

## 배암차즈기 에탄올 추출물의 3T3-L1 지방전구세포 분화 억제 및 지방 축적 저해 효과

김성옥<sup>1</sup> · 김미려<sup>2</sup> · 황경아<sup>3</sup> · 박노진<sup>4</sup> · 정지숙<sup>4</sup>

<sup>1</sup>경성대학교 식품응용공학부 식품영양전공, <sup>2</sup>대구한의대학교 한의과대학 약리학교실  
<sup>3</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부, <sup>4</sup>구례군농업기술센터 구례야생화연구소

### Inhibition of Differentiation and Anti-Adipogenic Effect of the *Salvia plebeia* R. Br. Ethanol Extract in Murine Adipocytes, 3T3-L1 Cells

Sung-Ok Kim<sup>1</sup>, Mi-Ryeo Kim<sup>2</sup>, Kyung-A Hwang<sup>3</sup>, No-Jin Park<sup>4</sup>, and Ji-Suk Jeong<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science & Biotechnology (Nutrition), Kyungsung University

<sup>2</sup>Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Hanny University

<sup>3</sup>Department of Agrofood Resources, National Academy of Agricultural Sciences,  
Rural Development Administration

<sup>4</sup>Wild Flower Institute of Gurye-gun Agricultural Center

**ABSTRACT** *Salvia plebeia* R. Br. (Lamiaceae) has been used in folk medicines in Asian countries, including Korea and China, to treat inflammatory diseases. The focus of our research was on the anti-adipogenic activity of ethanol extract from *Salvia plebeia* R. Br. (SPE) in 3T3-L1 adipocytes. This study investigated inhibition of differentiation and lipogenesis upon SPE treatment in 3T3-L1 cells. The results reveal that SPE at non-cytotoxic concentration significantly suppressed triglyceride accumulation and reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein-alpha, and sterol regulatory element-binding protein as adipogenic transcription factors in 3T3-L1 adipocytes compared to non-treated control cells. Inducible phosphorylation of AMP-activated protein kinase, acetyl CoA carboxylase, and hormone-sensitive lipase as well as carnitine palmitoyltransferase-1 mRNA expression increased upon SPE treatment, which suppressed expression of fatty acid synthase. In conclusion, these results demonstrate that SPE can inhibit expression of adipogenic genes in 3T3-L1 adipocytes. Our study suggests that SPE has potential anti-obesity effects and is a novel therapeutic functional agent with anti-adipogenic activity via reduction of lipogenesis.

**Key words:** anti-adipogenic activity, *Salvia plebeia* R. Br., adipocytes, inhibition differentiation, lipogenesis

## 서 론

에너지 소비량보다 영양소를 과다 섭취할 경우 에너지 불균형에 의해 비만이 유발되며, 최근 서구화된 식습관과 영양분의 과잉 섭취로 인해 비만 인구가 증가하고 있다(1). 세계보건기구(World Health Organization, WHO) 발표에 의하면 비만 유병률이 1980년에 비해 2008년 전 세계적으로 거의 두 배 증가하였다(2). 생활 수준의 향상에 따라 식이섭취 패턴이 총 지방 섭취량에서 동물성 지방으로부터 섭취하는 에너지 비율이 증가하면서 체질량지수(body mass index, BMI)가 25(kg/m<sup>2</sup>) 이상인 비만인구가 꾸준히 증가하고 있으며, 이로 인한 각종 생활습관병이 국민의 건강을 위

협하는 문제가 되고 있다. 비만은 체내에 지방조직이 과다하게 축적된 상태를 의미하는 것으로 혈장으로부터 지방세포로 유입된 지방산과 포도당이 에스테르화하여 주로 중성지방의 형태로 축적되며, 단순히 체중이 증가하는 것 이외에 당뇨, 고혈압, 지방간, 고콜레스테롤혈증, 심혈관 질환, 호흡기 질환, 종양, 불임, 우울증 및 사회 부적응 등을 유발하여 이차적으로 심각한 건강 장애를 초래할 수 있으므로 비만을 예방, 개선 또는 치료하는 것이 신체를 건강하게 유지하는데 중요하다고 할 수 있다(3).

본 연구에 사용한 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)는 꿀풀과(Labiatae)의 두해살이풀로 잎의 모양이 곰보 같다고 하여 곰보배추, 뱀비늘처럼 생겼다고 뱀배추 등으로 불린다. 한방에서는 향기로운 가지가 달린 풀이라 하여 여지초(荔枝草)라고도 하며, 설건초, 나인초, 수양이, 과동청이라고도 한다(4). 배암차즈기는 쓴맛과 떼은맛이 강하고 매운맛이 나는 특징이 있으며, 민간에서는 주로 기침, 천식, 염증 등에 효과

Received 11 January 2017; Accepted 30 March 2017

Corresponding author: Ji-Suk Jeong, Gurye Wild Flower Institute of Gurye-gun Agricultural Center, Jeonnam 57660, Korea  
E-mail: herojisuk@hanmail.net, Phone: +82-61-780-2103

가 있는 것으로 알려져 있다. 한의학적으로 성미가 고신, 량(凉)하며, 청혈해육, 양혈산어, 이수소종 등의 효능이 있어, 감모발열, 인후종통, 폐열해수, 토혈, 뇨혈, 치창출혈, 신염 누중, 백탁, 치질, 옹종창독, 습진소양, 질타손상 등을 치료한다고 하였다(5). 배암차즈기의 주요 성분으로는 플라보노이드와 페놀성 물질, 사포닌, 강심배당체, 불포화 스테롤, 정유 등이 있으며, 종자에는 지방유를 함유하고 있다. 배암차즈기 경엽을 메탄올로 추출하여 추출액의 에틸아세테이트 분획을 <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR 등으로 구조를 분석한 결과, rosmarinic acid, luteolin 7-O-β-glucopyranoside, hispidulin 7-O-glucopyranoside 등이 동정되었다(6). 배암차즈기의 연구는 2008년도 처음 SCI 논문에서 성분 연구(7)가 발표되고 그 후 항산화 성분이 알려지면서 아토피 및 염증관련 질환 등의 연구(8-11)가 다수 발표되었으며, 최근에는 비만과 관련된 연구(12,13)가 일부 보고되고 있다.

본 연구는 배암차즈기 에탄올 추출물이 지방의 축적 억제 및 지방합성 관련 유전자의 mRNA, DNA 발현을 조절하여 비만 예방, 개선 또는 치료용 천연물을 발굴하기 위해 3T3-L1 전지방세포에서 지방세포로 성숙되는 과정에서 지방세포의 분화와 성숙단계에서 분화를 조절하는 유전자 CCAAT/enhancer-binding protein-α(C/EBPα), peroxisome proliferator-activated receptor γ(PPARγ), sterol regulatory element-binding protein(SREBP-1c)과 지방세포의 성숙단계에서 지방합성 및 억제에 관여하는 유전자 phosphorylation of AMP-activated protein kinase(pAMPK), phosphorylation of acetyl CoA carboxylase(pACC), carnitine palmitoyltransferase-1 activity(CPT-1), hormone-sensitive lipase(HSL), fatty acid synthase(FAS)의 전사유전자 발현과 단백질 발현 수준에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 배암차즈기 에탄올 추출물 제조

본 실험에 사용된 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)는 전라남도 구례군농업기술센터 친환경시험장(위도 127°26'30", 경도 35°14'25") 노지에서 재배된 것으로 3월 중순에 길이 10~20 cm의 것을 채취하여 지상부를 사용하였다. 지상부는 이물질 제거 및 수세 후 열풍건조기(SH-FDO 150, Samheung, Sejong, Korea)로 45°C에서 12시간 동안 열풍 건조 하였다. 열풍건조 한 시료는 분쇄기(SMX-400ODY, Shinil, Seoul, Korea)로 분쇄하여 -80°C deep freezer(MDF-U53V, Sanyo, Osaka, Japan)에 동결 보관하면서 추출물 제조에 사용하였다. 분쇄한 시료를 각각 20 g씩 정량하고 400 mL의 70% 에탄올로 heating mentles(WHM 12295, Daihan Scientific Co., Ltd., Wonju, Korea)을 이용하여 에탄올 추출물을 제조하였다. 추출은 70°C에서 3시간 동안 1시간씩 3회 반복 추출하여, filter paper로 여과한 후 감압

농축(H-1000VW, NVC-2100, SB-1000, Eyela, Tokyo, Japan) 하여 농축된 시료를 -80°C에서 동결건조(FDU-2100, Eyela) 하여 배암차즈기 에탄올 추출물(SPE)을 제조하였다.

### 세포 배양

3T3-L1 마우스 유래 배아섬유아세포(mouse embryo fibroblast)는 미국세포주은행(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 먼저 10% bovine calf serum(BCS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, WELGENE Inc., Daegu, Korea)으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다(day 0). 8일 동안 배양한 다음에 전지방세포(preadipocyte)를 분화유도 배양액인 10% fetal bovine serum(FBS, Sigma-Aldrich Co.)을 함유한 DMEM 배지(2 μg/mL insulin, 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 2 μM dexamethasone 첨가)로 옮겨 SPE를 처리하여 48시간 배양하였다. 이를 후 30 μg SPE/2 μg 인슐린/mL 10% FBS·DMEM 배지에서 48시간 더 배양한 다음에 10% FBS·DMEM 배지에서 96시간 동안 배양하여 성숙한 지방세포(adipocytes)에서 RNA와 단백질을 분리하여 유전자의 발현 변화를 측정하였다.

### 세포생존을 측정

3T3-L1 세포를 96-well plate에 2×10<sup>5</sup> cells/mL로 분주하여 안정화한 후 SPE를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 다음 배지를 제거하고 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) 시약을 0.5 mg/mL 농도로 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 2시간 반응시킨 후 배지는 제거하고 DMSO로 불용성 결정을 용해시킨 다음 ELISA reader(TECAN Austria GmbH, Grödig, Austria)로 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### Oil Red O 염색

세포 분화 중 30 μg/mL SPE로 처리된 세포의 배지를 제거하고 D-PBS로 세포를 세척한 후, Cacodylate buffer(pH 7.4)로 2시간 고정된 다음 Oil Red O(Sigma-Aldrich Co.)로 염색하였다. 세포 염색이 끝난 후 40% isopropyl alcohol(2-propanol, 67-63-0)로 3번 세척한 다음 건조하여 세포 내 염색된 지방구의 크기를 광학현미경(Motic AE 31, Viking Way Richmond, British Columbia, Canada)으로 관찰하였으며, 염색된 지방세포의 지방 함량을 측정하기 위하여 100% isopropyl alcohol로 지방을 추출하여 분광광도계(Lambda 45, Perkin Elmer UV/VIS, Shelton, CT, USA)로 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### RNA 분리 및 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)

SPE 30 μg/mL 농도로 처리된 3T3-L1 분화세포를 D-PBS(DPBS, SH30028.03)로 세척한 후 mRNA 양을 측정하기 위해 RNeasy(Qiagen Sciences Inc., Gaithers-

**Table 1.** Oligonucleotides sequence used in PCR

Genes <sup>1)</sup>	Sequence (5'→3')
AMPK	(F) 5'-CCA GGT CAT CAG TAC ACC AT-3' (R) 5'-CTG CCA AAG GAT CCT GGT GA-3'
ACC	(F) 5'-GGACCACTGCATGGAATGTAA-3' (R) 5'-TGAGTGACTGCCGAAACATCTC-3'
SREBP1c	(F) 5'-ATCCGCTTCTTACAGCACAG-3' (R) 5'-CCAATTAGAGCCATCTCTGC-3'
C/EBPα	(F) 5'-GCA ACG CCG CCT TTG GCT TT-3' (R) 5'-AGT GCG CGA TCT GGA ACT GC-3'
PPARγ	(F) 5'-ATT CTG GCC CAC CAA CTT CGG-3' (R) 5'-TGG AAG CCT GAT GCT TTA TCC CCA-3'
CPT-1	(F) 5'-CTCAGTGGGAGCGACTCTTCA-3' (R) 5'-GGCCTCTGTGGTACACGACAA-3'
FAS	(F) 5'-CCCTGAAATCCCAGCACTTC-3' (R) 5'-GGCATGGCTGCTGTAGGGGT-3'
HSL	(F) 5'-GGTGACACTCGCAGAAGACAATA-3' (R) 5'-GCCGCCGTGCTGTCTCT-3'
GAPDH	(F) 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3' (R) 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'

<sup>1)</sup>AMP-activated protein kinase (AMPK), acetyl CoA carboxylase (ACC), sterol regulatory element binding protein (SREBP-1c), CCAAT/enhancer-binding protein-alpha (C/EBPα), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ), carnitine palmitoyl-transferase-1 activity (CPT-1), fatty acid synthase (FAS), and hormone sensitivity lipase (HSL).

burg, MD, USA) 시약으로 총 RNA를 추출하고 정량하여 SuperScript™ First-Strand Synthesis system(Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA)을 이용하여 2 µg RNA로 역전사(reverse transcription, RT)를 수행하였다. 합성된 RT product(template cDNA)에 2.5 mM dNTP, 10× buffer, DEPC water, premixed primer(Geno-Tech, Daejeon, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 Mastercycler gradient(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 PCR 방법으로 증폭하였다. 사용한 primer의 서열은 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 94°C에서 1분간 1 cycle 반응 후 94°C 45초, 58°C 45초간, 72°C 1분간 40회 반복 반응시켰으며, 72°C에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료하여 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide(Et-Br, Sigma-Aldrich Co.)로 염색한 후, Gel Doc(Vilber Lourmet, Marne-la-Vallée Cedex, France)을 이용하여 DNA band를 확인하였다. mRNA 발현량은 L Process(Version 2.01, Fujifilm, Stamford, CT, USA)와 Multi Gaugesoftware(Version 2.01, Fujifilm)를 이용하여 정량하였다.

**Western blots을 이용한 단백질 발현 분석**

SPE 처리 3T3-L1 세포에서 단백질을 분리하여 지방세포 분화 및 지방 생성 관련 단백질의 발현 변화를 western blot으로 분석하기 위해 시료처리가 끝난 배양세포에 차가운 단백질 lysis RIPA buffer를 첨가하여 균질화시켜 4°C에서 30분간 반응시킨 후 원심분리 하여 그 상층액의 단백질

농도를 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 정량하여 단백질 시료를 만든 다음, 8~10% SDS-PAGE를 분리한 후 PVDF membrane으로 transfer시켰다. Membrane을 상온에서 5%(w/v) nonfat dry milk를 함유한 TBS-T(0.1% Tween 20 in TBS)에서 1시간 incubation 하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 TBS-T로 15분 세척하였다. 준비된 막에 1차 대상 단백질[pAMPK, pACC, SREBP-1c, C/EBPα, PPARγ, CPT-1, FAS, HSL(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Table 2]의 1차 항체와 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체로 각각 처리한 다음 membrane 수세 후 ECL(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA) detection 시약으로 각각 단백질 발현량은 L Process(Version 2.01, Fujifilm)와 Multi Gauge software(Version 2.01, Fujifilm)를 이용하여 정량 분석하였다. 이때 양성대조물질로 라스베라톨(Sigma-Aldrich Co.)

**Table 2.** List of antibodies used in western blot

Primary antibody	Antibody information	Dilution
pAMPK	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000
pACC	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000
SREBPc1	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000
CPT-1	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000
C/EBPα	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000
PPAR-γ	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000
FAS	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000
HSL	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000
β-Actin	Santa Cruz Biotechnology	1:20,000

을 같은 조건으로 처리하여 비교하였다.

### 통계처리

실험 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, 통계적 유의성은 GraphPad Prism 5 program(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)의 Student's t-test를 이용하여  $P$  값이 0.05 미만( $P < 0.05$ )인 경우에 유의한 것으로 인정하였으며, 대조군과의 통계학적 유의성(\*)을 각각 표기하였다. 본 실험은 독립적으로 3번 이상 실시하였다.

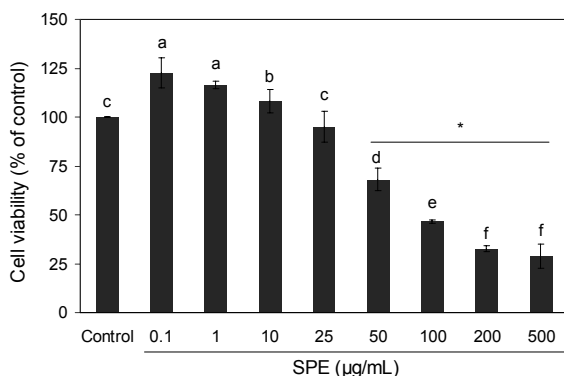
## 결과 및 고찰

### 배암차즈기 에탄올 추출물의 추출 수율

SPE는 19.5%의 수율을 나타내었다(data not shown). 본 연구팀의 선행연구(14)에 의하면 배암차즈기 물 추출물의 수율 22.5%보다 70% 에탄올 추출물의 수율이 낮았다. Choi 등(12)은 30, 50, 70, 95% 주정용매로 추출한 경엽추출물이 16.5~18.6%, 전초추출물은 19.5~23.9%의 수율을 나타내었으며, 주정 함유량에 따른 수율 차이는 보이지 않았다. Park 등(15)의 연구에 의하면 배암차즈기는 수분 80.15%, 조지방 8.89%, 조회분 1.24%, 조단백 8.03%로 다른 일채소보다 높은 조지방, 조단백 함량을 나타내고 있으며, 클로로필 a는 11.61%, 클로로필 b는 5.28%로 총 클로로필 함량이 16.88%로 상당히 높은 편이었다.

### 세포독성

배암차즈기 에탄올 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 24시간 동안 SPE를 각각 농도별(0.1, 1, 10, 25, 50, 100, 200, 500  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리한 후 MTT assay를 실시하여 세포생존도 변화를 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 대조군(Control)보다 SPE 처리 농도에 의존적으로 지방세



**Fig. 1.** Effect of the *Salvia plebeia* R. Br. ethanol extract (SPE) on viability of 3T3-L1 cells. MTT assay. Results were expressed as the mean±SD of three independent experiments. Different letters (a-f) above the bars indicate significant differences at  $P < 0.05$ . Student's t-test was performed using GraphPad Prism 5 program. \* $P < 0.05$ , control vs. SPE.

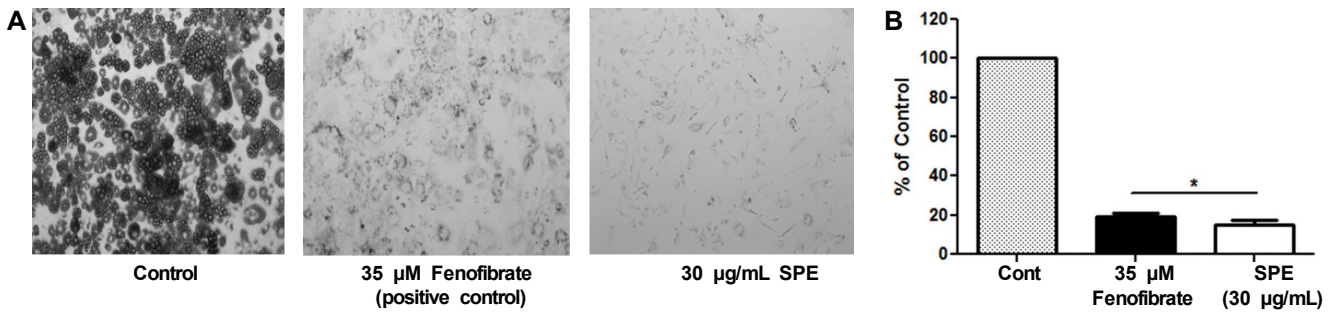
포의 생존율이 감소하였으며, 50  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서는 통계적으로 유의한 세포독성이 나타나는 것을 확인하였다. 따라서 세포생존율 91%로 세포독성을 유발하지 않는 농도인 30  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 이후 실험을 수행하였다. Jeong 등(16)은 배암차즈기 물 추출물을 대식세포 RAW264.7에 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하여 25  $\mu\text{g/mL}$  이상 농도에서 농도 의존적으로 생존도가 억제된 것으로 보고하여 비슷한 수준이었으나, Jeong 등(17)은 배암차즈기 물 추출물이 대식세포 RAW264.7에 50, 100, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 모든 농도에서 100% 이상의 생존율을 보여 RAW264.7 세포에서 독성을 나타내지 않는 것으로 보고하였다. 이때 Jeong 등(16)은 100°C에서 3시간, Jeong 등(17)은 100°C에서 12시간을 추출한 추출물을 사용하였다. Choi 등(12)은 30, 50, 70, 95% 주정으로 상온에서 24시간 동안 침지 추출한 경엽지상부와 전초 추출물을 비만세포 3T3-L1에 처리한 결과, 경엽 95% 주정 추출물은 세포독성을 나타내었고,  $\text{IC}_{50}$  농도는 149.1  $\mu\text{g/mL}$ 였다. 경엽 30, 50, 70%와 전초의 모든 추출물 200  $\mu\text{g/mL}$  처리 농도에서 세포독성을 나타내지 않는 것으로 보고되어, 추출부위와 추출온도, 추출시간 등에 따라 세포독성을 나타내는 추출물의 농도가 달라지는 것을 확인할 수 있었다.

### 중성지방 축적 억제 효과

비대지방세포로 유도된 3T3-L1에 SPE가 지방 축적에 미치는 효과를 Oil Red O 용액으로 염색하여 지방세포의 염색 정도로 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다. Oil Red O 염색은 지방 세포 내 축적된 지방구의 중성지방을 붉은색으로 염색하여 세포의 붉은색 정도를 통해 분화 정도를 시각화할 수 있다. 현미경을 통한 관찰을 통해 대조군의 세포에 비해서 SPE 처리군에서 30%로 유의적으로 세포 분화 억제와 지방 축적 감소 효과를 확인할 수 있으며, 양성대조군인 35  $\mu\text{M}$  fenofibrate 처리세포 35%와도 비슷한 수준을 나타내었다. Isopropyl alcohol로 염색된 지방구의 중성지방량 측정 결과에서도 대조군에 비해 SPE 처리군에서 지방축적 감소가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 따라서 SPE는 지방세포의 분화 억제와 지방세포의 중성지방 축적을 감소시키는 효과가 뛰어남을 알 수 있었다. 구절초 메탄올 추출물(18)을 50~500  $\mu\text{g/mL}$ 의 시료 처리 범위에서 농도 의존적으로 지방세포 형성을 감소하였으며, 300, 400, 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 처리군에서 각각 35, 61, 68%의 억제능을, 비타민나무 잎(19)은 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  처리군이 각각 20.76, 45.29, 82.25%로 중성지방 축적을 억제하는 것으로 나타나 SPE가 구절초 메탄올 추출물과 비타민나무 잎보다 지방 생성 억제능이 높은 것을 확인할 수 있었다.

### 배암차즈기 추출물이 지방세포의 전사유전자 발현 및 단백질 발현에 미치는 영향

체내 지방 축적은 조직 내 지방세포의 비대(hypertro-

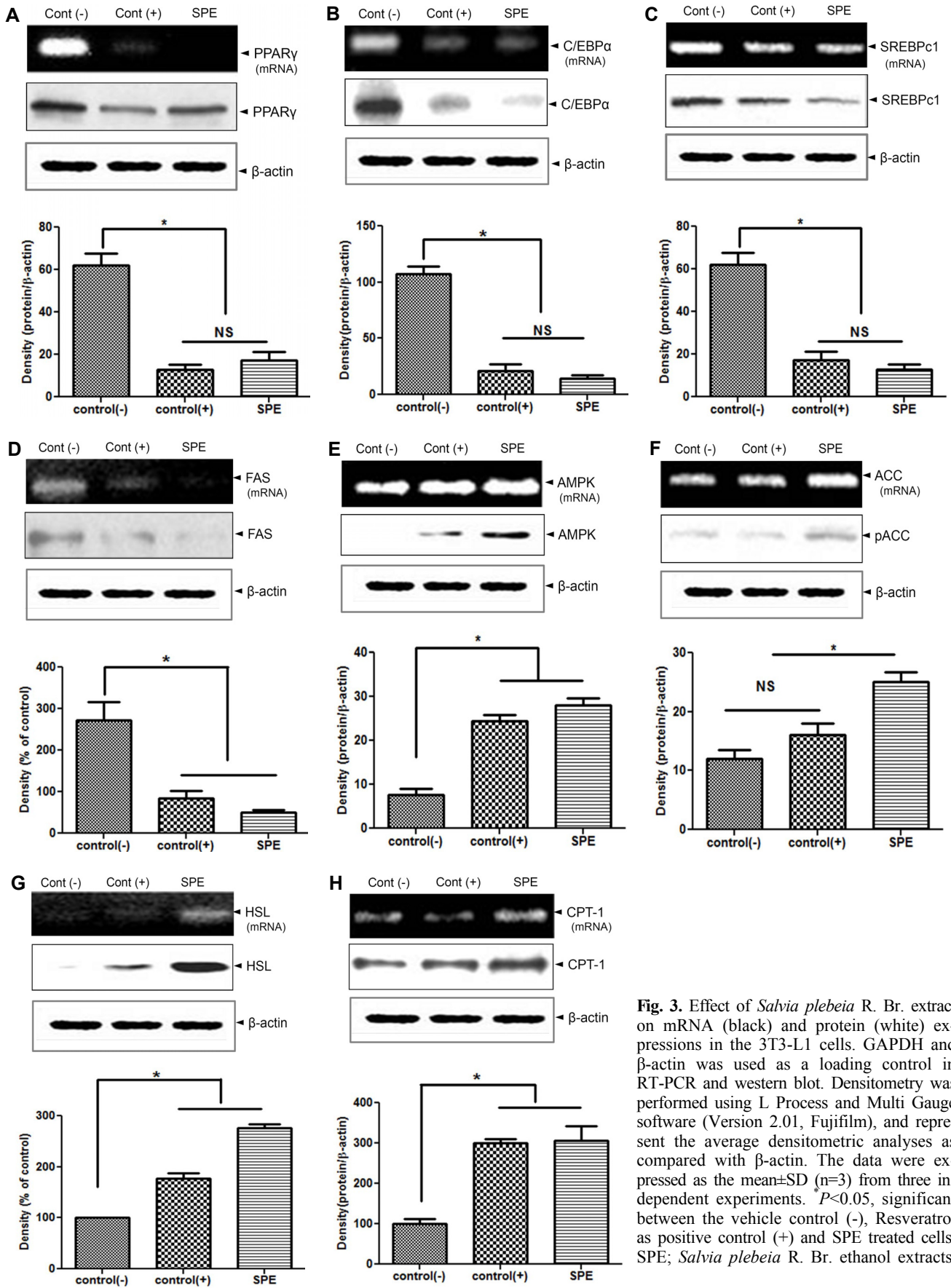


**Fig. 2.** Effect of SPE (*Salvia plebeia* R. Br. ethanol extract) on Oil Red O staining and triglyceride contents in differentiated 3T3-L1 adipocytes. A, captured with a microscope; B, quantified by the lipid accumulation using spectrophotometer. Results were expressed as the mean±SD of three independent experiments. Student's t-test was performed using GraphPad Prism 5 program. \* $P < 0.05$ , control vs. SPE. Fenofibrate was a positive control.

phy)와 과형성(hyperplasia)으로 진행되며, 지방세포 과형성은 지방세포(preadipocytes)의 활발한 증식과 활성화된 지방세포 분화 과정으로 유도되기 때문에 지방세포의 분화(adipogenesis)는 지방세포의 과형성뿐만 아니라 분화된 세포 내의 활성화된 지방질 생합성(lipogenesis) 작용에 의하여 생성된 지방구 축적이 유도된다(20). 지방세포의 과형성과 지방전구세포의 증식과 분화에 의해 조절되며, 지방세포의 비대는 지방의 합성과 지방분해의 균형에 의해 조절된다(21). 비대지방세포로 유도된 3T3-L1 세포에서 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , SREBPc1, ACC, AMPK, CPT-1, HSL 및 FAS의 전사유전자 발현 및 단백질 발현에 미치는 SPE의 효과를 조사한 결과, Fig. 3과 같다. 지방세포에서 초기 지방세포 분화에 중요한 역할을 하는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 는 adipogenesis 과정을 조절하는 전사인자로서 두 인자의 발현은 adipogenic gene의 발현을 조절함으로써 지방조직에서 지방산 합성을 증가시키고 중성지방을 생산하므로 adipogenesis 조절에 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현을 억제한다(22). 또한, 인슐린 신호전달과 관련된 유전자의 발현과 성숙한 지방세포에서 포도당과 지질대사를 조절하여 지방세포의 분화를 더욱 촉진시켜 분화과정을 완성시킨다(23,24). 따라서 지방세포 분화 후기에 발현되며 여러 호르몬인 adipocytokine과 adipogenic protein 발현에 중요한 역할을 하는 전사조절 인자이다. SPE의 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  유전자 전사량과 단백질 발현 억제활성을 확인한 결과, SPE 처리 세포에서 대조세포에 비해 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  발현이 유의적으로 감소를 나타내어 SPE가 지방세포에서 지방분화 및 지방축적을 억제하는 것으로 보인다. 또한, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 의 타겟 유전자는 SREBPc1, FAS의 활성을 유도하여 지방합성을 한다(25). 따라서 SPE 처리 시 SREBPc1, FAS의 유의적 감소는 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  발현이 유의적으로 감소로 기인한 것을 알 수 있다. 반대로 호르몬자극지방분해효소(HSL) 유전자 발현과 활성은 SPE의 처리 세포에서 유의적 증가를 보여 지방분해 효과를 나타내었다. AMPK와 ACC 유전자 전사량과 인산화 단백질 활성은 대조세포와 비교해서 유의적으로 증가를 나타내었다. AMPK는 세포 내 항상성 유지

역할을 하는 효소(26)로 이것의 활성화는 포도당 및 지방산 산화 증가와 간에서 지방합성과 포도당 신생억제, 췌장에서 인슐린 분비조절을 하는 중요한 매개인자로 작용한다. ACC는 지방합성과 콜레스테롤 합성을 조절하는 효소단백질인 ACC의 인산화 증가로 효소활성이 불활성화하므로 지방세포에서 지방합성의 억제를 나타낸다(27). ACC 인산화 증가는 지방산 베타산화를 활성화시키는 CPT-1의 발현을 증가시키므로 포화지방산의 미토콘드리아 안으로 유입이 증가하고 일련의 지방산 산화가 일어나므로 지방축적은 감소하고 인슐린 민감도는 증가한다(28,29). 따라서 SPE 처리 시 CPT-1의 유의적 증가는 SPE가 지방세포에서의 지방합성 억제효과가 있음을 알 수 있었다. 식지방 추출물 처리 시 C/EBP $\alpha$ , FABP4, FAS 등 모든 유전자에서 농도 의존적으로 발현이 감소하였으며, PPAR $\gamma$ 는 250 µg/mL 농도에서부터 유의적으로 유전자 발현의 억제 효능을 보였다(30). 이에 반해 SPE는 30 µg/mL에서 유전자 발현 억제 효능이 양성대조군 라즈베라톨과 비슷한 효능을 보여 식지방 추출물보다 낮은 농도에서 효과를 나타내었다. 비타민나무 잎 에탄올 추출물을 처리한 결과, SREBP-1c, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  및 FAS 발현을 감소시켰으며, 100 µg/mL의 농도에서 p-AMPK의 발현은 3.5배 증가하고 PPAR $\gamma$ 의 발현은 0.1배 감소하여 지방합성이 억제된다고 보고하였다(19). Yang 등(21)과 Jeong 등(19)은 quercetin 등 플라보노이드 계열의 성분이 지방세포 분화에 영향을 준 것으로 시사하였다. Jeong 등(14)에 의하면 열풍건조 배암차즈기 물 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 94.64 mg/GAE/g과 29.70 mg QUE/g 수준이었다.

이상의 결과를 종합하면 3T3-L1 지방세포에서 SPE 처리 시 지방분화 초기 전사인자인 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 의 발현을 조절하여 이들 전사인자의 타겟 유전자로 알려진 SREBPc1, FAS의 발현을 조절하여 지방세포의 분화억제와 지방합성을 억제할 뿐만 아니라 AMPK 인산화 단백질 발현 증가로 지방세포에서의 지방합성 관련 효소 단백질인 ACC 불활성을 증가시키고, 증가된 ACC 불활성화는 미토콘드리아 내 지방산 산화를 활성화하는 CPT-1을 활성화시키므로 지방



**Fig. 3.** Effect of *Salvia plebeia* R. Br. extract on mRNA (black) and protein (white) expressions in the 3T3-L1 cells. GAPDH and  $\beta$ -actin was used as a loading control in RT-PCR and western blot. Densitometry was performed using L Process and Multi Gauge software (Version 2.01, Fujifilm), and represent the average densitometric analyses as compared with  $\beta$ -actin. The data were expressed as the mean $\pm$ SD (n=3) from three independent experiments. \*P<0.05, significant between the vehicle control (-), Resveratrol as positive control (+) and SPE treated cells. SPE; *Salvia plebeia* R. Br. ethanol extracts.

축적을 억제시킬 것으로 생각된다. 현재 배암차즈기의 항비만 활성 물질에 대한 보고가 없어 추가적으로 물질규명 및 분자수준의 대사적 검정을 위해 동물실험이 필요할 것으로 본다.

요 약

본 연구는 배암차즈기 에탄올 추출물(SPE)을 유효성분으로 함유하는 지방 생성 및 축적 저해 효능을 조사하였다. 배암차즈기 에탄올 추출물은 마우스 배아 섬유아세포(mouse embryo fibroblast) 유래 지방세포인 3T3-L1에서 지방세포 분화를 억제하는 효능을 보유하고 있었으며, 지방세포 내 중성지방의 농도를 감소시키는 효능을 보유하고 있었다. 또한, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , SREBP-1c, pACC, pAMPK, CPT-1, 지방산 합성효소(FAS, fatty acid synthase) 발현 억제, 호르몬자극지방분해효소(HSL, hormone sensitivity lipase) 활성화 등 지방합성 관련인자들의 발현을 조절하는 효능을 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 SPE가 지방세포 분화 및 지방대사에 관련된 인자들의 발현을 조절함으로써 지방 생성 및 지방 축적을 저해하는 효능을 보유하기 때문에 배암차즈기를 활용한 비만 개선을 위한 소재로서의 활용이 가능할 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 산업통상자원부 지역특화기술융복합연구지원사업(R0002043)의 항염증 효능 식물탐색 후속연구로 구례군의 구례야생화연구소 운영 연구개발비에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Sim MO, Lee HI, Ham JR, Seo KI, Lee MK. 2015. Long-term supplementation of esculetin ameliorates hepatosteatosis and insulin resistance partly by activating AdipoR2-AMPK pathway in diet-induced obese mice. *J Funct Foods* 15: 160-171.
2. WHO/Europe approaches to obesity. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/obesity> (accessed Jan 2017).
3. Noh SK. 2002. Functional action of flavonoids for treatment of obesity. *Food Industry and Nutrition* 7(2): 27-29.
4. *Salvia plebeia* R. Br.. <http://www.nature.go.kr/kbi/plant/pilbk/selectPlantPilbkDtl.do?plantPilbkNo=33589> (accessed Jan 2017).
5. Jo SY, Lee U, Kim EY, Lee SJ, Her JW, Yoon TJ. 2010. A study on the anti-inflammatory and anti-allergic effect of *Salvia plebeia* R. extracts. *Korean J Pharmacogn* 41: 31-37.
6. Cho KJ, Bae SC, Kim JB, Kim SS, Kang SA, Kim MB. 2007. *Development of functional medicinal food materials and separation of physiological active substances from native plants*. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (GOVP1200723280), Sejong, Korea. p 3-146.
7. Jin XF, Lu YH, Wei DZ, Wang ZT. 2008. Chemical finger-

- print and quantitative analysis of *Salvia plebeia* R.Br. by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 48: 100-104.
8. Choi JK, Oh HM, Lee S, Kwon TK, Shin TY, Rho MC, Kim SH. 2014. *Salvia plebeia* suppresses atopic dermatitis-like skin lesions. *Am J Chin Med* 42: 967-985.
9. Wu F, Wang H, Li J, Liang J, Ma S. 2012. Homoplantaginin modulates insulin sensitivity in endothelial cells by inhibiting inflammation. *Biol Pharm Bull* 35: 1171-1177.
10. Choi JK, Oh HM, Park JH, Choi JH, Sa KH, Kang YM, Park PH, Shin TY, Rho MC, Kim SH. 2015. *Salvia plebeia* extract inhibits the inflammatory response in human rheumatoid synovial fibroblasts and a murine model of arthritis. *Phytomedicine* 22: 415-422.
11. Gao H, Liu Y, Li K, Wu T, Peng J, Jing F. 2016. Hispidulin induces mitochondrial apoptosis in acute myeloid leukemia cells by targeting extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Am J Transl Res* 8: 1115-1132.
12. Choi SI, Kwak H, Kim JY, Choi JG, Lee JH. 2015. Antiadipogenic effects of *Salvia plebeia* R. Br. extracts by extraction conditions in 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J Med Crop Sci* 23: 245-252.
13. Won HR. 2016. Effect of *Salvia plebeia* water extract on antioxidant activity and lipid composition of rats fed a high fat-high cholesterol diet. *Korean J Community Living Sci* 27: 233-243.
14. Jeong JS, Kim YJ, Choi BR, Go GB, Son BG, Gang SW, Moon SM. 2014. Antioxidant and physicochemical changes in *Salvia plebeia* R. Br. after hot-air drying and blanching. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 893-900.
15. Park SI, Kim TS, Park CG, Kang MH. 2012. Nutritional and sensory of green leafy vegetables cultivated from medicinal plant seed. *J East Asian Soc Diet Life* 22: 271-277.
16. Jeong JS, Kim YJ, Ahn EK, Shin JY, Go GB, Son BG. 2015. Antioxidative activities and qualitative characteristics of substitute tea using *Salvia plebeia* R. Br.. *Korean J Food Cook Sci* 31: 41-52.
17. Jeong H, Sung M, Kim Y, Ham H, Choi Y, Lee J. 2012. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 888-894.
18. Park JA, Jin KS, Kwon HJ, Kim BW. 2015. Antiobesity activity of *Chrysanthemum zawadskii* methanol extract. *J Life Sci* 25: 299-306.
19. Jeong HJ, Park JH, Kim MJ. 2015. Ethanol extract of *Hippophae Rhamnoides* L. leaves inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J Plant Res* 28: 582-590.
20. de Ferranti S, Mozaffarian D. 2008. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 54: 945-955.
21. Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park JH, Baile CA. 2008. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci* 82: 1032-1039.
22. Morrison RF, Farmer SR. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130: 3116S-3121S.
23. Ntambi JM, Kim YC. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130: 3122S-3126S.
24. Rangwala SM, Lazar MA. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in diabetes and metabolism. *Trends*

- Pharmacol Sci* 25: 331-336.
25. Ambati S, Yang JY, Rayalam S, Park HJ, Della-Fera MA, Baile CA. 2009. Ajoene exerts potent effects in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting adipogenesis and inducing apoptosis. *Phytother Res* 23: 513-518.
  26. Hardie DG. 2004. The AMP-activated protein kinase pathway-new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117: 5479-5487.
  27. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. 2005. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1: 15-25.
  28. Zhang BB, Zhou G, Li C. 2009. AMPK: An emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 9: 407-416.
  29. González-Barroso MM, Anedda A, Gallardo-Vara E, Redondo-Horcajo M, Rodríguez-Sánchez L, Rial E. 2012. Fatty acids revert the inhibition of respiration caused by the antidiabetic drug metformin to facilitate their mitochondrial  $\beta$ -oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1817: 1768-1775.
  30. Jung HK, Sim MO, Jang JH, Kim TM, An BK, Kim MS, Jung WS. 2016. Anti-obesity effects of *Peucedanum japonicum* Thunberg L. on 3T3-L1 cells and high-fat diet-induced obese mice. *Korean J Plant Res* 29: 1-10.