

# 천궁(川芎)의 정유 추출물이 3T3-L1 세포의 분화 및 지방 생성에 미치는 영향

최수민\* · 김소영<sup>†</sup> · 박나리\* · 김정민\* · 양두화\* · 우창훈\* · 김미려<sup>†</sup> · 안희덕\*  
대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실\*, 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실<sup>†</sup>

## Effects of Essential Oils Extracted from Cnidii Rhizoma on Differentiation and Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes

Soo-Min Choi, K.M.D.\* , So-Young Kim, M.S.<sup>†</sup> , Na-Ri Park, K.M.D.\* , Jung-Min Kim, K.M.D.\* ,  
Doo-Hwa Yang, K.M.D.\* , Chang-Hoon Woo, K.M.D.\* , Mi-Ryeo Kim, Ph.D.<sup>†</sup> , Hee-Duk An, K.M.D.\*  
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Hanny University\*,  
Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University<sup>†</sup>

이 논문은 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2018R1A2B6009036).

RECEIVED June 13, 2018  
REVISED July 4, 2018  
ACCEPTED July 5, 2018

CORRESPONDING TO  
Mi-Ryeo Kim, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136 Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu 42158, Korea

TEL (053) 770-2241  
FAX (053) 768-6340  
E-mail mrkim@dhu.ac.kr

CO-CORRESPONDING TO  
Hee-Duk An, Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136 Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu 42158, Korea

TEL (053) 770-2116  
FAX (053) 770-0566  
E-mail okee@dhu.ac.kr

**Objectives** We investigated anti-obesity effects of essential oils extracted from Cnidii Rhizoma (CR) in immature adipocytes to magnify its clinical therapeutic usage.

**Methods** Essential oil of CR was extracted with ethyl acetate or petroleum ether and through steam distillation, respectively. Oil red-O staining for monitoring its inhibition effect on adipogenesis and differentiation in murine 3T3-L1 adipocytes and 3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyletetrazolium bromide (MTT) assay for cell safety were done. Also phospho-adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (P-AMPK), AMP-activated protein kinase, phospho-acetyl-CoA carboxylase (P-ACC), acetyl-CoA carboxylase, peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) and CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ) expressions as obesity-related factors were measured by western blot analysis.

**Results** Protein expressions of P-AMPK, P-ACC and PPAR- $\alpha$  were increased in essential oils-treated adipocytes compared to those of control group, respectively. Furthermore, protein expressions of PPAR- $\gamma$  and C/EBP- $\alpha$  were decreased in essential oils-treated adipocytes compared to those of control group, respectively.

**Conclusions** These results demonstrate that essential oils of CR inhibit adipogenesis and differentiation. Also they promote the oxidation of fatty acids in adipocytes. Thus, results suggest that essential oils of CR could be used as a valuable material for anti-obesity therapeutics via control of lipid metabolism. (**J Korean Med Rehabil 2018;28(3):13-25**)

**Key words** Cnidii Rhizoma, Essential oils, Adipogenesis, 3T3-L1 cells, Obesity

## 서론»»»»

비만이란 대사 장애로 인해 지방이 체내에 과잉 축적된 상태로, 칼로리 섭취가 신체활동에 필요한 에너지보다 초과되어 일어나는 열량 불균형 현상으로 야기되며, 체내 지방이 남지는 체중의 25%, 여자는 30% 이상인 경우를 말한다<sup>1)</sup>. 또한 비만에 관한 많은 연구에서 높은 체질량지수와 사망률의 상관관계에 유의성이 있다는 것이 속속 보고되고 있다. 비만으로 인한 사망률의 증가는 2형 당뇨병, 심혈관질환, 당뇨병, 호르몬 감수성 암과 위장관 암 등에서 명확하게 나타나며, 비만은 또한 비치명적인 요통, 관절염, 불임 등의 신체적 질병과 정신·사회적 기능의 저하 등 정신적 질병의 위험성도 증가시킨다<sup>1)</sup>.

항비만 약물에 대한 연구는 전 세계적으로 다양하게 진행되고 있다. 세로토닌과 노르에피네프린의 재흡수를 억제하는 작용을 하는 sibutramine은 심혈관계 부작용으로 인하여 사용 금지되었고, 소장에서 지방분해 효소의 작용을 억제하여 지방흡수를 감소시키는 orlistat는 지방변, 복부불편감 등의 부작용이 있다. 최근에는 locaserine, bupropione-naltrexone, phentermine-topiramate가 비만 치료 약물로 사용되고 있으며, 이 중 가장 빈용 처방되는 locaserine은 sibutramine과 유사한 serotonin 활성 관련 약물로서 낮은 빈도의 두통, 오심, 현훈 등의 부작용이 보고되고 있다<sup>2)</sup>.

Cnidii Rhizoma (천궁川芎)은 미나리과(Umbelliferae)에 속한 다년생 초본인 궁궁이(*Cnidium officinale* Makino)의 근경을 건조한 것이며, 性은 溫無毒하고 味는 辛苦하다<sup>3)</sup>. 또한 천궁은 『壽世保元』<sup>4)</sup>에서 당귀, 유향 등과 함께 芳香活血藥으로 분류되어 있으며, 방향 성분은 단지脾胃에 작용하여 運化를 돕고 化濕할 뿐만 아니라 利氣, 活血, 開竅하는 작용을 한다고 기록되어 있다.

최근 천궁의 항고지혈<sup>5)</sup> 및 지방세포 분화<sup>6)</sup>에 관한 효과가 보고되고 있으나, 천궁의 방향성 정유추출물에 대한 항비만 효과를 살펴본 연구는 없다. 이에 저자는 천궁의 정유 추출물을 이용하여 3T3-L1 세포의 분화 및 지방축적에 미치는 영향을 살펴 본 연구에서 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법»»»»

### 1. 재료

#### 1) 한약재 및 시약

본 실험에 사용된 천궁(Yangyang, Korea)은 대원약업사(Daewon, Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 그리고 3T3-L1 세포 배양 및 지방구 염색에 사용된 시약 중 bovine calf serum (BCS), fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Hyclone 사(Hyclone, Logan, UT, USA) 제품을 구입하였고, penicillin, streptomycin, insulin, dexamethasone, isobutyl methylxanthine, cacodylate, glutaraldehyde, 3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyletetra zolium bromide (MTT)와 Oil red-O 용액은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 또한 FBS는 Fisher scientific (Gibco®, Pittsburg, KS, USA) 제품, dimethyl sulfoxide (DMSO), CaCl<sub>2</sub>는 덕산약품(Duksan, Ansan, Korea) 제품을 사용하였으며, formaldehyde, isopropyl alcohol은 Junsei chemical (Tokyo, Japan) 제품을 사용하였다. 그리고 세포포용해에 사용된 protease inhibitor 및 phosphatase inhibitor와 radioimmuno precipitation assay (RIPA) buffer는 Thermo scientific 사(Rockford, MI, USA)로부터 구입하였다. 또한 western blot 분석 시약인 sodium dodecyl sulfate (SDS)는 BIO-RAD (Hercules, CA, USA), peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ),  $\beta$ -actin의 1차 항체는 Santa-Cruz Biotechnology 사(Dallas, TX, USA), phospho-adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (P-AMPK), AMP-activated protein kinase (AMPK), phospho-acetyl-CoA carboxylase (P-ACC), acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 1차 항체는 Cell Signaling (Danvers, TX, USA)으로부터 구입하였으며, 2차 항체는 GeneTex (Irvine, CA, USA), electrochemiluminescence (ECL) 시약은 GE Healthcare (Amersham™, Chalfont Saint Giles, UK)로부터 구매하였다. 시료의 추출에는 일정 순도 이상의 ethyl acetate (99.5%, Duksan, Ansan, Korea) 및 petroleum ether (99%, Daejung chemicals & metals, Siheung, Korea) ethanol (95%, Daehan ethanol

life, Seoul, Korea)을 사용하였으며, 무수황산나트륨(Duksan, Ansan, Korea)은 1급 시약을 사용하였다.

## 2) 기기

정유 추출 과정에서 사용된 회전증발농축기는 Buchi (Rotavapor R-300, Flawii, Swiss) 제품을 사용하였고, 세포의 분화 및 지방구는 현미경(AE31, Motic, Xiamen, China)을 통해 관찰하고 분광광도계(Sunrise, Tecan, Grodig, Austria)를 통해 흡광도로 분석하였다. 그리고 지방대사 관련 단백질은 Lugen<sup>TM</sup> Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen SCI, Bucheon, Korea)을 통해 분석하였다.

## 3) 정유추출물의 제조

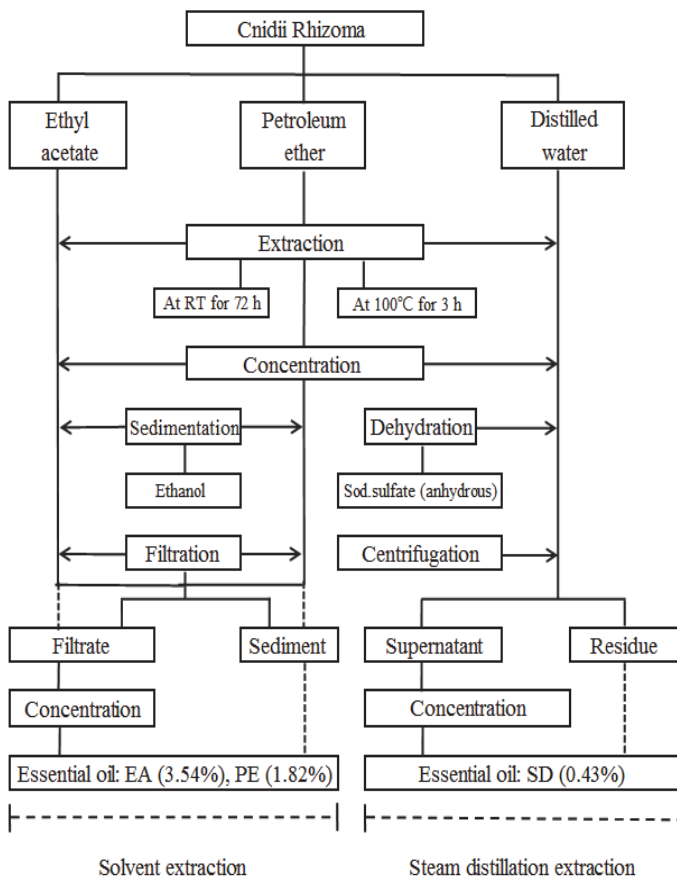
### (1) 용매추출법에 의한 추출

건조 천궁 100 g을 분쇄하여 1 L의 ethyl acetate, petroleum ether를 각각 첨가한 다음, 72시간 동안 상온 추출하고 Advantec Filter paper No. 2 (Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 이 여과액을 회전증발농

축기로 감압 농축하였다. 농축된 정유성분에 ethanol을 첨가하여 침전시키고, 여과를 통해 얻은 여과물을 진공회전농축기에서 감압농축한 후, 농축 추출물로부터 유기용매를 완전히 제거하여 정제된 정유를 얻었다. 최종 ethyl acetate 용매로부터 추출된 정유(ethyl acetate-extracted essential oil, EA)의 수율은 3.54%, petroleum ether 용매로부터 추출된 정유(petroleum ether-extracted essential oil, PE)의 수율은 1.82%였으며, 실험을 시작할 때까지 4°C 이하의 냉장실에서 보관하였다(Fig. 1).

### (2) 수증기증류법에 의한 추출

천궁 100 g에 1 L의 증류수를 첨가한 다음, 정유정량장치를 사용하여 110°C에서 3시간 가열한 후 증류액을 얻었다. 증류액을 농축시킨 다음 무수황산나트륨을 가하여 탈수시키고, 상층부에 부유하는 정유 성분을 취하여 수득한 정유(steam distillation-extracted essential oil, SD)의 수율은 0.43%였으며, 실험을 시작할 때까지 4°C 이하의 냉장실에서 보관하였다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Extraction process of essential oil from Cnidii Rhizoma. EA: ethyl acetate extracted essential oil, PE: petroleum ether-extracted essential oil, SD: steam distillation-extracted essential oil.

## 2. 방법

### 1) 세포배양

3T3-L1 세포주는 American type culture collection (ATCC, Manassas, VI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10%의 BCS, 1% penicillin streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 8일간 배양 후, confluent한 상태가 되면 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 분화를 유도하면서 시료를 처리하였다. 즉 분화가 시작한 시점(D-0)에서는 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 10 µg/mL insulin, 2 µM dexamethasone, 0.5 µM isobutyl methylxanthine이 포함된 DMEM 배지로 교환하여 배양하고, 2일 후(D-2)에 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 5 µg/mL insulin이 포함된 DMEM 배지로 다시 교체하였으며, D-5일 이후, insulin이 무첨가된 10% FBS 함유 DMEM 배지로 배양하였다(Fig. 2).

### 2) 시료의 처리

분화가 시작된 시점부터 3T3-L1 세포를 대조군(control group, CON), 양성대조군(fenofibrate, FF), 천궁의 정유 처리군(Cnidii Rhizoma, CR)으로 나눈 후, 2일마다 분화 배지 교환 시 각각의 시료를 처리하였다. 정유처리군은 다시 6군으로 구분하여 추출법을 달리한 정유 시료인 EA, PE, SD를 각각 0.01~0.2 mg/mL로 농도를 달리하여 처리하였다. 한편 실험기간 동안 CON군과 FF군에는 각각 vehicle 용액인 DMSO 40 µM, 고지혈증 치료제인 FF를 동량으로 처리하였다(Fig. 2).

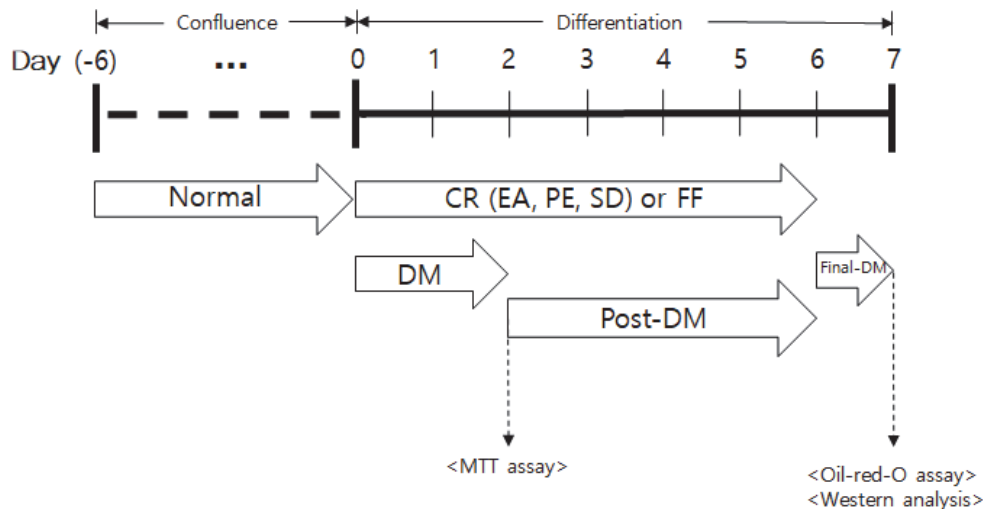
PE, SD를 각각 0.01~0.2 mg/mL로 농도를 달리하여 처리하였다. 한편 실험기간 동안 CON군과 FF군에는 각각 vehicle 용액인 DMSO 40 µM, 고지혈증 치료제인 FF를 동량으로 처리하였다(Fig. 2).

### 3) 세포생존율 측정

시료가 3T3-L1 세포독성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 96 well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/mL로 세포를 분주하여 confluent한 상태까지 배양하였다. 그 후 분화유도와 동시에 추출용매별 천궁 정유추출물을 각 농도(0.01, 0.02, 0.05, 0.1 및 0.2 mg/mL)로 처리하였다. 48시간 배양 후 MTT 용액 200 µL를 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 반응시킨 뒤 MTT 용액을 완전히 제거한 다음 DMSO를 200 µL씩 분주하여 생성된 formazan을 모두 녹인 후 분광광도계로 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

### 4) Oil red-O 염색

3T3-L1 세포의 분화 및 지방 축적에 미치는 영향을 관찰하기 위해 Oil red-O 염색을 실시하였다. 분화시킨 용매별 천궁(EA, PE, SD) 각 농도(0.01 mg/mL 및 0.02 mg/mL)를 이들에 한 번씩 배지를 교환하여 처리하였다. 6일 후 세포 배양액을 제거한 뒤 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고 pH 7.2 cacodylate buffer로



**Fig. 2.** Schedule of 3T3-L1 cell differentiation and essential oil treatment. CR: Cnidii Rhizoma, EA: ethyl acetate-extracted essential oil, PE: petroleum ether-extracted essential oil, SD: steam distillation-extracted essential oil, FF: fenofibrate, DM: differentiation medium consist of Fetal Bovine Serum-Dulbecco's Modified Eagle Medium (FBS-DMEM), isobutylmethylxanthine (IBMX), dexamethasone and insulin, Post-DM: post-differentiation medium consist of FBS-DMEM and insulin, Final-DM: final-differentiation medium consist of FBS-DMEM, MTT: 3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyletetrazolium bromide.

4°C에서 세포를 3시간 동안 고정시켰다. 고정시킨 세포에 Oil red-O solution을 3 mL씩 넣어 1시간 동안 지방구를 염색한 다음 40% isopropyl alcohol로 세척한 후 증류수 1 mL를 넣어 현미경으로 관찰하였다. 염색된 지방세포의 지방함량 측정을 위하여 건조시킨 후 100% isopropyl alcohol로 지방을 추출하여 흡광도 값이  $1 \pm 0.05$  이하로 나오도록 희석한 후 510 nm 파장에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다.

### 5) Western blot 분석

3T3-L1 전지방세포의 세포분화 및 성숙 지방세포의 지방생성에 관여하는 단백질 발현을 관찰하기 위하여 분화가 종료된 세포를 PBS로 세척하고, protease inhibitor 및 phosphatase inhibitor를 각각 첨가한 RIPA buffer 적당량을 첨가하여 세포를 용해시켰다. 그 후 세포를 수거하여 21 G needle로 분쇄시키고 13,000 rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 Bradford 법을 사용하여 단백질 정량을 하였다. 정량된 단백질의 적정량을 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 분리한 후 polyvinylidene fluoride membrane으로 전이시키고 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk 처리하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하였다. 연이어 AMPK, P-AMPK, ACC, P-ACC, PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$ ,  $\beta$ -actin의 단백질 항체를 4°C에서 각각 overnight 반응 처리하여 tris-buffered saline과 Tween 20을 혼합한 mixture of tris-buffered saline and Tween 20 (TBST)로 세척하고 각각의 단백질 항체에 알맞은 2차 항체를 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 ECL 시약을 10초간 처리하여 Chemidoc system을 이용해 western band를 검출하였다.

### 6) 통계처리

결과의 통계처리는 IBM SPSS statistics ver. 22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여 산출되었으며, 군 간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였다. 여러 군 간의 차이는 least significant difference (LSD) test로  $p < 0.05$  이상의 수준에서 사후검정을 실시하였으며,  $\text{mean} \pm \text{standard error (S.E.)}$ 로 표시하였다.

## 결과»»»»

### 1. 3T3-L1 세포의 생존율에 미치는 영향

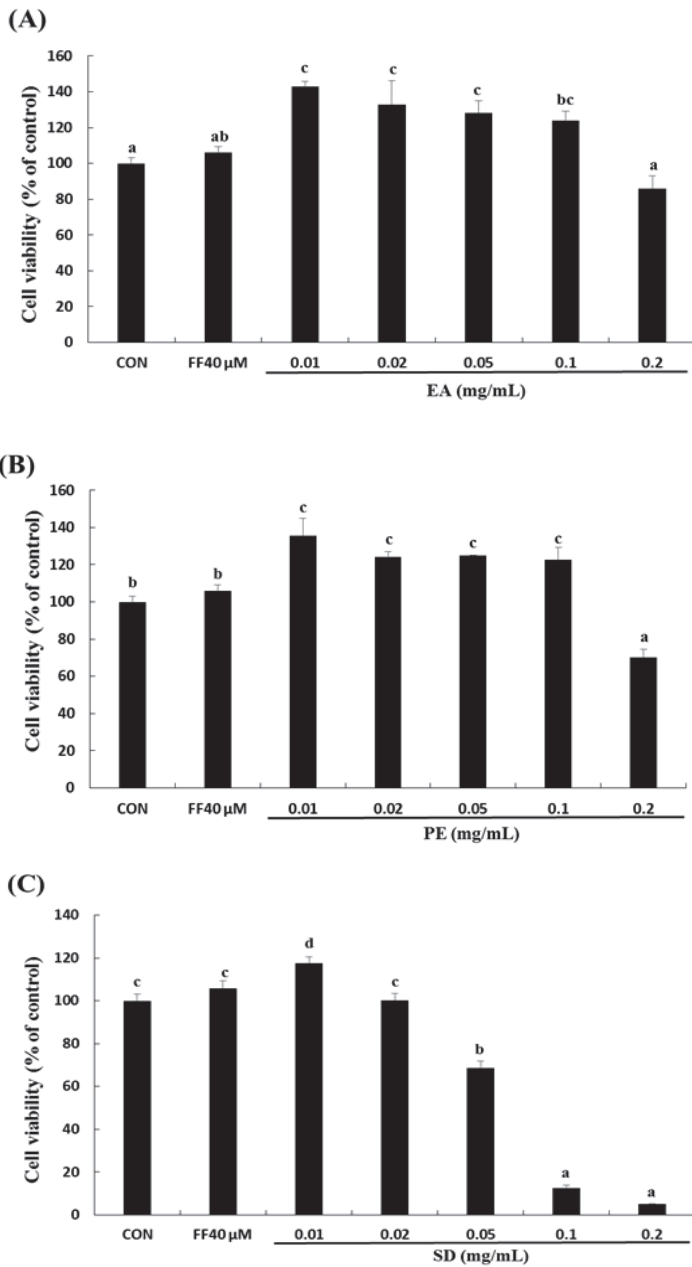
3T3-L1 세포에 EA를 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 0.2 mg/mL 처리군을 제외한 모든 농도에서 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. 또한 FF군보다 증가된 세포생존율을 보였다. PE를 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL 농도로 처리한 실험에서도 CON군에 비해 0.2 mg/mL 처리군을 제외한 모든 농도에서 용량 의존적으로 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. 또한 FF군에 비해 유의하게 세포생존율이 증가하였다.

SD를 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL 농도로 처리한 실험에서는 CON군에 비해 0.01, 0.02 mg/mL 처리군에서 세포생존율을 증가시켰으며, 0.01 mg/mL에서는 CON군 및 FF군에 비해 유의하게 세포생존율을 증가시켰다. 즉 0.1 mg/mL 이하의 농도 범위까지 EA와 PE가 유사하게 세포독성을 보이지 않았으며, SD는 0.02 mg/mL 이하의 농도까지 세포독성을 보이지 않았다. 따라서 이후 실험에서는 모든 정유추출물에서 세포독성을 나타내지 않은 0.01, 0.02 mg/mL 농도 이하로 세포를 처리하였다 (Fig. 3).

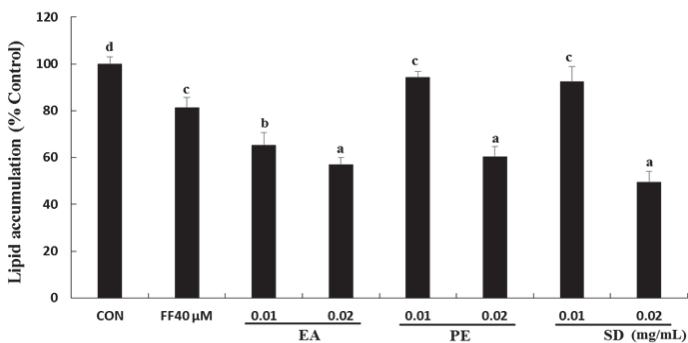
### 2. 3T3-L1 세포의 분화 및 지방축적에 미치는 영향

3T3-L1 세포에 EA를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리하고 Oil red-O 염색을 실시한 결과, CON군뿐만 아니라 FF군에 비해 모든 농도에서 유의하게 세포 내 지방축적 및 세포분화를 억제시켰다. PE를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 모든 농도에서 세포 내 지방축적 및 세포분화를 억제시켰으며, 0.02 mg/mL 농도에서 유의한 억제를 보였다. SD를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 모든 농도에서 세포 내 지방축적 및 세포분화를 억제시켰으며, 0.02 mg/mL 농도에서 유의한 억제를 보였다. 결과적으로 세포분화 및 지방축적을 억제시키는 전반적인 효능은 EA가 뛰어났다 (Fig. 4).

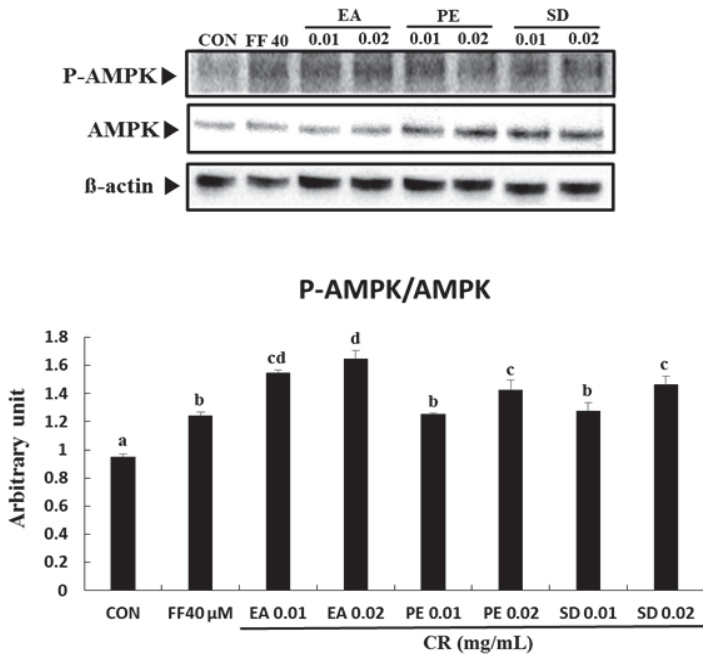




**Fig. 3.** Effects of essential oil from *Cnidii Rhizoma* on cell viability in 3T3-L1 adipocytes. (A) Cell viability in 3T3-L1 adipocytes after treatment of ethyl acetate-extracted essential oil (EA). (B) Cell viability in 3T3-L1 adipocytes after treatment of petroleum ether-extracted essential oil (PE). (C) Cell viability in 3T3-L1 adipocytes after treatment of steam distillation-extracted essential oil (SD). Data expressed as mean±standard error (S.E.) (n=3). Data with different superscript letters (a, b, c, d) represent significant differences between groups (p<0.05). CON: control group, FF: fenofibrate.



**Fig. 4.** Effects of essential oil from *Cnidii Rhizoma* on lipid accumulation and differentiation in 3T3-L1 adipocytes. Data expressed as mean±standard error (S.E.) (n=3). Data with different superscript letters (a, b, c, d) represent significant differences between groups (p<0.05). CON: control group; FF: fenofibrate, EA: ethyl acetate-extracted essential oil, PE: petroleum ether-extracted essential oil, SD: steam distillation-extracted essential oil.



**Fig. 5.** Effects of essential oil from *Cnidii Rhizoma* (CR) on phosphorylated adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (P-AMPK) and AMP-activated protein kinase (AMPK) protein expression in 3T3-L1 adipocytes. Data expressed as mean±standard error (S.E.) (n=3). Data with different superscript letters (a, b, c, d) represent significant differences between groups ( $p < 0.05$ ). CON: control group, FF: fenofibrate, EA: ethyl acetate-extracted essential oil, PE: petroleum ether-extracted essential oil, SD: steam distillation-extracted essential oil.

### 3. P-AMPK 및 AMPK의 단백질발현에 미치는 영향

3T3-L1 세포에 EA를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리하고 western blot 분석을 수행한 결과, CON군에 비해 농도 의존적으로 유의한 P-AMPK/AMPK의 발현 증가를 보였으며, 3가지 정유추출물 중 가장 우수한 효능을 보였다. 그리고 PE를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 P-AMPK/AMPK의 발현이 증가하였다. 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 SD를 처리한 결과, CON군에 비해 P-AMPK/AMPK의 발현이 유의하게 농도 의존적인 증가를 보였다. 또한 3가지 추출물 모두 고농도처리 군에서는 FF군보다 유의하게 발현이 증가하였으며, 특히 EA군은 2개 농도 모두에서 FF군에 비해 유의하게 P-AMPK/AMPK 발현 증가를 보였다(Fig. 5).

### 4. P-ACC 및 ACC의 단백질발현에 미치는 영향

3T3-L1 세포에 EA를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 P-ACC/ACC의 발현이 유의하게 증가하였고, 모든 농도에서 비슷한 증가를 보였다. PE를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 농도 의존적으로 P-ACC/ACC의 발현이 증가하였으나, 유

의성은 보이지 않았다. 그리고 SD를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 모든 농도에서 P-ACC/ACC의 발현이 증가하였다. 또한 3가지 정유추출물 모두 FF군에 비해 P-ACC/ACC 단백질 발현이 증가하는 경향을 보였으나, 유의한 증가는 보이지 않았으며, EA의 효능이 가장 뛰어난 것으로 관찰되었다(Fig. 6).

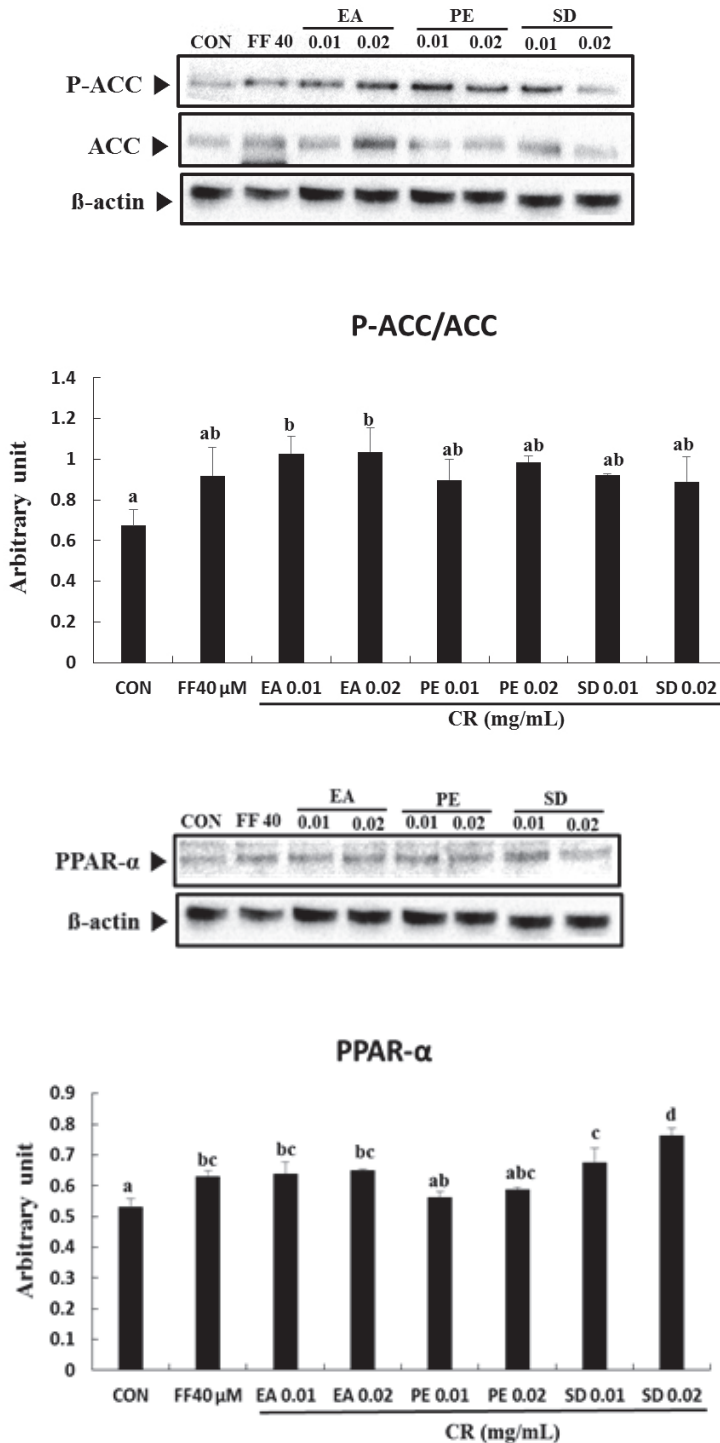
### 5. PPAR- $\alpha$ 의 단백질발현에 미치는 영향

3T3-L1 세포에 EA를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 C/EBP- $\alpha$ 의 발현이 유의하게 감소하였으며, 농도 의존적인 경향을 보였으나 비슷한 효과를 보였다. PE를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 농도 의존적으로 모든 농도에서 C/EBP- $\alpha$ 의 발현이 유의하게 감소하였다. SD를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 모든 농도에서 농도 의존적으로 C/EBP- $\alpha$ 의 발현이 유의하게 감소하였다. 또한 FF군에 비해 3가지 정유 추출물 처리군 모두에서 C/EBP- $\alpha$ 의 발현이 감소하는 것을 볼 수 있었으며, 특히 EA 처리군 모두와 SD 0.02 mg/mL 농도에서 유의한 C/EBP- $\alpha$ 의 발현 감소를 보였다(Fig. 7).

## 6. PPAR- $\gamma$ 의 단백질발현에 미치는 영향

3T3-L1 세포에 EA를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 모든 농도에서 모두 PPAR- $\gamma$ 의 발

현이 유의하게 농도 의존적으로 감소하는 것을 볼 수 있었다. PE를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 모든 농도에서 농도 의존적으로 유의한 PPAR- $\gamma$ 의 발현 감소를 보였다. SD를 0.01, 0.02 mg/mL 농도



**Fig. 6.** Effects of essential oil from Cnidii Rhizoma (CR) on phosphorylated acetyl-CoA carboxylase (P-ACC) and acetyl-CoA carboxylase (ACC) protein expression in 3T3-L1 adipocytes. Data expressed as mean $\pm$ standard error (S.E.) (n=3). Data with different superscript letters (a, b) represent significant differences between groups (p<0.05). CON: control group, FF: fenofibrate, EA: ethyl acetate-extracted essential oil, PE: petroleum ether-extracted essential oil, SD: steam distillation-extracted essential oil.

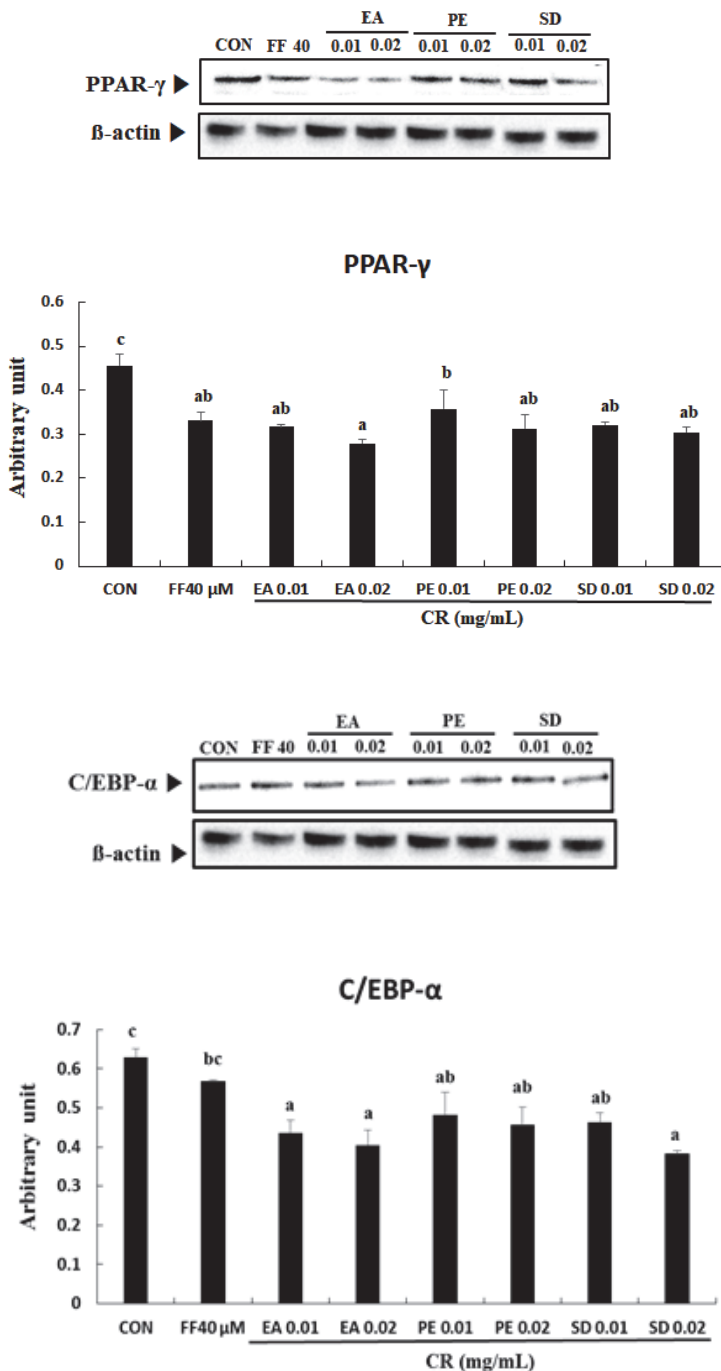
**Fig. 7.** Effects of essential oil from Cnidii Rhizoma (CR) on peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) protein expression in 3T3-L1 adipocytes. Data expressed as mean $\pm$ standard error (S.E.) (n=3). Data with different superscript letters (a, b, c, d) represent significant differences between groups (p<0.05). CON: control group, FF: fenofibrate, EA: ethyl acetate-extracted essential oil, PE: petroleum ether-extracted essential oil, SD: steam distillation-extracted essential oil.



로 처리한 결과, CON군에 비해 모든 농도에서 유의하게 PPAR- $\gamma$ 의 발현이 감소하였으며, 농도 의존적 경향을 보였다. 또한 FF군에 비해 3가지 정유 추출물에서 PPAR- $\gamma$ 가 증가하거나 감소하는 등 약간의 차이를 보였지만 통계적 유의성을 보이지 않았으며, EA 0.02 mg/mL 농도에서 가장 뚜렷한 감소를 보였다(Fig. 8).

### 7. C/EBP- $\alpha$ 의 단백질발현에 미치는 영향

3T3-L1 세포에 EA를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 C/EBP- $\alpha$ 의 발현이 유의하게 감소하였으며, 농도 의존적인 경향을 보였으나 비슷한 효과를 보였다. PE를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과,



**Fig. 8.** Effects of essential oil from Cnidii Rhizoma (CR) on peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) protein expression in 3T3-L1 adipocytes. Data expressed as mean $\pm$ standard error (S.E.) (n=3). Data with different superscript letters (a, b, c) represent significant differences between groups (p<0.05). CON: control group, FF: fenofibrate, EA: ethyl acetate-extracted essential oil, PE: petroleum ether-extracted essential oil, SD: steam distillation-extracted essential oil.

**Fig. 9.** Effects of essential oil from Cnidii Rhizoma (CR) on CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ) protein expression in 3T3-L1 adipocytes. Data expressed as mean $\pm$ standard error (S.E.) (n=3). Data with different superscript letters (a, b, c) represent significant differences between groups (p<0.05). CON: control group, FF: fenofibrate, EA: ethyl acetate-extracted essential oil, PE: petroleum ether-extracted essential oil, SD: steam distillation-extracted essential oil.

CON군에 비해 농도 의존적으로 모든 농도에서 C/EBP- $\alpha$ 의 발현이 유의하게 감소하였다. SD를 0.01, 0.02 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 모든 농도에서 농도 의존적으로 C/EBP- $\alpha$ 의 발현이 유의하게 감소하였다. 또한 FF군에 비해 3가지 정유 추출물 처리군 모두에서 C/EBP- $\alpha$ 의 발현이 감소하는 것을 볼 수 있었으며, 특히 EA 처리군 모두와 SD 0.02 mg/mL 처리 농도에서 유의한 C/EBP- $\alpha$ 의 발현 감소를 보였다(Fig. 9).

## 고찰》》》》》

생활수준의 향상과 함께 식생활이 변화되면서 점차 비만환자가 증가하는 추세에 있다. 사회적으로 비만에 대한 관심이 고조되면서 많은 체중감량 방법들이 제시되고 있지만 요요현상이 없으면서 안전한 체중 감량 및 유지 방법에 관한 연구가 절실하다. 이상적인 비만치료법은 지속적인 체중감소가 있어야 하며, 제지방 체중에는 영향을 주지 않고 체지방을 감소시킨 후 바람직한 체중을 계속 유지하는 것이다<sup>1)</sup>.

한의학에서는 肥滿을 肥, 肥人, 肥貴人, 肥白人, 記簿成, 肥胖<sup>7,8)</sup>으로 표현하고 있으며 『素問·奇病論』<sup>7)</sup>에는 “數食甘味而多肥也”, 『素問·通評虛實論』<sup>7)</sup>에 “肥貴人即高粱之疾也”라 하여 비만의 원인을 밝혔고 『靈樞·逆順肥』<sup>7)</sup>에서는 “年質壯大血氣充盈 膚革堅固 因可以邪刺 此者深而留之 此肥人也”이라 하여 비만의 병리적 특성을 설명하고 있다. 처방으로는 太陰調胃湯, 淸肺瀉肝湯, 葛根承氣湯, 承氣調胃湯 등의 四象方과 五積散, 防風通聖散, 防己黃蘗湯 등의 後世方이 비만의 치료에 많이 사용되었고, 단미제로 麻黃, 甘草, 大黃, 茯苓, 薏苡仁 등이 연구되었다<sup>9)</sup>.

천궁은 肝·膽·心包經絡에 歸經하고, 活血行氣 祛風止痛의 효능이 있어 月經不調, 經閉通經, 胸脇刺痛, 跌撲腫痛, 風濕痺痛을 치료한다. 천궁의 근경은 ligustilide, senkyunolide, butylidene phthalide, cnidilide와 같은 정유 성분과 tetramethylpyrazine, neocnidilide,  $\beta$ -sitosterol, sedanolide 등의 다양한 성분을 함유하고 있다<sup>3)</sup>.

현재 국내에서 유통되는 천궁에는 土川芎, 日川芎, 中國川芎 등이 있다. 이 중 日川芎의 기원식물은 *Cnidium officinale* Makino이며, 中國川芎은 *Ligusticum chuanxiong* Hort., 土川芎은 *Ligusticum chuanxiong* Hort.의

한 품종으로 알려져 있다. 이 중 국내에서는 土川芎을 上品으로 취급한다<sup>3)</sup>.

현재 천궁에 관해 보고된 연구들로는 Jeong 등<sup>10)</sup>의 항산화 효과, Choi 등<sup>11)</sup>의 항염증 효과, Jeong 등<sup>12)</sup>의 혈구암세포의 apoptosis 유발 효과 등이 있다. 저자는 천궁을 여러 가지 정유의 추출법에 따라 추출하여 얻은 정유추출물의 임상 활용도를 높이고자 본 연구를 수행하였다. 우선 *in vitro*에서 3T3-L1 전지방세포를 성숙한 지방세포로 분화시키면서 정유추출물을 처리하여 세포독성을 평가하였고, 독성이 없는 농도 범위의 정유추출물을 세포에 처리하여 세포분화 및 지방생성에 관련하는 인자들의 단백질 발현을 관찰을 통해 항비만 효과를 검증하였다.

세포독성을 관찰하는 세포생존을 측정검사의 원리는 살아있는 세포에 미토콘드리아의 환원 효소가 존재하므로 MTT 용액을 처리할 경우 생성되는 formazan의 양은 살아있는 세포의 양에 비례하게 된다는 것이다<sup>13)</sup>. 본 연구에서 천궁의 용매별 정유추출물인 EA 및 PE를 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL 농도로 처리한 결과, CON군에 비해 0.2 mg/mL 처리군을 제외한 모든 농도에서 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. SD는 CON군에 비해 0.01, 0.02 mg/mL 처리군에서 세포생존율을 증가시켰으나, 0.05 mg/mL 이상의 농도에서는 세포독성을 보였다(Fig. 3).

3T3-L1 세포는 마우스의 섬유아세포에서 유래된 전지방세포로서, 인슐린과 같은 유도물질의 존재하에서 지방세포로 분화하는 성질을 갖고 있어 지방세포 분화 전후를 뚜렷하게 비교할 수 있다. 이러한 특징으로 인해 1974년에 소개된 이후 지방축적 및 지방세포의 대사, 분화과정을 연구하는 데 가장 많이 사용되는 *in vitro* 세포 모델이다<sup>14)</sup>. 본 실험에서 용매별 정유추출물 EA, PE, SD를 3T3-L1 세포에 처리하고 Oil red-O 염색을 실시한 결과, EA는 CON군 및 FF군에 비해 모든 처리 농도에서 용량 의존적으로 유의하게 세포 내 지방축적 및 세포분화를 억제시켰다(Fig. 4). PE 및 SD는 CON군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 지방축적 및 세포분화를 억제하였다. 결과적으로 EA의 세포분화 및 지방축적 억제 효과가 뛰어났으며, SD는 고농도(0.02 mg/mL)에서 뛰어난 효력을 보여주었다.

AMPK는 catalytic  $\alpha$  subunit, regulatory  $\beta$  및  $\gamma$  subunit로 구성되어 있는 serine/threonine kinase이다. 에너지 균형 조절자로서 지질과 포도당을 조절하여 당뇨와 비만의 대사에 중요한 역할을 한다<sup>15)</sup>. AMPK는 에너지

소모로 유발된 AMP/adenosine triphosphate (ATP) ratio의 증가에 따른  $\gamma$  subunit의 AMP 결합이며,  $\alpha$  subunit의 threonine residue Thr172 인산화와 allosteric activation 촉진에 의해 활성화가 유발된다<sup>16-18</sup>. AMPK의 활성화는 포도당 생성 및 지방 생성을 감소시키며, ACC 및 포도당 산화의 불활성화를 통해 지방산과 같은 ATP 소비에서 활성 ATP 생산 과정으로 전환시킨다<sup>19,20</sup>. 또한 AMPK의 활성화는 지방산 합성과 콜레스테롤 합성을 조절하는 ACC를 인산화시킴으로써 ACC 효소를 불활성화시킨다<sup>21</sup>. 용매별 정유추출물을 3T3-L1 세포에 처리하고 에너지 대사 및 지방대사를 조절하는 AMPK 및 P-AMPK의 단백질 발현을 관찰한 결과 EA, PE, SD 모두 CON군에 비해 모든 처리농도에서 P-AMPK/AMPK의 발현을 농도 의존적으로 유의하게 증가시켰다(Fig. 5). 또한 ACC 및 P-ACC의 단백질 발현 정도는 EA, PE, SD의 0.01, 0.02 mg/mL 처리 후에 CON군에 비해 모든 농도에서 유의하게 농도 의존적으로 단백질 발현이 증가하였으며, 특히 EA의 효능이 가장 우수하였다(Fig. 6).

전지방세포에서 지방세포로 분화가 일어나는 과정에 세포형태의 변화, 유전자 발현의 변화, 호르몬 민감성의 변화 그리고 단백질 발현의 변화가 복합적으로 작용한다<sup>22</sup>. 지방세포의 형성 과정에서 가장 중요한 조절 인자는 PPARs와 C/EBPs로 알려져 있다<sup>23</sup>. 분화가 시작되면 초기 전사 인자인 C/EBP- $\beta$ , C/EBP- $\delta$ 가 C/EBP- $\alpha$ 와 PPAR- $\gamma$ 의 발현량을 증가시킨다. 이는 최종적으로 lipoprotein lipase, leptin, adiponectin, fatty acid binding protein 4와 같은 최종 마커들의 발현을 촉진시킨다<sup>24</sup>. 또한 carnitine palmitoyl transferase도 지방대사와 호르몬 생성에 중요한 역할을 하는 효소로서 지방산의 beta-oxidation에 관여한다고 알려져 있다<sup>25</sup>. PPAR- $\alpha$ 는 간에서 지방대사의 주요 조절자로서 PPAR- $\alpha$ 의 활성화는 지방산 수송 그리고 지방산의 산화에 포함된 유전자의 촉진 조절에 의한 지방산의 획득, 이용 및 분해를 높여준다<sup>26,27</sup>. 그리고 PPAR- $\gamma$ 는 지방세포의 분화에 중요한 역할을 하는 전사인자로 간, 근육 및 지방조직 등 인슐린 표적장기에 분포한다<sup>28</sup>. 지방세포 분화과정의 후기에 특이적인 유전자 발현 활성화를 통해 분화를 촉진시킴으로써 분화과정을 완성시킨다<sup>22</sup>. 용매별 정유추출물인 EA, PE, SD를 3T3-L1 세포에 처리하고 PPAR- $\alpha$ 의 단백질 발현을 관찰한 결과, 3가지 추출물은 모든 처리농도에서 CON군에 비해

PPAR- $\alpha$ 의 발현을 농도 의존적으로 유의하게 증가시켰다(Fig. 7). 또한 PPAR- $\gamma$ 의 단백질 발현 관찰에서는 3가지 추출물은 모든 처리농도에서 CON군에 비해 PPAR- $\gamma$ 의 발현을 유의하게 감소시켰으며(Fig. 8), 농도 의존적으로 C/EBP- $\alpha$ 의 발현도 유의하게 감소시켰다(Fig. 9). 이는 천궁의 정유 추출물이 모두 지방세포의 분화 및 지방생성을 억제하고 지방산 산화를 증가시킴으로써 항비만 효과를 가질 것으로 생각된다. 이는 본 실험의 Oil red-O 염색 결과와도 일치함을 알 수 있다.

본 실험에서 정유추출물이 지방세포의 분화 및 지방대사를 조절하는 단백질 발현 정도에 미치는 영향을 살펴본 결과, 천궁의 정유추출물, 특히 EA는 항비만 효과가 큰 소재로서 추후 동물실험이나 더 자세한 기전 연구 등 심도 있는 연구가 뒷받침될 경우, 향기 요법 등의 비만 치료와 관련된 다양한 분야에서 많이 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론»»»»

천궁의 정유추출물이 지방세포의 분화 및 지방축적에 미치는 효과를 알아보기 위해 용매추출법 및 수증기 증류법으로 추출하여 3T3-L1 세포에 처리한 후 다음의 결과를 얻었다.

1. 정유추출물인 EA, PE, SD는 0.02 mg/mL 이하의 농도 범위에서는 세포독성을 나타내지 않았으며, 특히 EA는 0.2 mg/mL 이하, PE는 0.1 mg/mL 이하에서도 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 정유추출물인 EA, PE, SD는 모두 0.02 mg/mL 이하의 농도 범위에서 농도 의존적으로 3T3-L1 세포분화 및 지방축적을 억제시켰다.
3. 정유추출물인 EA, PE, SD는 모두 0.02 mg/mL 이하의 농도 범위에서 CON군에 비해 농도 의존적이면서 유의하게 AMPK와 ACC의 인산화를 증가시켰다.
4. 정유추출물인 EA, PE, SD는 모두 0.02 mg/mL 이하의 농도 범위에서 CON군에 비해 농도 의존적이면서 유의하게 PPAR- $\alpha$ 의 단백질 발현을 증가시켰다.
5. 정유추출물인 EA, PE, SD는 모두 0.02 mg/mL 이하의 농도 범위에서 CON군에 비해 농도 의존적이면서 유의하게 PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP- $\alpha$ 의 단백질 발현을

감소시켰다.

결론적으로 천궁의 정유추출물은 양성대조군인 fenofibrate보다 유의하거나 유사한 지방세포의 분화 및 지방의 대사 조절을 통해 지방의 축적을 억제함으로써, 항비만 소재로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## References>>>>

1. The Society of Korean Medicine Rehabilitation, Korean Rehabilitation Medicine, 4th ed, Paju:Koonja Publishing, 2015:299-302.
2. Joo JK, Lee KS, Pharmacotherapy for obesity. J Menopausal Med, 2014;20(3):90-6.
3. Korean Medical College Society Textbook Compilation Committee, The Herbology, 1st ed, Seoul:Younglimsa, 2008:447-8.
4. Gong JH, Susebowon, Taipei:Gangupseoguk Co., Ltd, 1987:102-3.
5. Won HR, Effect of the *Cnidium officinale* makino water extract on the lipid metabolism of rats fed a hypercholesterol diet, Korean J Community Living Sci, 2015; 26(2):351-60.
6. Yoon BH, The effects of *Cnidium officinale* makino methanol extract on the control of 3T3-L1 preadipocytes differentiation [dissertation], Anseong (KR):Graduate School of Hankyong National University; 2011.
7. Yang YG, Naegyeongsomun-yeakhae, Seoul:Daesung Print, 1990:235-43, 356-61.
8. Jang JK, Geumgweoryak, Seoul:Sungbosa, 1985:35.
9. Kim JM, Choi SM, Yang DH, An HD, The effect of oral administration at herbal medicines in animal models on obesity: a review of animal study reports published in Korea after 2010, J Korean Med Rehabil, 2017;27(3): 13-32.
10. Jeong JB, Ju SY, Park JH, Lee JR, Yun KW, Kwon ST, Lim JH, Chung GY, Jeong HJ, Antioxidant activity in essential oils of *Cnidium officinale* makino and *Ligusticum chuanxiong* hort and their inhibitory effects on DNA damage and apoptosis induced by ultraviolet B in mammalian cell, Cancer Epidemiol, 2009;33(1):41-6.
11. Choi SW, Kim EO, Leem HH, Kim JK, Anti-inflammatory effects of volatile flavor extracts from *Cnidium officinale* and *Angelica gigas*, J Korean Soc Food Sci Nutr, 2012;41(8):1057-65.
12. Jeong JW, Choi YH, Park C, Induction of apoptosis by ethanol extract of *Cnidium officinale* in human leukemia U937 cells through activation of AMPK, Journal of Life Science, 2015;25(11):1255-64.
13. Yoo DH, Joo DH, Lee SY, Lee JY, Antioxidant effect of *Nelumbo nucifera* G, leaf extract and inhibition of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase expression in a B16F10 melanoma cell line, Journal of Life Science, 2015;25(10):1115-23.
14. Rosen ED, Spiegelman BM, Molecular regulation of adipogenesis, Annu Rev Cell Dev Biol, 2000;16:145-71.
15. Fogarty S, Hardie DG, Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer, Biochim, Biophys, Acta, 2010;1804(3):581-91.
16. Momcilovic M, Hong SP, Carlson M, Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro, J Biol Chem, 2006;281(35):25336-43.
17. Shen QW, Zhu MJ, Tong J, Ren J, Du M, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase is involved in AMP-activated protein kinase activation by alpha-lipoic acid in C2C12 myotubes, Am J Physiol Cell Physiol, 2007;293(4):C1395-403.
18. Zeqiraj E, Filippi BM, Deak M, Alessi DR, van Aalten DM, Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation, Science, 2009;326(5960):1707-11.
19. Carling D, The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control, Trends Biochem Sci, 2004;29(1):18-24.
20. Kim EJ, Jung SN, Son KH, Kim SR, Ha TY, Park MG, Jo IG, Park JG, Choe W, Kim SS, Ha J, Antidiabetes and antiobesity effect of cryptotanshinone via activation of AMP-activated protein kinase, Mol Pharmacol, 2007;72(1):62-72.
21. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG, AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism, Cell Metab, 2005;1(1):15-25.
22. Ntambi JM, Kim YC, Adipocyte differentiation and gene expression, J Nutr, 2000;130(12):3122S-6S.
23. van Tienen FH, Laeremans H, van der Kallen CJ, Smeets HJ, Wnt5b stimulates adipogenesis by activating PPAR gamma, and inhibiting the beta-catenin dependent Wnt signaling pathway together with Wnt5a, Biochem Biophys Res Commun, 2009;387(1):207-11.
24. Gustafson B, Smith U, Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes, J Biol Chem, 2006;281(14):9507-16.
25. Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK, Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions, Biochim Biophys Acta, 2006; 1763(12):1413-26.
26. Frazier-Wood AC, Ordovas JM, Straka RJ, Hixson JE, Borecki IB, Tiwari HK, Arnett DK, The PPAR alpha gene is associated with triglyceride, low-density cholesterol and inflammation marker response to fenofibrate

- intervention: the GOLDN study. *Pharmacogenomics J.* 2013;13(4):312-7.
27. Kelley GL, Azhar S. Reversal of high dietary fructose-induced PPAR $\alpha$  suppression by oral administration of lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitors. *Nutr Metab (Lond).* 2005;2:18.
28. Choi JS, Kim JS, Ali MY, Min BS, Kim GD, Jung HA. Coptis chinensis alkaloids exert anti-adipogenic activity on 3T3-L1 adipocytes by downregulating C/EBP- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$ . *Fitoterapia.* 2014;98:199-208.