lymph drainage, 약침 등 다양하지만<sup>10)</sup>, 여러 부작용들로 인해 안전성에 대한 문제가 제기되고 있다. 대표적으로 콩에서 추출된 성분인 phosphatidyl choline (PPC)로 “리포빈”, “리피씨”, “리포스타빌” 등 국소 지방분해 주사의 성분으로 이용되고 있는데 종창, 멍, 이상감각 등 부작용이 보고되고 있다<sup>11,12)</sup>. 이외에도, PPC 주사의 용매제로 사용되는 “데옥시콜레이트(deoxycholate)”가 암을 유발하고<sup>13)</sup>, 주사부의 열감, 붉어짐, 피부 괴사, 섬유화 증가, 지방 세포막의 파괴, 지방층의 염증, 대식세포의 침윤, 위축 등의 위험성이 있는 것으로 보고되었다<sup>14)</sup>. 따라서 기존 치료법들의 광범위한 부작용과 위험성으로 인해 독성이 적으면서 체중감소에 효과적인 천연물을 이용한 비만치료제 개발에 대한 관심이 높아지고 있다<sup>15,16)</sup>.

한의학에서는 비만의 원인과 병기(病機)를 허증(虛證)과 실증(實證)으로 나누어, 허증은 “脾土虛弱, 脾腎陽虛, 肝腎陽虛”으로, 실증은 “膏粱厚味の 過食, 濕, 痰, 脾胃積熱, 肝熱挾濕, 瘀血” 등으로 변증하였고<sup>17)</sup>, 치료법으로 허증에는 “養脾益氣, 補脾肺氣”, 실증에는 “行濕, 祛痰, 疏肝理氣”가 적용되었으며<sup>18)</sup>, 각 변증에 따라 약물요법이 주를 이루고, 침구요법, 절식요법, 기공요법, 약선 요법, 기타 한방 물리요법 및 자연요법이 동시에 병행되어 사용되었다<sup>19)</sup>. 비파엽(枇杷葉, *Eriobotryae folium*)은 장미과(薔薇果, Rosaceae)에 속한 상록소교목인 비파나무 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.의 葉으로, 연중 수시로 채취하여 曬乾한다<sup>20)</sup>. 성질은 微寒하고 苦한 性味로, 肺胃經에 歸經하여 清肺止咳하고 降逆止嘔하는 효능을 가져 肺熱咳嗽, 氣逆喘急, 胃熱嘔逆, 煩熱口渴 등을 치료한다<sup>20)</sup>.

국소 부위 지방 축적이 심해지면 림프관 및 미세혈관의 순환 장애가 쉽게 유발되어 피부에 셀룰라이트가 형성되기도 하는데<sup>21)</sup>, 이는 한의학적으로 濕痰과 그로 인한 氣機鬱

滯의 기전과 유사하다고 생각된다. 肺는 主氣하고 通調水道하므로<sup>22)</sup>, 전신적인 비만의 원인인 濕, 痰飲 및 그로 인한 內熱에 대한 효과뿐만 아니라, 국소비만에 肺氣를 宣通하여 清熱祛痰의 효과를 기대할 수 있는 비파엽의 활용을 고려해 볼 수 있다<sup>18,23)</sup>. 비파엽의 주요 성분은 nerolidol과 farnesol이며 일부 정유가 함유되어 있고, 기타  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, camphene, myrcene 등의 polyphenol, flavonoid 계열 생리활성 물질이 존재하는 것으로 알려져 있다. 이들 성분의 체지방형성 억제효과, 체내 지질대사 개선과 심혈관계 질환의 예방효과에 대한 연구들이 보고된 바 있으며<sup>24)</sup>, 또한, 고지방식이 생쥐에서 비파엽 경구 투여를 통한 고지혈증과 인슐린저항성에 대한 개선 효능<sup>25)</sup>, 식이효율의 감소, 체중 감량 및 혈장 내 중성지방의 감소, 혈장 내 adiponectin의 증가에 따른 비만 억제에 관한 연구가 보고된 바 있다<sup>26,27)</sup>.

현재 비파엽 추출물(*Eriobotrya folium* extract, EFE)의 비만 치료에 대한 연구로는 경구 투여 및 복강 투여를 통한 전신적인 체중 감소 및 항비만 효능<sup>28)</sup>, 녹차와 함께 발효된 EFE의 경구 투여를 통한 항비만 효능<sup>29)</sup>이 보고된 바 있었다. 또한 복강 및 피하 약침주입을 통해 전신 지방의 감소 및 adiponectin, leptin, 혈청 지질에 대한 효능이 확인된 바 있었다<sup>30)</sup>.

하지만 EFE의 국소 부위 처리를 통한 국소 부위 지방 감소 및 분자생물학적 기전이 연구된 논문은 없었다. 따라서 본 연구에서는 고지방 식이로 비만이 유발된 마우스 모델에 EFE를 서혜부에 투여한 후 국소 지방의 지방분해 효능과 그에 따른 약리기전을 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 약물의 제조

본 연구에 사용된 비파엽은 정도생약국(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 300 ml 증류수에 30 g 비파엽을 넣은 후 상온에서 24시간 추출 후, 추가적으로 30분 동안 초음파(sonication) 분쇄 후 여과하였다. 추출물은 정성여과지(quantitative filter paper, 185 mm)로 불순물을 제거하고 감압 농축 후 동결 건조하여 1.87 g 분말 상태의 EFE를 얻었다(yield rate: 11.4%). 얻어진 비파엽 동결건조품 표본

(voucher specimen: #EFE-2016)은 본 연구실에서  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 보관하였다.

## 2. 실험동물

체중 19~21 g인 5주령 수컷 마우스 C57BL/6 (Raon Bio, Yongin, Korea)를 구매하여, 12시간의 주기로 낮과 밤이 교대되며  $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 실내온도와  $50\%\pm 5\%$ 의 습도의 환경에서 사육되었다. 먹이와 물을 자유롭게 먹도록 하며 1주일간 사육하며 7일간의 적응기 후 실험에 사용되었다. 모든 동물실험 과정은 National Institutes of Health의 실험동물관리 규정(Principle of Laboratory Animal Care)과 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 동물윤리 준칙에 의거하여 수행되었다(Permit Number: KHUASP (SE)-16-145).

## 3. 고지방 식이 유발 및 샘플처리 방법

비만 유도를 위해 60% fat을 함유한 고지방식이(high fat diet, HFD; Research Diets, D12492)를 6주간 공급하였다. 매주 체중 측정하여, 마우스의 체중이 입고날짜(0 wk) 체중( $21.8\pm 2.1$  g)에서 약 46.2% 증가( $31.9\pm 2.6$  g)가 확인된 5주째부터 EFE를 2주간 1주일에 3회씩 총 6번 투여하였다(Fig. 1A). EFE 투여는 마우스의 좌측 서혜부 지방조직

(inguinal fat pad)에 20 mg/ml을 100  $\mu\text{l}$  주사하였으며, 우측 서혜부 지방조직 부위에 동일 용량의 생리 식염수를 주사하였다. 각 마우스의 우측 서혜부 지방조직(control, CON)은 좌측 서혜부 지방조직(EFE)의 대조군으로 설정하였다(Fig. 1B).

## 4. 체중 및 식이량 측정

비만 유도 정도를 평가하기 위해 체중 및 사료 섭취량을 전자저울(PAG214, OHAUS pioneer)을 이용하여 1주일에 한 번씩 총 8번 측정하였다. 식이량은 마우스의 1일 사료 섭취량으로 측정하여 계산하였다.

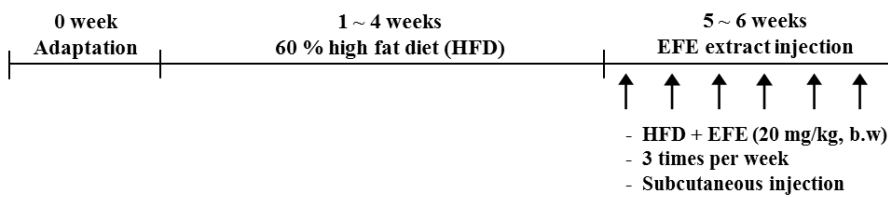
## 5. 서혜부 지방 무게 측정

실험 종료 날(day 46) 모든 마우스를 희생시킨 후 회복하여 우측(CON)과 좌측(EFE) 서혜부 지방조직(inguinal fat pad)의 무게를 각각 전자저울을 사용하여 측정하였다. 서혜부 지방 무게는 대조군을 1로 환산하여 비율(ratio) 값으로 나타내었다.

## 6. 서혜부 지방의 조직학적 평가

지방조직 표본을 제작하기 위해 서혜부 지방조직을 10% paraformaldehyde에서 24시간 동안 고정하고, 충분한 수

(A)



(B)

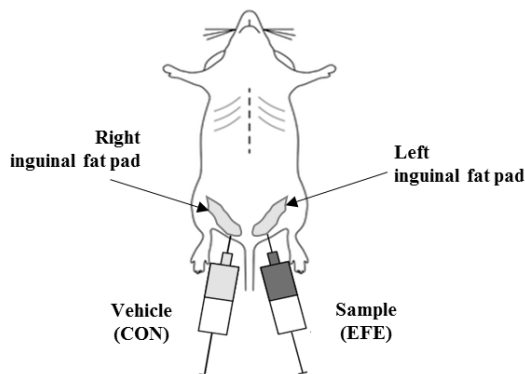


Fig. 1. Experimental schedule (A) and design of sample treatment (B). EFE: *Eriobotryae folium* extract, CON: control.

세(washing) 과정을 통해 조직에 침투되어 있는 고정액을 충분히 제거하였다. 그 후 alcohol 농도 70%→90%→95%→100% 순서로 탈수(dehydration) 과정을 거쳐 조직의 수분을 제거한 후, xylene을 투명제로 하여 파라핀 블록(paraffin block)을 제작하였다. 완성된 파라핀 블록은 5 µm 간격으로 박절(microtome cutting)하여 절편을 만든 후 탈 파라핀(deparaffinization)과 함수(hydration) 과정을 거친 후 H&E 용액으로 염색을 실시하였다. 염색된 슬라이드는 지방조직의 크기 분석을 위해 광학 현미경 하(×400)에서 관찰하였다.

### 7. 서혜부 지방의 지방분해효소 측정

지방분해효소인 hormone-sensitive lipase (HSL), adipose triglyceride lipase (ATGL)의 발현을 분석하기 위하여 마우스 서혜부 지방조직으로부터 단백질을 추출하여 Western blot을 실시하였다. 먼저 protease inhibitors cocktail이 포함된 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid) 700 µl에 서혜부 지방 50 mg을 넣어 분쇄한 후 얻어진 단백질의 양을 Bradford 시약을 사용하여 정량하였다. 정량된 단백질(30 µg)은 SDS 12%-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 통해 단백질을 분리 후 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. Membrane은 5% bovine serum albumin (in Tris-buffered Saline with Tween 20 [TBS-T])을 이용하여 blocking시키고 TBS-T로 15분간 3번 세척하였다. 1차 항체인 anti-mouse β-actin, anti-HSL, anti-ATGL (in TBS-T, 1:1,000)을 처리하여 4°C에서 overnight binding시켰다. 세척 후 HRP가 붙어있는 goat-anti-mouse 2차 항체를 TBS-T에 희석하여 실온에서 1시간 동안 처리한 후 enhanced chemiluminescence assay kit를 이용하여 밴드를 측정하였다. β-actin은 loading control로 사용되었다.

### 8. 3T3-L1 전구지방세포 배양 및 분화 유도

3T3-L1 지방전구세포(mouse embryonic fibroblast cell line)를 ATCC (American type culture collection, Manassas,

VA, USA)에서 구입하여 Dulbecco's modified Eagle's medium (WelGene Biopharmaceuticals, Daegu, Korea)에 10% bovine calf serum (WelGene Biopharmaceuticals), antibiotics (penicillin/streptomycin 100 units/ml; Bioshop, Burlington, ON, Canada)가 포함된 배양액으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 배양하였다. 세포는 6-well plate에 5×10<sup>4</sup>/2 ml로 seeding한 후 confluent 상태까지 배양하고, 이틀간 방치하여 100% confluent 상태로 만들었다(day 0). 지방 세포 분화를 위해 0.5 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.1 µM dexamethasone, 10 µg/ml insulin이 포함된 분화 배지(MDI)로 교환하여 3일간 배양하였으며(day 1~3), 그 후 2일마다 10 µg/ml insulin이 포함된 배지로 교환하면서 지방분화의 정도를 확인하였다(day 4~10). 10일간 분화 유도 후, EFE를 0.1, 1, 10 µg/mL 농도로 24시간 동안 처리하였다(day 11).

### 9. 3T3-L1 지방전구세포의 생존을 평가

EFE의 독성 평가를 위하여, 3T3-L1 지방전구세포에서 3-[4,5-dimethyl thiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 수행하였다. 3T3-L1 지방전구세포 (1×10<sup>4</sup> cell/96 well)에 EFE 0.1, 1, 10 µg/ml 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액을 제거 후 MTT reagent (50 µl, 2 mg/ml)를 첨가하고 빛에 의한 MTT 환원을 최소화하기 위해서 호일로 빛을 차단하여 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후, MTT reagent를 제거하고 dimethyl sulfoxide 100 µl를 첨가하여 30분간 용해시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 정도는 시료를 처리하지 않은 대조군(CON)과 EFE 투여군의 비율로 계산하였다.

### 10. 분화된 3T3-L1 세포의 지방구(lipid drop) 측정

EFE가 분화된 3T3-L1 지방 세포에서 지방축적에 미치는 영향을 측정하기 위해 Oil Red O 염색을 실시하였다. EFE 처리가 완료된 3T3-L1 지방세포(day 11)를 1× phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 후 4% formalin으로 1시간 동안 고정하고, 60% isopropanol을 이용하여 세척한 다음 Oil Red O working solution을 처리하여 실온에서 1시간 동안 염색하였다. 염색 후 Oil Red O solution을 제거하고 증류수로 3회 세척한 후 완전히 건조시켜 광학

현미경 이용하여 관찰하였다( $\times 100$ ). 정량적 분석을 위하여 100% isopropanol을 이용하여 지방구를 용출한 후 96-well plate에 200  $\mu$ l씩 옮겨서 ELISA reader에서 550 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다.

### 11. 분화된 3T3-L1 세포의 지방분해효소 측정

분화된 3T3-L1에서의 지방분해효소(HSL, ATGL) 분비 수준을 확인하기 위해 EFE 처리가 완료된(day 11) 3T3-L1 세포를 1 $\times$  PBS로 세척 후, protease inhibitor cocktail을 포함하는 RIPA buffer로 균질화하였다. 얻어진 단백질은 서해부 지방부위 단백질 발현 분석 방법과 동일하게 Western blot을 실시하였다.

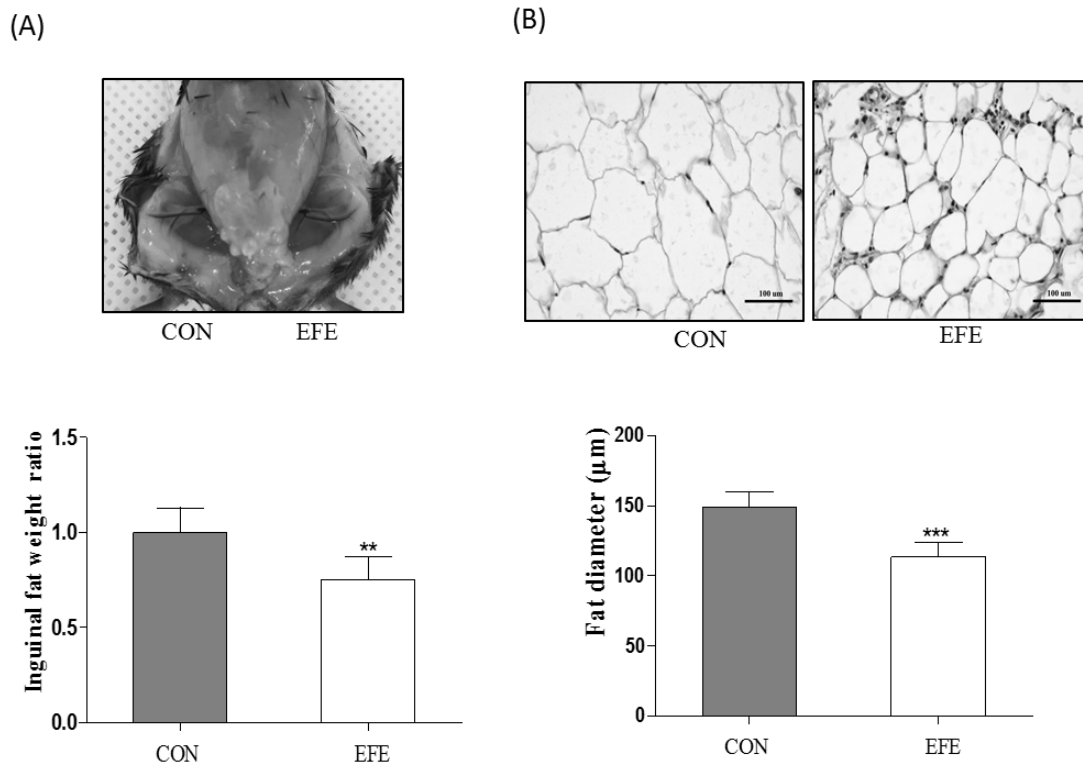
### 12. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균 $\pm$ 표준오차(mean $\pm$  standard error) 값으로 표시하였다. 통계적 분석은 ANOVA를 이용하여 Dunnett's test로 대조군(CON)과 실험군(EFE) 간의 차이를 분석하였으며, P값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. EFE 국소처리가 지방조직 무게 및 지방세포 크기에 미치는 영향

고지방 식이를 섭취한 마우스에서 EFE가 투여된 왼쪽 서해부 부위는 대조군(CON)에 비해 서해부 지방조직이 감소된 것을 육안으로 확인되었다(Fig. 2A). 지방 무게는 대조군은  $1.0\pm 0.1$ , EFE 처리군은  $0.7\pm 0.1$ 로 EFE 처리에 의해 약 30% 정도의 지방무게 감소를 나타내었다(Fig. 2A;  $P < 0.01$ ). 또한 EFE의 지방세포 크기에 미치는 영향을 조직학적으로 평가한 결과, 생리식염수를 처리한 대조군(CON)의 서해부 지방 세포( $149.1\pm 10.8 \mu\text{m}$ )에 비해, EFE를 처리한 부분의 지방 세포 크기( $113.6\pm 10.0 \mu\text{m}$ )가 약 28% 정도 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다( $P$



**Fig. 2.** Effect of EFE local injection on the weight and fat diameter of inguinal fat tissues. (A) Morphological changes of inguinal fat pad (upper panel) and relative weight ratio (lower panel), (B) Histological changes of inguinal fat pad indicated by hematoxylin and eosin staining (upper panel) and relative fat diameter ratio (lower panel). Magnification is  $\times 100$ . CON: control, EFE: *Eriobotrya folium* extract. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , versus the CON group.

<0.001; Fig. 2B).

## 2. EFE 국소처리가 지방분해효소 발현에 미치는 영향

EFE 국소처리가 지방분해효소인 HSL과 ATGL의 발현에 미치는 영향을 Western blot 방법으로 분석한 결과, 생리식염수를 투여한 대조군(CON)의 HSL 발현량을 1 (1.0±0.3)로 하였을 때, EFE에서 1.8±0.5로 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 3A). 또한 ATGL의 발현에서도 대조군(CON)에 비해(1.0±0.2) EFE를 처리한 지방조직에서 유의적인 증가(2.4±0.6, P<0.01)를 나타내었다(Fig. 3B).

## 3. EFE 세포독성 평가

3T3-L1 지방전구세포에서의 EFE의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. EFE를 농도별로 처리하여 세포 생존율을 측정한 결과, 대조군(100.0%±10.8%)에 비해 0.1, 1, 10 µg/ml을 처리한 군에서 각각 102.6%±2.6%, 99.7%±6.9% 및 101.0%±6.3%로 세포 생존율에 유의적인 영향을 미치지 않았다(Fig. 4). 실험 결과에 따라 EFE의 농도범위를 0.1, 1, 10 µg/ml로 설정하여 지방분해 효과를 검증하였다.

## 4. EFE 처리가 3T3-L1 지방세포의 지방구 생성에 미치는 영향

EEF 처리 시 지방구(lipid droplet)의 분해 정도를 확인

하기 위해 분화된 3T3-L1 지방세포에 EFE를 농도별(0.1, 1, 10 µg/ml)로 24시간 처리한 후 Oil Red O 용액으로 염색하였다. 10일간 분화를 유도한 3T3-L1 지방세포의 MDI 군에서는 세포질 내 지방구 형성이 증가되어 성숙 지방세포에서의 축적을 확인하였다. 반면, MDI에 의해 축적된 지방구는 EFE 10 µg/ml 처리에서 유의적으로(P<0.05) 약 20% 정도 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

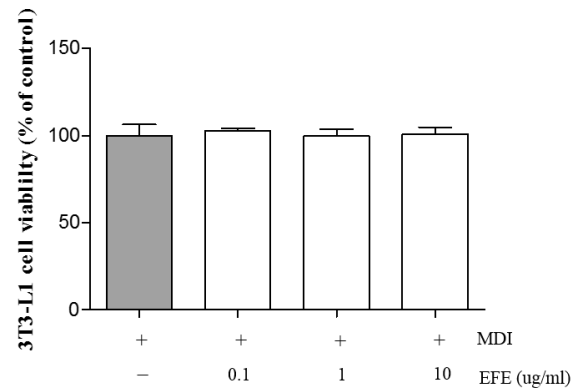


Fig. 4. Effect of EFE on the cell viability of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 preadipocytes were treated with EFE at 0.1, 1 and 10 µg/ml concentrations for 24 h. Cell viability was determined by the MTT assay. MDI: differentiation media containing 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone and insulin, EFE: *Eriobotrya folium* extract.

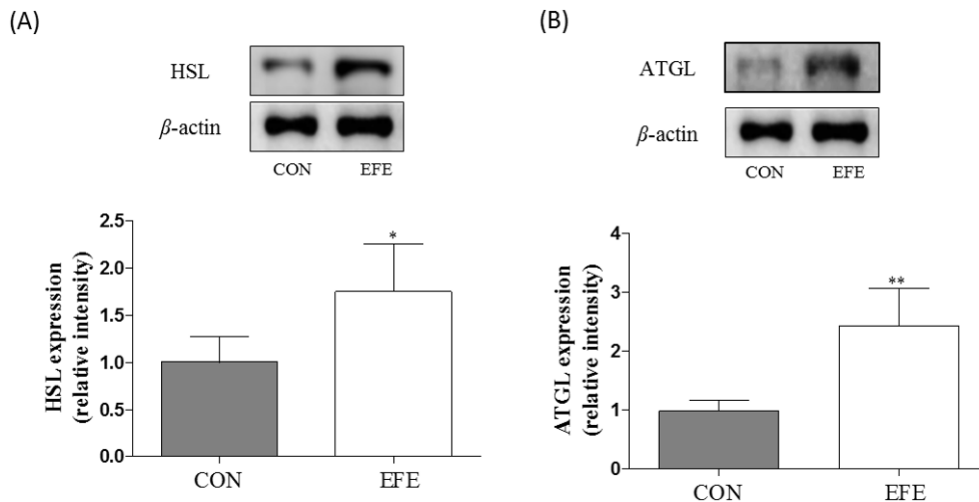
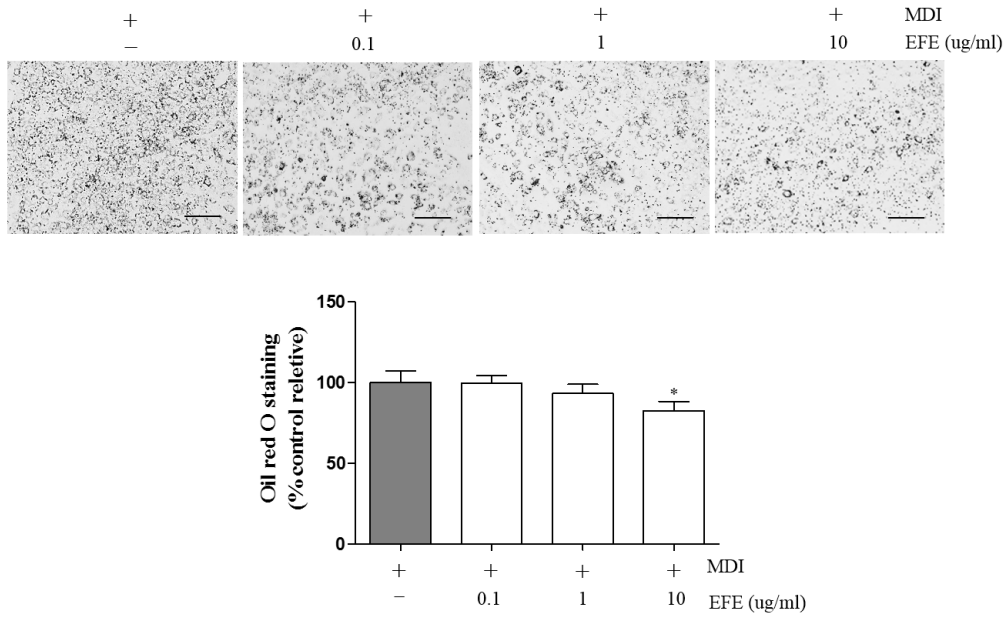
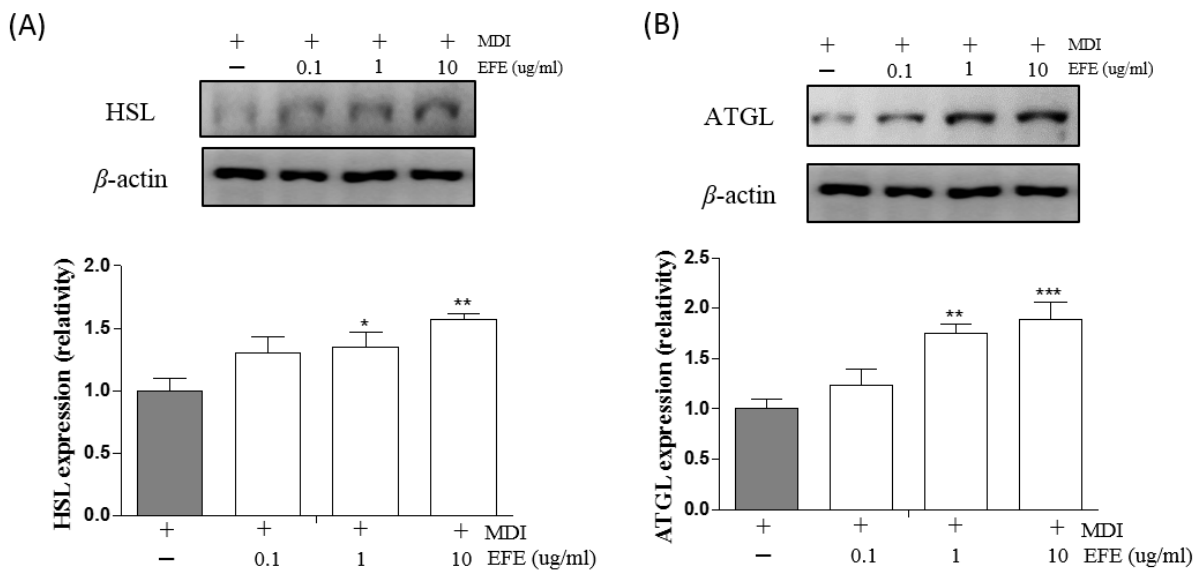


Fig. 3. Effect of EFE local injection on the expressions of HSL (A) and ATGL (B) in inguinal fat pad, HSL: hormone-sensitive lipase, ATGL: adipose triglyceride lipase, CON: control, EFE: *Eriobotrya folium* extract, \*P<0.05, \*\*P<0.01.



**Fig. 5.** Effect of EFE on the lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Cells were stained with Oil Red O to visualize lipid droplets by light microscopy, MDI: differentiation media containing 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone and insulin, EFE: *Eriobotrya folium* extract, \*P < 0.05.



**Fig. 6.** Effect of EFE on the expressions of HSL and ATGL in differentiated 3T3-L1 adipocytes. MDI: differentiation media containing 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone and insulin, EFE: *Eriobotrya folium* extract, HSL: hormone-sensitive lipase, ATGL: adipose triglyceride lipase. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

### 5. EFE 처리가 3T3-L1 지방세포에서 지방분해효소 발현에 미치는 영향

분화된 3T3-L1 지방세포에서 EFE를 처리하고 지방대사에 관여하는 지방분해효소인 HSL 및 ATGL의 발현에 미치는 영향을 Western blot으로 확인하였다. 분화를 유도한

지방세포인 MDI군에 비해 EFE 1, 10 µg/ml를 24시간 처리한 군에서는 HSL의 발현이 대조군에 비해 각각 35%, 57% 증가하였다(Fig. 6A). 또한 ATGL 단백질 발현에서도 1, 10 µg/ml 처리에서 각각 75%, 89%로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 6B).

## 고 찰

본 연구에서는 약침요법을 활용하여, 비만 동물 모델의 국소 지방 부위에 EFE를 투여하고 국소 지방 부위의 무게 변화, 지방세포의 크기, 지방분해효소 발현을 평가하였으며, 분화된 3T3-L1 지방세포에서의 지방 축적 및 지방분해에 미치는 영향을 확인하였다. 본 연구에서는 마우스에 7주 동안 고지방 식이를 통해 비만을 유도한 후 서혜부에 EFE를 주 2회씩 총 3주간 투여하였다. 본 연구에서 EFE 투여 전과 후 전체 체중의 감소는 나타나지 않았으며, 식이 섭취율에서도 대조군과 EFE 투여군 간 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이전 연구에서 EFE의 경구 투여 시 체중 감소를 보인다는 보고<sup>28)</sup>가 있으며 이는 약물 처리 경로에 따른 약물 대사율의 차이로 보여진다.

실험동물모델에서 fat pad가 형성되어 국소지방조직의 좌우 비교가 용이한 부위는 서혜부 지방조직이며, 본 연구에서도 서혜부 지방조직을 주요 관찰 대상으로 설정하였다. 본 연구에서 EFE가 투여된 서혜부 지방조직의 무게는 식염수가 투여된 대조군에 비해 약 30% 정도의 감소율을 나타내어 EFE가 지방 축적 억제에 효과가 있는 것으로 나타났다. 지방세포의 비대(hypertrophy)는 지방세포에 지방 축적이 증가되어 세포의 크기가 커지는 것으로 지방세포 크기와 체내 지방량과는 유의적인 상관관계를 보인다<sup>31)</sup>. 본 연구에서 조직학적 평가를 통해 EFE가 지방세포 크기에 미치는 영향을 분석한 결과, EFE를 처리한 부분의 서혜부 지방 세포의 크기가 생리식염수를 처리한 대조군(CON)에 비해 약 28% 감소하였음을 확인하였다. 이는 EFE가 서혜부 지방의 무게의 감소 함께 지방세포의 크기 감소를 통해 지방분해 효능이 있음을 시사한다.

지방분해는 지방세포 내의 중성지방(triglyceride)이 유리 지방산(fatty acid)과 글리세롤(glycerol)로 가수분해되는 과정으로, 각종 호르몬 및 교감신경의 작용 및 혈류에 영향을 받는다<sup>32)</sup>. 그 중 지방분해에 관여하는 지방분해효소로는 HSL, ATGL, lipoprotein lipase 등이 있다<sup>33)</sup>. 지방분해과정 중 하나인 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 매커니즘에 따르면, 증가된 cAMP가 protein kinase A를 활성화시키고, protein kinase A에 의해 perilipin과 HSL이 인산화된다<sup>34)</sup>. 인산화된 HSL은 세포 내에 존재하는 trigly-

ceride, diglyceride, monoglyceride 같은 다양한 acylester들을 가수분해하여 최종적으로 유리지방산과 글리세롤로 분해된다<sup>35)</sup>. 최근에는 ATGL이 triglyceride에 특이적으로 작용하는 지방분해효소인 것으로 밝혀져 지방분해 첫 단계인 diglyceride 생성에 작용하는 효소로 여겨지고 있다<sup>36)</sup>. 이러한 이전 연구들은 지방 세포 분화과정에서 HSL 및 ATGL 등의 지방분해효소가 중요한 지표가 될 수 있음을 증명한다. 본 연구에서는 EFE의 지방분해 효능을 분자학적 기전 분석을 통해 평가하기 위해 서혜부 지방조직으로부터 단백질을 추출하여 지방분해효소인 HSL과 ATGL의 발현량을 평가하였다. 그 결과 생리식염수를 투여한 대조군 지방조직에서의 HSL 발현량은 EFE를 투여한 지방조직에 비해 1.8배 증가하는 것으로 나타났다. 또한 ATGL의 발현량도 대조군에 비해 EFE를 처리한 지방조직에서 2.4배 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 국소 처리된 EFE가 지방분해효소인 HSL 및 ATGL의 발현을 촉진함으로써 지방분해 과정에 관여하는 것으로 판단된다.

지질생성(adipogenesis) 과정을 통한 세포형태 및 유전자 발현, 지방분해효소 등의 변화를 관찰하기 위해 일반적으로 생쥐배아로부터 유래된 지방전구세포인 3T3-L1 세포모델을 많이 사용한다<sup>37)</sup>. 비파엽에 대한 기존 연구에 따르면, 비파엽의 독성은 낮은 편이지만 심각한 기침, 후두수종, 경련 같은 부작용을 피하기 위해 용법, 용량 등의 주의가 필요하다<sup>38)</sup>. 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포에서 EFE의 처리 농도(0.1, 1, 10 µg/ml)가 세포 생존율에 유의적인 영향을 미치지 않았음을 확인하였고, 이를 바탕으로 약물 처리 농도 범위를 설정하여 지방분해 효과를 검증하였다. 지방구(lipid droplet)는 지방세포 내에서 존재하며, 중성지방의 분해와 이로 인한 글리세롤의 방출을 통해 세포내 지방 대사를 조절한다<sup>39)</sup>. 3T3-L1 지방세포를 완전히 분화시킨 후 광학 현미경으로 관찰하여 세포질 내 지방구의 성숙과 지방세포 형성이 이루어진 것을 확인할 수 있었고, 24시간 동안 EFE (10 µg/ml)를 처리하여 약 20% 정도 지방구의 형성이 감소되었음을 확인하였다. 이는 형성된 지방구에 대한 EFE의 지방분해 효과를 보여준다. 추가적으로, 분화된 3T3-L1 지방세포에서 EFE에 의한 지방분해효소인 HSL 및 ATGL의 발현 증가 효과를 확인하였으며, 이는 EFE가 3T3-L1 지방세포에서 HSL 및 ATGL 지방분해효소의 활성을 촉진



함으로써 지방축적을 억제하여 지방분해 효과를 나타냄을 시사한다.

## 결론

이상의 결과들을 통해 EFE의 고지방식이 유도 비만, 마우스 서혜부 지방조직으로의 국소 부위 침구 투여는 지방조직의 무게 및 지방세포의 크기를 감소시키고, 지방분해효소인 HSL 및 ATGL의 발현을 유의하게 증가시킴으로써 지방축적을 억제하였다. 또한 분화된 3T3-L1 지방세포에서 지방구(lipid droplet) 생성을 유도하고 HSL, ATGL의 발현을 증가시켰다. 따라서 EFE는 지방분해효소의 활성을 증가시킴으로써 국소 지방 분해에 의한 비만치료에 응용할 수 있는 소재로 활용 가능할 것으로 생각된다.

## References

- Wyatt HR. Update on treatment strategies for obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 ; 98(4) : 1299-306.
- Hamer M, Johnson W, Bell JA. Improving risk estimates for metabolically healthy obesity and mortality using a refined healthy reference group. *Eur J Endocrinol.* 2017 ; 177(2) : 169-74.
- Kim DM, Ahn CW, Nam SY. Prevalence of obesity in Korea. *Obes Rev.* 2005 ; 6(2) : 117-21.
- Ahn BC, Joung HJ. Socioeconomic cost of obesity in Korea. *J Nutr Health.* 2005 ; 38(9) : 786-92.
- Peebles R. Adolescent obesity: etiology, office evaluation, and treatment. *Adolesc Med State Art Rev.* 2008 ; 19(3) : 380-405.
- Després JP. Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat. *Crit Pathw Cardiol.* 2007 ; 6(2) : 51-9.
- Segula D. Complications of obesity in adults: a short review of the literature. *Malawi Med J.* 2014 ; 26(1): 20-4.
- Shin HY, Kwon HJ, Lee YK, Lim SC, Jung TY, Lee BH, et al. The effect of thread-embedding therapy on 9 patients with partial obesity. *J Korean Acupunct Moxib Soc.* 2011 ; 28(6) : 27-34.
- Shin SU, Choi YM, Shim WJ, Lee HC, Kim KS. Effects of high frequency therapy on localized obesity. *J Korean Orient Assoc Study Obes.* 2006 ; 6(2) : 75-83.
- Jayasinghe S, Guillot T, Bissoon L, Greenway F. Mesotherapy for local fat reduction. *Obes Rev.* 2013 ; 14(10) : 780-91.
- Li H, Lee JH, Kim SY, Yun HY, Baek KJ, Kwon NS, et al. Phosphatidylcholine induces apoptosis of 3T3-L1 adipocytes. *J Biomed Sci.* 2011 ; 18 : 91.
- Duncan DI, Palmer M. Fat reduction using phosphatidylcholine/sodium deoxycholate injections: standard of practice. *Aesthet Plast Surg.* 2008 ; 32(6) : 858-72.
- Milovic V, Teller IC, Faust D, Caspary WF, Stein J. Effects of deoxycholate on human colon cancer cells: apoptosis or proliferation. *Eur J Clin Investig.* 2002 ; 32(1) : 29-34.
- Noh YJ, Heo CY. The effect of phosphatidylcholine and deoxycholate compound injections to the localized adipose tissue: an experimental study with a murine model. *Arch Plast Surg.* 2012 ; 39(5) : 452-6.
- Kim YJ, Kim BH, Lee SY, Kim MS, Park CS, Rhee MS, et al. Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with anti-obesity. *J Korean Soc Appl Biol Bhem.* 2006 ; 49(3) : 221-6.
- Cho YS, Jang EM, Jang SM, Chun MS, Shon MY, Kim MJ, et al. Effect of grape seed water extract on lipid metabolism and erythrocyte antioxidant defense system in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2007 ; 36(12) : 1537-43.
- Lee BJ, Kim SH. The study of record relate with the notion, the diagnosis and treatment for obesity. *J Korean Orient Med Res Inst, Daejeon Univ.* 1998 ; 13(1): 533-41.
- Kim S, Jin SH, Kim TH. A study on etiological factors, symptoms of a disease, and treatments of obesity based on Dong-Yi BoGam. *J Korean Orient Med.* 1998 ; 19(2) : 126-36.
- Jang YJ, Cho JH, Song BJ. Effect of Taeyeumjowee-tang and electroacupuncture combined-therapy on obesity. *J Korean Orient Assoc Stud Obes.* 2001 ; 1(1) : 77-83.
- The textbook compilation committee of Korean herbology. *Herbology.* 3rd ed. Seoul : Young Lim Sa. 2010 : 511-2.
- Park YW. *Cellulite and aesthetic mesotherapy.* Seoul : Hanmibook. 2004 : 61-71.
- Professor of Physiology, National Oriental Medical College. *Physiology of Korean medicine.* Seoul : Jib Mun Dang. 2008 : 274-5.
- Heo J. *Donguibogam.* Seoul : bubinbooks. 1999 : 157-78.
- Kim AR, Hwang YG, Lee JJ, Jung HO, Lee MY. Effects of *Eriobotrya japonica* Lindl. (Loquat) leaf ethanol extract on cholesterol and antioxidative activity in rats fed a high-fat/high-cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2011 ; 40(5) : 673-81.
- Shih CC, Lin CH, Wu JB. *Eriobotrya japonica* improves hyperlipidemia and reverses insulin resistance in high-fat-fed mice. *Phytother Res.* 2010 ; 24(12) : 1769-80.
- Herbal Medicine Compilation Committee of College of Oriental Medicine. *Herbal medicine.* Seoul : Yong-Lim Company. 2004 : 509-10.
- Sharma BR, Oh J, Kim HA, Kim YJ, Jeong KS, Rhyu DY.

- Anti-obesity effects of the mixture of *eriobotrya japonica* and *nelumbo nucifera* in adipocytes and high-fat diet-induced obese mice. *Am J Chin Med.* 2015 ; 43(4) : 681-94.
28. Lee JS, Lee SH. The reductive effects of oriental medicine on the body fat and abdominal obesity. *J Korean Soc Stud Obes Res.* 2001 ; 1 : 33-42.
29. Tanaka K, Tamaru S, Nishizono S, Miyata Y, Tamaya K, Matsui T, et al. Hypotriacylglycerolemic and antiobesity properties of a new fermented tea product obtained by tea-rolling processing of third-crop green tea (*Camellia sinensis*) leaves and loquat (*Eriobotrya japonica*) leaves. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010 ; 74(8) : 1606-12.
30. Roh SS, Lim JS, Yim SC. The efficacy of *Eriobotryae folium* pharmacopuncture on local fat of high fat induced obesity mice. *Acupunct.* 2013 ; 30(3) : 15-25.
31. Garaulet M, Perex-Llamas F, Fuente T, Zamora S, Tebar FJ. Anthropometric, computed tomography and fat cell data in obese population: relationship with insulin, letin, tumor necrosis factor-alpha, sex hormone-binding globulin and sex hormones. *Eur J Endocrinol.* 2000 ; 143(5) : 657-66.
32. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes.* 2003 ; 27(8) : 875-88.
33. Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transactions.* 2003 ; 31(6) : 1120-4.
34. Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet protein: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res.* 2007 ; 48(12) : 2547-59.
35. Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Servetnick DA, Schultz CJ, Levin DM, et al. Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Transact.* 1995 ; 23(3) : 611-5.
36. Fushiki H, Hayakawa Y, Gomori A, Seo T, Tewari S, Ozaki S, et al. In vivo imaging of obesity-induced inflammation in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 ; 391(1) : 674-8.
37. Ruiz-Ojeda FJ, Rupérez AI, Gomez-Llorente C, Gil A, Aguilera CM. Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: a review. *Int J Mol Sci.* 2016 ; 17(7) : 1040.
38. Seo BI. A philological study on poisoning and side effects of *Eriobotryae Folium*. *J Jehan Orient Med Acad.* 2012 ; 10(1) : 65-8.
39. Ducharme NA, Bickel PE. Minireview: lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology.* 2008 ; 149(3) : 942-9.