



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

지구자 추출물 분획의 항 비만 효과
연구

지도교수 엄재영

지도교수 장형진

경희대학교 대학원

한의생명과학과

심 정 은

2015년 2월

지구자 추출물 분획의 항 비만 효과 연구

지도교수 엄재영

지도교수 장형진

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

경희대학교 대학원

한의생명과학과

심 정 은

2015년 2월

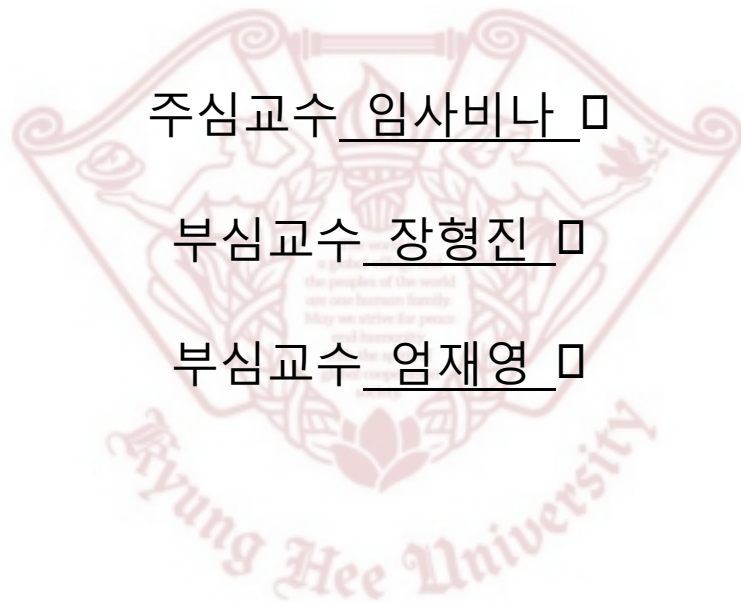
심정은은의 한의학 석사학위

논문을 인준함

주심교수 임사비나 □

부심교수 장형진 □

부심교수 엄재영 □



경희대학교 대학원

2015년 2월

목 차

I. 서 론	1
II. 실험재료 및 방법	4
1. 재료	4
2. 방법	4
1) 세포 독성 검사	4
2) 세포 배양 및 분화	5
3) Oil Red O 염색	5
4) RNA 추출과 real-time RT-PCR	6
5) 단백질 추출과 Western blotting	9
3. 통계 분석	9
III. 실험 결과	10
1. 세포독성 시험 결과	10
2. 지방세포 분화억제 효과	12
1) 지구자 분획의 3T3-L1 지방전구세포 지방축적 억제 효과	12
2) 지구자 분획의 지방세포 분화조절인자 유전자 발현 억제 효과	15
3) 지구자 분획의 지방세포 분화조절인자 단백질 발현 억제 효과	19
IV. 고 찰	22

V. 결 론.....	26
-------------	----

참 고 문 헌.....	27
--------------	----

ABSTRACT	34
----------------	----

국문초록.....	36
-----------	----



LIST OF TABLE

Table 1: Sequences of oligonucleotide primers (5' to 3') for real-time RT-PCR 7



LIST OF FIGURES

Figure. 1 Effect of ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol, and n-hexane extract from the Hoveniae Semen cum Fructus on cell viability in 3T3-L1 cells.....	11
Figure. 2 Effect of ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol, and n-hexane extract from the Hoveniae Semen cum Fructus on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.....	13
Figure. 3 Effect of methylene chloride and n-hexane extract from the Hoveniae Semen cum Fructus on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.....	14
Figure. 4 Effect of MHF on mRNA expression of PPAR γ and C/EBP α during the differentiation in 3T3-L1 cells.....	16
Figure. 5 Effect of MHF on mRNA expression of adipogenic factors during the differentiation in 3T3-L1 cells.....	17
Figure. 6 Effect of MHF on protein expression of PPAR γ and C/EBP α during the differentiation in 3T3-L1 cells.....	20
Figure. 7 Effect of MHF on protein expression of adipogenic factors during the differentiation in 3T3-L1 cells.....	21

I. 서론

비만은 음식의 섭취량과 에너지 소비의 불균형에서 생기는 잉여 에너지가 지방으로 축적되는 것이 과다해져 발생하는 질병이다¹⁾. 한의학에서 비만에 관한 문헌을 살펴 보면, 『황제내경(黃帝內經)』 「통평허실론편(通評虛實論篇)」에서 “비귀인(肥貴人, 즉고량지질야(則膏粱之疾也)”로 고열량 식이로 생긴 질병으로 설명하였다²⁾. 「기병론편(奇病論篇)」에서는 “차인필수식감미이다비야(此人必數食甘味而多肥也)”라고 처음으로 언급된 이후로 비만을 비(肥), 비인(肥人), 육인(肉人), 비귀인(肥貴人) 등으로 표현하였으며, 대사이상으로 인한 장부기허(臟腑氣虛), 습담어혈(濕痰瘀血)을 비만의 원인으로 보았다³⁾. 갈수록 생활방식이 편리해지면서 육체적 활동이 부족해지고 국민 식생활이 동물성식품의 과다섭취로 이어지면서, 이로 인한 지방섭취량의 증가로 인해 비만인구는 매우 빠른 속도로 증가하고 있다⁴⁾. 비만하게 되면 심리적, 사회적으로 개인을 위축시킬 뿐만 아니라, 당뇨병, 고지혈증, 고혈압 및 심혈관계 질환 등 다양한 대사질환의 발병과 밀접한 연관성이 있어 비만인 사람에게 이러한 질병들의 유병률 및 사망률이 높다⁵⁻⁷⁾. 비만인구가 늘어감에 따라 세계보건기구(WHO)에서는 비만을 단순히 신체적 변화로 보는 것이 아니라 건강과 보건의 위협이 되는 치료가 필요한 질병으로 분류하고 있고⁸⁾, 이미 많은 비만 치료제들도 개발되었으나 이 또한 많은 부작용들이 동반되는 것으로 알려져 있어 현재까지 부작용이 없는 완전한 비만치료제는 시판되지 않는 실정이다⁹⁻¹¹⁾. 이러한 비만 치료의 문제점을 극복하기 위하여 최근에는 식품의 원료 내에 존재하는 천연 기능물질들이 비만의 예방과 치료에 효과가 있다는 사실이 알려지면서 천연식품 소재를 이용한 비만의 예방과 치료를 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{12,13)}.

Adipogenesis 즉, 지방세포형성은 지방세포가 만들어지는 분화의 과정으로 서 세포 형태, 유전자와 단백질의 발현, 호르몬 민감도의 변화 등을 동반하는데^{14,15)}, 비만은 지방전구세포의 분화 및 adipogenesis 과정에 의하여 지방세포의 세포 내 중성지방(triglyceride, TG)의 축적으로 발생하고, 이러한 기전들을 조절하는 것이 효과적인 비만억제를 위한 약물기전으로 알려져 있다¹⁶⁾. 그 중, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 및 cytidine-cytidine-adenosine-adenosine e-thymidine(CCAAT)/enhancer binding proteins(C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ) 등과 같은 adipogenic transcription factor 등이 중요한 조절인자가 된다¹⁷⁾. 특히, 이 중 C/EBP β 와 C/EBP δ 는 insulin, dexamethasone(DEX), 1-methyl-3-methylxanthine(IBMx) 등과 같은 hormonal cocktail에 의해 분화초기에 일시적이고 빠르게 발현되는 반면, C/EBP α 와 PPAR γ 는 분화 후기에 발현되고, 지방세포에 특이적인 유전자의 발현을 활성화함으로써 인하여 분화를 더욱 촉진시킨다¹⁸⁾. 지방세포를 가지는 동물모델에서 C/EBP α 를 제거하였을 때, 지방축적이 나타나지 않는 것이 관찰되어 효과적인 비만 억제제를 위해서는 지방세포 분화과정에 관여하는 전사인자들의 활성을 억제하는 것이 매우 중요한 것으로 밝혀졌다¹⁹⁻²¹⁾.

헛개나무 열매(*Hoveniae Semen cum Fructus*)는 한의학에서 지구자^{枳椇子}라고 하여 한약재로 이용되며, 갈매나무과(Rhamnaceae)에 속한 헛개나무(*Hovenia dulcis* Thunb.)의 다육질의 과병^{果柄}이 붙은 과실로²²⁾, 맛이 달거나 시며, 성질은 평하고, 주로 심, 비, 폐경으로 들어가서 약효를 발휘하는데, 갈증을 그치게 하고 답답함을 없애며, 열을 맑게 하고, 술독을 풀어주며, 대변과 소변을 통하게 하는 효능을 지니고 있다²³⁾. 지구자에 대한 최초의 문헌은 당대^{唐代}에 『신수본초^{新修本草}』로, “지구미감평무독주두풍소복물급^{枳椇味甘平無毒主頭風小腹物急}”이라고 언급하고 있다²⁴⁾. 또한, 당대^{唐代} 『식료

본초『食療本草』에서는 “다식발회충(多食發蛔蟲)”이라고 기록 되어있는 지구자의 부작용(副作用)에 대한 설명도 하고 있다²⁵⁾. 또한, 지구자는 성미(性味)가 감(甘) 혹은 감산평(甘酸平)하며, 귀경(歸經)은 주로 심비경(心脾經), 폐경(肺經)으로 입(入)하며²⁶⁾, 지갈제번(止渴除煩), 청열(淸熱), 해주독(解酒毒), 리대소변(利大小便)하여 취주(醉酒), 열병소갈(熱病消渴), 번갈(煩渴), 구토대소변불리(嘔吐大小便不利)를 치료(治療)한다²⁷⁾. 지구자에 대한 현대의 연구 결과로는 과음의 부작용으로 나타나는 황달, 지방간, 간 경화증, 위장병 및 대장염 등의 간 기능 보호에 효능이 뛰어나며, 알코올 분해 및 간 기능 회복에 효과가 있다는 보고가 있고, 항산화 및 항균작용을 나타낸다는 연구결과도 있다²⁸⁻³¹⁾. 하지만 지구자의 분획에 대한 항 비만 효과에 대한 연구는 부족한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 지구자의 열수 추출물이 항 비만 효과가 있다는 점을 단초로 하여³²⁾, 지구자를 다양한 유기용매로 분획하여, PPAR γ , C/EBP α , adipocyte selective fatty acid binding protein(aP2), adiponectin, resistin 등 지방세포 분화관련 인자 조절여부를 유전자와 단백질발현 측정방법을 통해 확인해보고, 비만치료제로서 지구자를 효과적으로 이용하는 자료를 제공하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 지구자 물 추출물은 (주) 새롬(전남 장흥군)에서 제공받아 사용하였다. 추출 조건은 다음과 같다. 지구자 100 kg 에 1000 L 물을 넣고 95 °C 이상에서 8 시간 가열한 후, 물을 제거하고 남은 지구자에 다시 500 L 물을 넣고 95 °C 이상에서 8 시간 가열 추출하고 두 추출 용액을 합쳐서 동결 건조하였다. 지구자 열수 추출물의 수득률은 6%였다. 분획을 위해서 물 추출물 30 g 에 10% MeOH 300 mL 로 현탁한 다음 n-hexane(400 mL × 3), methylene chloride(400 mL × 3), ethyl acetate(400 mL × 3)와 n-butanol(400 mL × 3)을 순차적으로 가하여 추출 분획물을 얻었다. 각각의 분획물은 감압 농축한 후 Centrifugal Evaporator (EYELA, Japan)를 이용하여 최종 분획물을 얻은 후, DMSO(dimethyl sulfoxide, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$)에 녹여서 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 독성 검사

세포 생존율의 측정을 위해 지방전구세포(pre-adipocyte)인 3T3-L1 세포를 96 well plate에 2×10^4 cell/well로 분주하여 24 시간 배양한 후 농도 별로 희석한 네 개의 지구자 분획(ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol, n-hexane)을 48시간 처리하였다. 각 well당 MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt)용액을 10 μL 씩 첨가한 후 37 °C, 5% CO_2 배양기에서 4 시간 배양하였다. 배양이 끝난 다음 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 세포 배양 및 분화

지방전구세포인 3T3-L1세포를 세포 배양액 10% bovine serum(BS)과 penicillin/streptomycin/glutamine(P/S/G) 항생제(antibiotics)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's media(DMEM)를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 2-3일 간격으로 배양세포에 1 × PBS로 씻어낸 다음, 0.25% 트립신(trypsin) 500 µl 를 처리하여 세포를 탈착시켜 계대 배양하였다.

지방전구세포를 지방세포로 분화유도하기 위하여 10% fetal bovine serum(FBS) 이 포함된 DMEM 배지에 분화유도 물질인 인슐린(1 µg/ml), DEX(1 µM), IBMX(0.5 mM)가 함유된 분화유도 배양액으로 교환하여 2일간 배양하였다. 배양 2 일 후 인슐린만 함유하는 배지로 교환하고 지구자에서 추출된 분획을 처리하여 2일간 배양하고, 다시 인슐린만 함유한 배지로 교환한 후 2일간 배양한 다음 배양액은 버리고 남아있는 세포를 회수하여 실험에 사용하였다.

3) Oil Red O 염색

지방세포로 분화된 세포내의 지방을 염색하여 분화 정도를 측정하였다. 세포를 10% formaldehyde로 1시간 동안 고정시킨 후 60% isopropanol로 세척하고 완전히 말린 다음, 60% Oil Red O 로 30분간 염색하였다. 30분 뒤, 3차 증류수로 3-4번 씻어낸 다음 완전히 말린 후에, 염색세포질 내 붉은색 과립이 있는 세포를 분화된 지방세포로 간주하고, 염색된 Oil Red O를 100% isopropanol로 용해한 뒤, 500 nm에서 흡광도를 측정하여 지방세포의 분화 정도를 측정하였다.

4) RNA 추출과 real-time RT-PCR

지방세포를 분화시켜 약물을 농도 별로 처리 한 후, QIAzol lysis reagent를 사용하여 RNA를 추출하였다. 각각의 실험군에서 얻어진 2 μ g의 RNA를 template로 하여, power cDNA synthesis kit(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Kyunggi, Korea)를 사용하여 single stranded cDNA를 제조하였다. DNA를 특이적으로 증폭하는 PPAR γ , C/EBP α , aP2, adiponectin, resistin의 primers를 넣어 real-time RT-PCR(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 mRNA의 발현 정도를 분석하였다. 실험에 사용한 primer들은 Table 1에 명시하였다.



Table 1: Sequences of oligonucleotide primers (5' to 3') for real-time RT-PCR.

Genes	5' to 3' Oligonucleotide Sequences
Mouse PPAR γ	
Sense (Forward)	TTT TCA AGG GTG CCA GTT TC
Antisense (Reverse)	TTA TTC ATC AGG GAG GCC AG
Mouse C/EBP α	
Sense (Forward)	GCC GAG ATA AAG CCA AAC AA
Antisense (Reverse)	CCT TGA CCA AGG AGC TCT CA
Mouse aP2	
Sense (Forward)	CGTAAATGGGGATTGTTGGTCA
Antisense (Reverse)	TCGACTTTCCATCCCACTTC
Mouse Adiponectin	
Sense (Forward)	AGACCTGGCCACTTTCTCCTCATT
Antisense (Reverse)	AGAGGAACAGGAGAGCTTGCAACA
Mouse Resistin	
Sense (Forward)	TTCCTTGTCCTGAACTGCT
Antisense (Reverse)	AGCTCAAGACTGCTGTGCCT
Mouse GAPDH	
Sense (Forward)	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG
Antisense (Reverse)	GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT

PPAR γ , peroxisome proliferator activated receptor γ ; C/EBP α , CCAAT enhancer

binding protein α ; aP2, adipocyte fatty acid-binding protein 2; GAPDH, glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase.



5) 단백질 추출과 Western blotting

지방세포를 분화시켜 약물을 처리한 후, 3T3-L1 세포를 radioimmunoprecipitation assay(RIPA) buffer [50 mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1% sodium dodecyl sulphate(SDS), 0.1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethsulphonyl fluoride]로 용해시킨 다음, 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질(15 µg)을 sample buffer(62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)와 함께 섞고 95 °C에서 5분 간 반응시켰다. 그 후에 10-12% SDS-polyacrylamide(PAGE) gel에 전기영동 한 다음 polyvinyl difluoride(PVDF) membrane에 transfer 하였다. 5% skim milk로 blocking한 후 여러 가지 1차 항체(PPAR γ , C/EBP α , aP2, adiponectin, resistin)를 부착시켜 over night 동안 cold room에서 반응 시킨 다음, 부착된 1차 항체와 맞는 2차 항체로 1 시간이상 반응시키고 ECL용액(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 목적 단백질을 확인하였다.

3. 통계 분석

실험 결과는 각 실험에 대한 평균값 \pm S.E.M.으로 표기하였고, 각 그룹간의 차이를 결정하기 위한 통계 분석은 *t*-test를 이용하였다. $p < 0.05$ 의 결과를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 모든 통계분석은 SPSS v 20 statistical analysis software를 이용하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. 세포독성 시험 결과

실험에 사용된 지구자로부터 추출된 ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol, n-hexane 분획이 지방세포의 생존율에 미치는 영향을 관찰하기 위해 MTS assay를 진행하였다. 그 결과 ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol, n-hexane 추출분획은 5 $\mu\text{g/ml}$ 까지 세포독성이 없음을 확인하였고, n-butanol은 10 $\mu\text{g/ml}$ 까지 세포독성이 없음을 확인하였다. 한편, ethyl acetate, methylene chloride, n-hexane 추출분획은 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포독성을 나타냄을 확인하였다(Fig. 1).



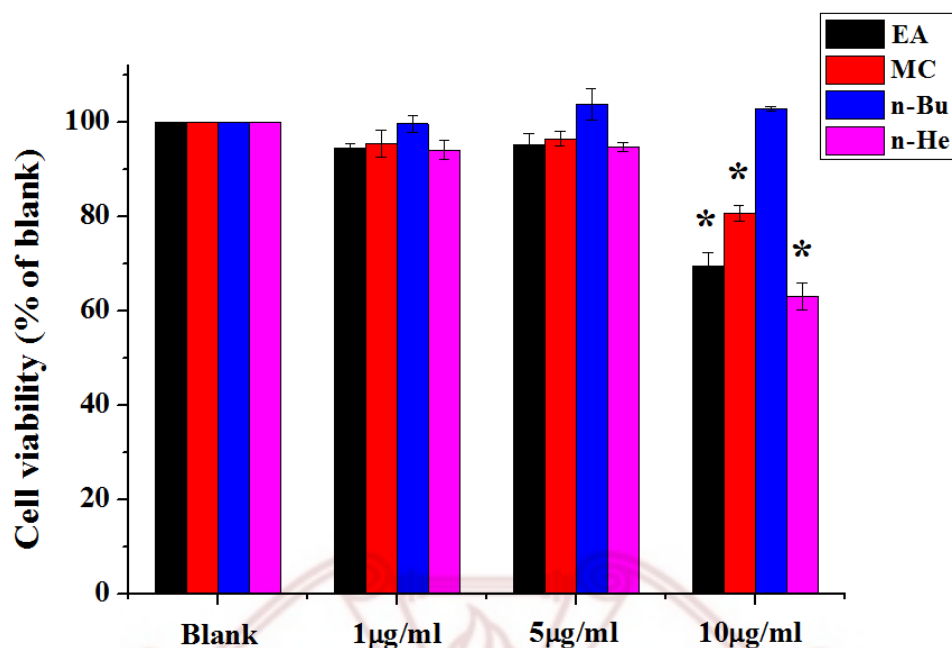


Figure. 1 Effects of ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol and n-hexane extract from the *Hoveniae Semen cum Fructus* on cell viability in 3T3-L1 cells.

Cells were incubated with ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol and n-hexane at the indicated concentration for 48 h. Cell viability was assessed by MTS assay. All values are mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ versus Blank. EA, ethyl acetate extract; MC, methylene chloride extract; n-Bu, n-butanol extract; n-He, n-hexane extract.

2. 지방세포 분화억제 효과

지구자에서 추출된 4가지 ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol, n-hexane 분획을 3T3-L1 지방세포에 처리 후 지방세포 분화억제 정도를 측정하였다. 분화 억제 정도는 Oil Red O 측정법을 통하여 확인하였고, 지방세포 분화인자 발현 정도는 real-time RT-PCR, Western blot을 통해 확인하였다.

1) 지구자 분획의 3T3-L1 지방전구세포 지방축적 억제 효과

Oil Red O 염색법을 통하여 지구자 분획의 지방축적 억제 정도를 측정하였다. 3T3-L1 지방세포에 각 분획을 처리하여 지방축적 억제 정도를 측정한 결과, 분획 중 methylene chloride와 n-hexane이 5 µg/ml에서 지방축적 억제 효과를 나타냄을 확인하였다(Fig. 2). 상기의 결과를 기초로 하여, 지구자 분획 중 methylene chloride, n-hexane 분획의 다양한 농도에서 지방 축적 억제 효과를 Oil red O 염색법을 통해 확인한 결과, methylene chloride와 n-hexane 분획 모두 5 µg/ml의 농도에서 지방 축적 억제효과가 있는 것을 확인하였으며, 특히 지구자 methylene chloride 분획의 억제 효과가 탁월한 것을 확인하였다(Fig. 3). 따라서 이후의 지방조절인자 관련 실험은 지구자 methylene chloride 분획(methylene chloride extract from the Hoveniae Semen cum Fructus, MHF)으로 시행하였다.

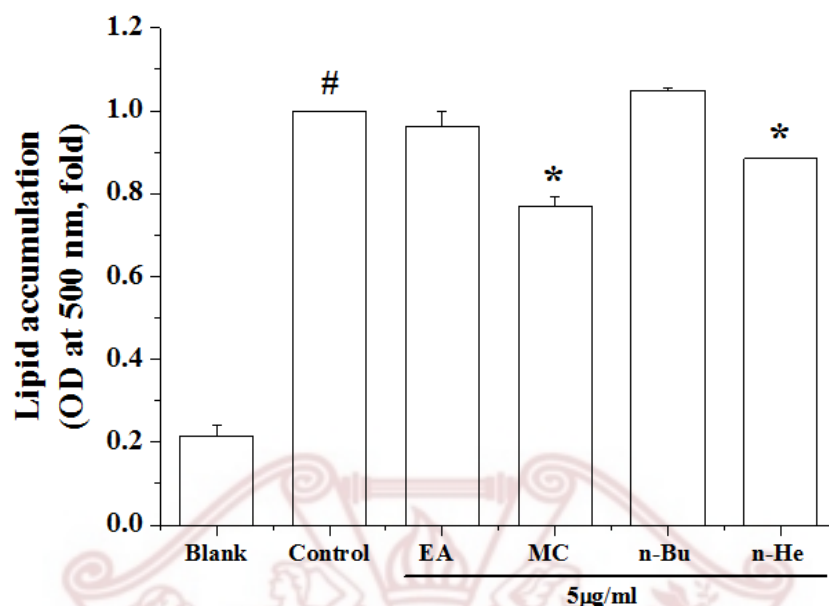


Figure. 2 Effects of ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol and n-hexane extract from the *Hoveniae Semen cum Fructus* on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or in the presence of ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol and n-hexane (5 $\mu\text{g/ml}$) for 6 days. Lipid droplets were measured by Oil Red O staining. All values are mean \pm S.E.M. # $p < 0.05$ versus undifferentiated control cells (Blank); * $p < 0.05$ versus differentiated control cells (Control). EA, ethyl acetate extract; MC, methylene chloride extract; n-Bu, n-butanol extract; n-He, n-hexane extract.

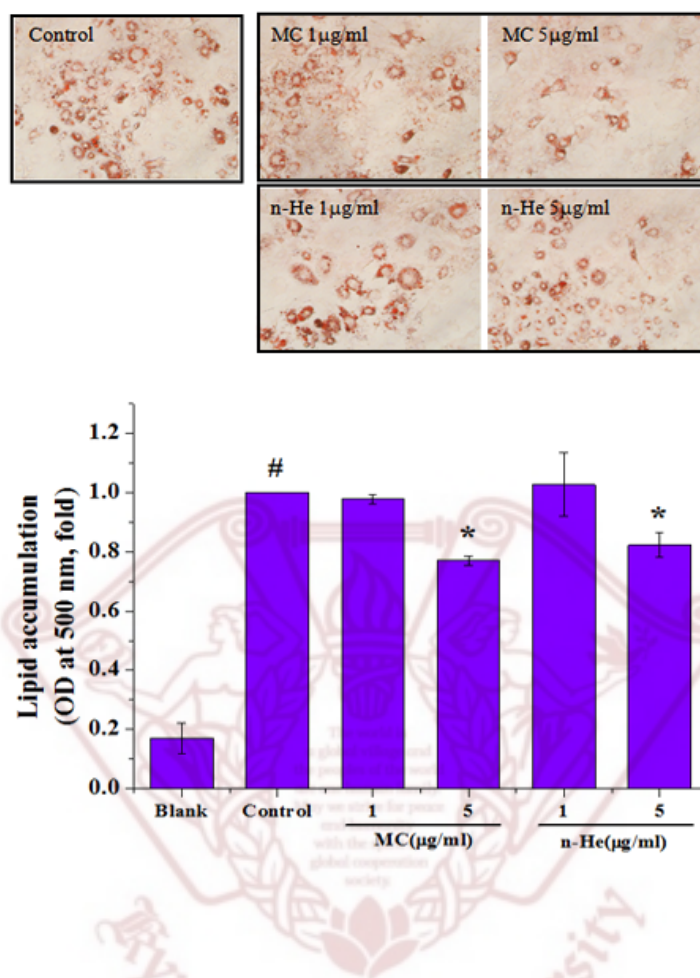


Figure. 3 Effects of methylene chloride and n-hexane extract from the Hoveniae Semen cum Fructus on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or in the presence of methylene chloride and n-hexane (1 and 5 µg/ml) for 6 days. Lipid droplets were measured by Oil Red O staining. All values are mean \pm S.E.M. [#] P < 0.05 versus undifferentiated control cells (Blank); ^{*} P < 0.05 versus differentiated control cells (Control). EA, ethyl acetate extract; MC, methylene chloride extract; n-Bu, n-butanol extract; n-He, n-hexane extract.

2) MHF의 지방세포 분화조절인자 유전자 발현 억제 효과

지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 adipogenesis 과정은 많은 종류의 adipogenic transcription factor들의 단계적인 조절에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있으며 이러한 분화과정에서 가장 핵심적인 역할을 하는 것이 PPAR γ 와 C/EBP α 이다. 이러한 전사인자들은 호르몬과 같은 분화유도물질에 의해 촉진되어 지방전구세포를 성숙지방세포로 분화시킨다. PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현은 상호작용을 통하여 세포 내 lipid droplet 생성 및 세포의 크기 증가 등과 같은 형태적 특징과 더불어 adiponectin과 aP2 및 FAS 등과 같은 adipocytokine과 adipogenic protein 발현에 중요한 역할을 한다³³⁾.

Real-time RT-PCR 실험 결과, 3T3-L1 지방세포에 MHF를 처리하여 지방세포 분화조절 인자인 PPAR γ , C/EBP α 의 유전자 발현 정도를 측정한 결과, MHF 5 μ g/ml의 농도에서 PPAR γ 와 C/EBP α 의 유전자 발현 억제 효과가 나타남을 확인 할 수 있었고(Fig. 4), 또한 aP2, adiponectin, resistin 역시 5 μ g/ml의 MHF에 의해 mRNA 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

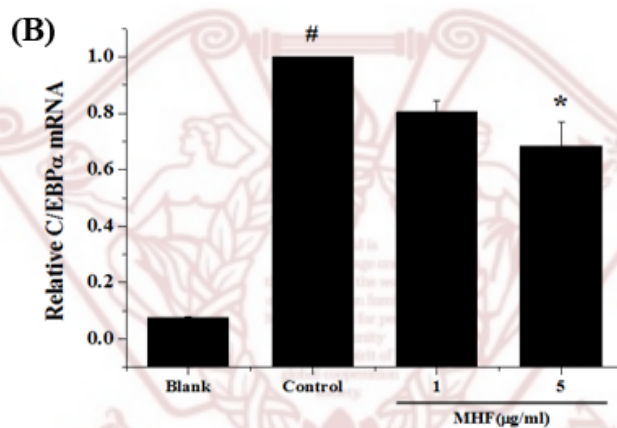
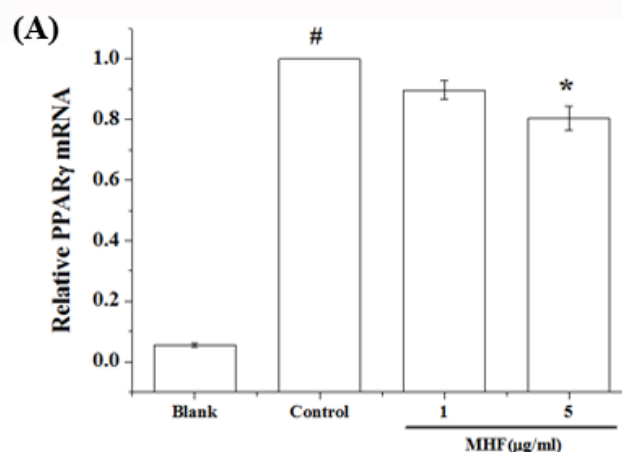


Figure. 4 Effect of MHF on mRNA expression of PPAR γ and C/EBP α during the differentiation in 3T3-L1 cells. Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or presence of MHF. (A) PPAR γ and (B) C/EBP α mRNA expressions were evaluated by quantitative real-time RT-PCR. All values are mean \pm S.E.M. # p < 0.05 versus undifferentiated control cells (Blank); * p < 0.05 versus differentiated control cells (Control). MHF, Methylene chloride extract from the Hoveniae Semen cum Fructus.

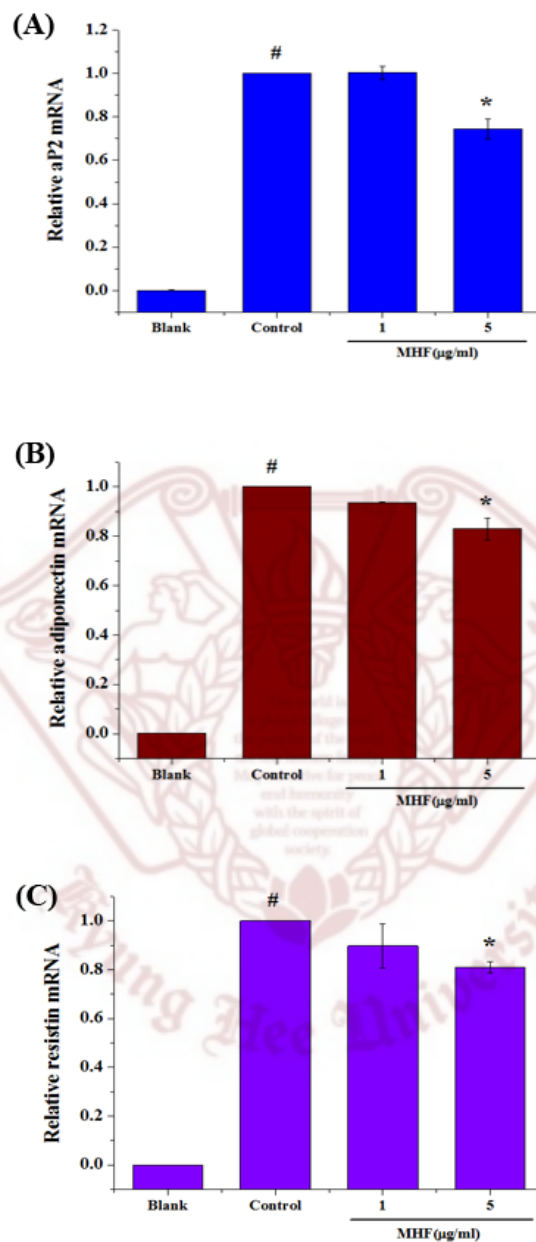


Figure. 5 Effect of MHF on mRNA expression of adipogenic factors during the differentiation in 3T3-L1 cells. Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or presence of MHF. (A) aP2, (B) adiponectin and (C) resistin mRNA

expressions were evaluated by quantitative real-time RT-PCR. All values are mean \pm S.E.M. $^{\#}p < 0.05$ versus undifferentiated control cells (Blank); $^{*}p < 0.05$ versus differentiated control cells (Control). MHF, Methylene chloride extract from the *Hoveniae Semen cum Fructus*.



3) MHF의 지방세포 분화조절인자 단백질 발현 억제 효과

3T3-L1 지방세포에 MHF를 처리하여 지방세포 분화조절 인자인 PPAR γ , C/EBP α , aP2, adiponectin, resistin의 단백질 발현 정도를 Western blot analysis를 통해 측정한 결과, 단백질 level에서도 역시 MHF에 의한 PPAR γ , C/EBP α , aP2, adiponectin, resistin 발현억제 효과를 확인하였고, 모든 인자에서 MHF 5 μ g/ml 에서 1 μ g/ml 보다 유의성 있게 발현이 억제됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 6, 7).



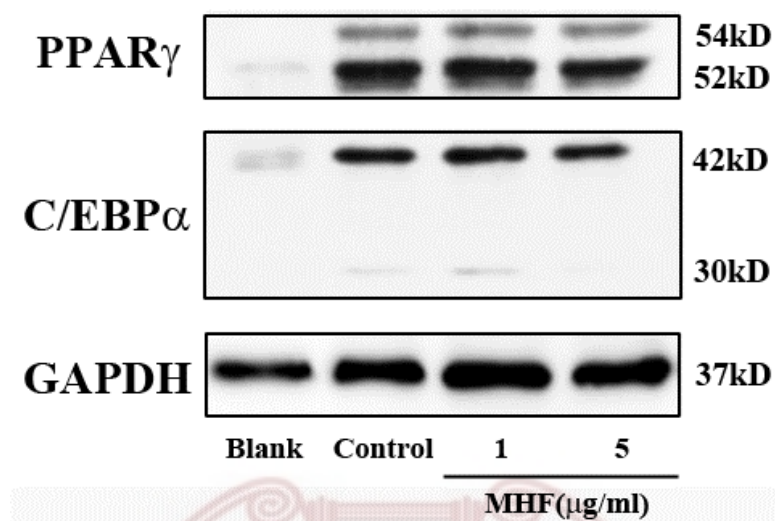


Figure. 6 Effect of MHF on protein expression of PPAR γ and C/EBP α during the differentiation in 3T3-L1 cells. Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or presence of MHF for 6 days. PPAR γ and C/EBP α protein expressions were analyzed by Western blot analysis. GAPDH was used as an internal control. Blank, undifferentiated control cells; Control, differentiated control cells; MHF, Methylene chloride extract from the *Hoveniae Semen cum Fructus*.

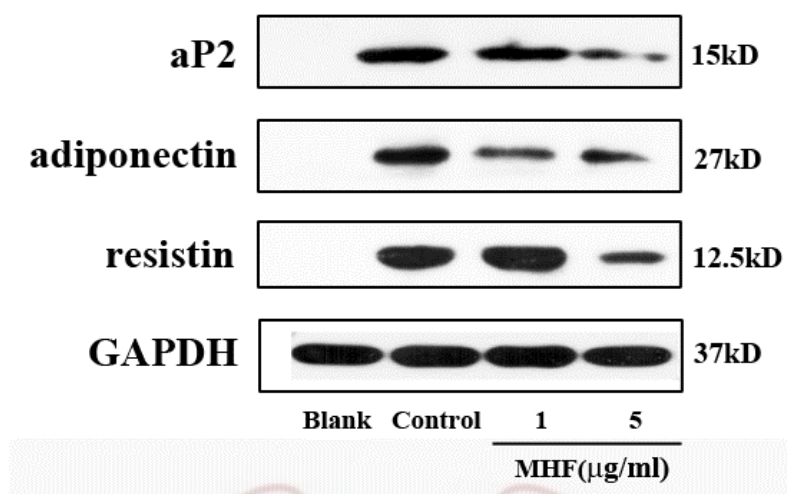


Figure. 7 Effect of MHF on protein expression of adipogenic factors during the differentiation in 3T3-L1 cells. Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or presence of MHF for 6 days. aP2, adiponectin and resistin protein expressions were analyzed by western blot analysis. GAPDH was used as an internal control. Blank, undifferentiated control cells; Control, differentiated control cells; MHF, Methylene chloride extract from the *Hoveniae Semen cum Fructus*.

IV. 고찰

비만은 신체 에너지대사의 불균형에 의해 지방세포에 잉여 에너지를 저장하게 되므로 여러 대사성 질환의 주요 병인으로 여겨지고 있다³⁴⁾. 한의학 문헌에 나타난 비만의 원인은 과식고량진미_{過食膏粱珍味}, 선천품수_{先天稟受}, 비위구허_{脾胃俱虛}, 기허_{氣虛}, 기결_{氣結}, 담성_{痰盛}, 내열_{內熱}로 볼 수 있고, 그 외에도 습_濕, 내상칠정_{內傷七情}을 들 수 있다³⁵⁾. 비만의 치료법으로 허증_{虛證}은 익기_{益氣}, 보신_{補腎}, 건비_{健脾}시키며, 실증_{實證}은 거습_{祛濕}, 화담_{化痰}, 활혈_{活血}, 이수_{利水} 하는 방법을 주로 활용하였다³⁶⁾. 2008년도 비만 치료를 위한 치료제의 작용기전별 특허 출원 동향을 살펴보면, 지방 등의 소화 흡수 저해제 24%, 지방세포분화 저해제 12%, 호르몬 조절제 10%, 열대사 촉진제 4%, 식욕 억제제 3%, 지방산 생성 억제제 2%, 혈관 신생 억제제 2% 등 생명공학 기술의 발달로 인하여 규명되는 다양한 비만 발생 기전을 바탕으로 새로운 비만 치료제를 개발하려는 연구가 진행되고 있다³⁷⁾. 비만 치료제에 대한 다양한 연구에도 불구하고, 현재 시판되고 있는 비만 치료제들의 부작용들이 알려지면서, 우수한 효능뿐만 아니라 안전성이 보장되는 물질의 개발이 여전히 요구되는 실정이다. 이에 특히 천연 물질로부터 부작용이 없는 항 비만 효능 보유 소재를 발굴하기 위한 많은 노력이 집중되고 있다³⁸⁻⁴⁰⁾.

지구자는 갈매나무과 식물의 껍지가 달린 육질이 있는 열매로, 성분으로는 포도당, calciummalate 등이 보고되었고, 목부는 hovenic acid 등을 함유한다고 보고되었다⁴¹⁾. 지구자는 지갈제번_{止渴除煩}, 청습열_{淸濕熱}, 해주독_{解酒毒}의 효능이 있으나, 맛은 감_甘하며, 성은 평_平하므로⁴²⁾, 부작용이 없어 한약재에서 치료제로 주로 이용되기 보다는, 민간에서 두루 활용되었던 약재이다. 이에, 한의학 문헌_{文獻} 상의

많은 방대한 정보가 수록되어 있지는 않지만, 이를 고찰해 본 바로는 헛개나무의 약용부위(藥用部位)의 차이에 따른 지구자(枳椇子), 지구근(枳椇根), 지구엽(枳椇葉), 지구목피(枳椇木皮), 지구목즙(枳椇木汁)의 효능(效能)이 다양(多樣)하다는 연구결과가 있으며, 그 중 지구자는 해주독(解酒毒)을 비롯하여, 지갈제변(止渴除煩), 청열(淸熱), 통리이변(通利二便)하는 효과가 있다고 알려져 있다²³⁾. 이로 미루어 지금 이러한 부작용이 없으면서 건강기능식품으로서의 활용도가 높은 물질의 항 비만 효과를 검증하는 과정이 필요한 시점이었다는 것을 알 수 있다. 그러나 아직까지는 지구자의 비만에 대한 연구가 거의 이루어지지 않은 실정인 바, 본 연구에서는 지구자의 다양한 추출 분획에서 지방 분화 억제 효과가 나타나는 지에 대한 여부를 in vitro 실험을 통해 규명하고자 하였다.

지구자의 열 추출물에서 항 비만 효과가 검증된 연구가 선행되었는데³⁰⁾, 본 연구에서는 지구자의 열수 추출 방식이 아닌 유기용매 추출방식을 통하여 3T3-L1 지방전구세포가 분화하는 단계에 처리하였을 경우, 분화억제 효과와 그 기전을 확인하고자 하였다. 본 실험에 사용한 3T3-L1 세포주는 분화된 3T3-L1 adipocytes가 in vivo adipocytes의 생화학적, 형태학적 성질들과 사실상 동일하다는 보고에 따라⁴³⁾, 지방대상의 효과를 판단하는 연구로 활용하는데 적절하다고 판단하여 3T3-L1 지방전구세포를 분화시켜 사용하였다. 본 실험에서는 지방에 특이 반응을 나타내는 Oil Red O 염색법을 이용하여 지구자 분획의 지방세포 분화 억제 효과를 조사하였다. 세포독성평가 실험은 MTS assay 기법으로 진행하였다. 그 결과에 따라 methylene chloride와 n-hexane 분획 각각 1 µg/ml 과 5 µg/ml에서 실험을 진행하였다. 지구자의 methylene chloride와 n-hexane 분획의 다양한 농도에서 지방세포분화억제 효과를 관찰한 결과, n-hexane 분획에 비하여 methylene chloride 분획이 지방세포 분화를 가장 효과적으로 억제하였다. 따라서, MHF는 3T3-L1 지방세포 분화

유도과정에서 농도 의존적으로 지방량 축적 정도를 유의성 있게 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

비만은 지방전구 세포의 분화 및 adipogenesis 과정에 의하여 지방세포내의 중성지방 축적으로 발생되며, 지방세포의 형성과정에 관여하는 주요 전사인자로는 PPAR γ 와 C/EBP α 가 있다^{44),45)}. 지방전구세포인 3T3-L1 cell은 분화가 진행될수록 지방 생성에 관여하는 여러 가지 호르몬과 지방세포 특이적 단백질 및 지방세포 분화와 관련된 전사인자(transcription factor)가 발현되는데 lipid droplet 형성이 증가하면서 중성지방이 증가하고 지방축적에 관여하는 효소가 활성화하면서 점차적으로 세포 내 지방 축적이 일어나게 된다⁴⁶⁾. 이 전사인자들은 지방세포 분화과정 중 각기 다른 시점에서 발현이 유도되며, 상호작용을 통하여 지방수송, 합성, 축적과 관계되는 지방세포 특정 유전자인 aP2를 발현시킨다⁴⁷⁻⁴⁹⁾. 지방세포 분화가 유도되는 동안 PPAR γ 와 C/EBP α 등의 전사인자들의 발현이 증가되어 지방세포의 표현형을 결정짓는 유전자들을 조절하거나 그 발현을 활성화시킨다^{50),51)}. C/EBP α 는 지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 과정 중 지방 생성의 관여에 중요한 역할을 하는 전사인자이다. PPAR γ 와 마찬가지로 지방세포의 후기 분화과정에 중요한 역할을 하는 전사인자이며 과다 발현할 경우 과다한 지방세포 형성을 유도하는 역할을 한다⁵²⁾. PPAR γ 역시 지방세포의 전사조절분자 중의 하나이다. 이는 지방세포의 분화 및 지방합성과 저장에 관여하는 효소들의 발현을 조절하는 역할을 하는데⁵³⁾, 전사인자들의 하위 유전자들로는 acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase(FAS), aP2 등이 있으며, 이 중 FAS와 aP2는 지방합성과 지방수송에 관여하여 lipid droplet 및 중성지방의 생성을 촉진시킨다⁵⁴⁾.

본 논문에서는 MHF의 항비만 효과를 규명하기 위하여 지방생성에 관여하는 전사인자와 하위 유전자들의 변화를 관찰하였다. Adipogenic transcription의 주요 인자인 PPAR γ , C/EBP α , aP2, adiponectin, resistin의 발현에 대한 MHF의 분화 억제를 확인하기 위해 mRNA 및 단백질 발현량을 확인하였다. 지구자의 약리를 증명한 연구는 실제 다양하지는 않으나, 실험에 이용될 경우에는 물 추출 방식이 주로 이용되었고^{30),55)}, 이에 본 연구에서는 유기용매 추출 방식을 택하게 되었다. 한약재의 지방세포의 분화를 억제하는 효과를 밝히기 위하여 C/EBP α 나, PPAR γ 의 발현을 측정하는 실험을 통하여 효과가 입증된 약물로는, 비술나무, 뽕대추나무, 양강, 편축 등이 있다⁵⁶⁻⁵⁹⁾. 스트레스가 과다하여 간기능이 지속적으로 부담 받게 되는 현대인들에게는 지구자가 적합한 약물로 평가될 수 있으며, 또한, 탁월한 비만 억제 효과가 증명된 만큼, 그 활용이 광범위 할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 MHF가 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제하고 지방세포 분화와 관련된 전사인자의 활성을 억제함으로써, 지구자의 비만 치료에 대한 활용 가능성을 확인할 수 있었다. 추후에는 지방세포의 활성을 억제시키는 경로뿐만 아니라 혈중 지질 조절의 작용에 관여하는 다양한 반응 경로에 대한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 보인다. 본 연구에서 이용된 MHF의 보급 및 상품화를 추진하기 위해서는 동물실험 등의 추가연구가 뒷받침 되어, 효과의 안전성이 검증되고, 추가적인 약성을 더욱 구체적으로 규명할 수 있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

지구자의 항 비만 효과를 확인하기 위하여, 3T3-L1 지방전구세포에 처리하여 Oil-Red-O, real-time RT-PCR, Western blot 등의 방법을 통해 지방세포분화 조절인자 발현을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 지구자의 ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol, n-hexane 추출 분획은 약물처리 농도에서 세포 독성이 없다.
2. 지구자의 methylene chloride와 n-hexane 추출 분획은 지방세포의 지방 축적을 유의성 있게 억제한다.
3. 3T3-L1 지방세포에서 지구자 methylene chloride 분획은 지방세포분화 관련인자인 PPAR γ , C/EBP α , aP2, adiponectin, resistin의 mRNA 및 단백질 발현을 유의성 있게 억제한다.

이러한 결과로, 지구자의 3T3-L1 지방세포에서 항 비만 효과를 입증하였으며 지방억제제로 유효하게 활용 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Spiegelman BM, Flier S. Adipogenesis and obesity rounding out the big picture. Cell. 1996;87:377-389.
- 2) Gwakaechun. Canon of Medicine: Tianjin Science and Technology Publishing; 1981.
- 3) Heo SY. Oriental and Western Medical Study on the investigation and treatment of Obesity. J Ori Rehab Med. 1997;7:272-286.
- 4) Haslam D. Obesity:a medical history. Obes Rev. 2007;8 Suppl 1:31-36
- 5) Huh KB. Symposium:Recent progress in obesity research:pathogenesis of obesity. Kor J Soc Food Sci Nutr. 1990;23:333-336.
- 6) Sjostrom L, Lonn L, chowdhury B, grangard LL, Sjostrom D and Sullivan L. The sagittal diameter is a valid maker of the visceral adipose tissue volume. J Progress obes. 1994;7:309-319.
- 7) Sjostrom LV. Morbidity of severely obese subject. American J Clinical Nutrition. 1992;55:508-513
- 8) McGee DL. Body mass index and mortality:A meta-analysis based on person-level data from twenty-six observational studies. Ann Epidemiol. 2005;15:377-398
- 9) Vivero Le. A close look at fenfluramine and dexfenfluramine. J Emerg Med. 1998;16:197-205.
- 10) Pack HS. Pharmacological Therapy of Obesity. Kor J Soc Study Obes.

2001;10:118-127.

- 11) Kim YS. The Update of Anti-obesity Drug. Kor Endocrine Soc. 2001;16:9-15.
- 12) Yee ST and Chang Sh. The effect of Korean mistletoe extract M11C on IL-1 release and expression from macrophages. β Immune Network. 2001;2:170-178.
- 13) Kim HP, Son KH and Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. J Pharm Sci. 2004;96:229-245.
- 14) Koutnikova H and Auwerx J. Regulation of adipocyte differentiation. Ann Med. 2001;33:556-561.
- 15) Rosen ED and Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2000;16:145-171.
- 16) Chen HC and Farese RV. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity: lessons from DGAT1-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:482-486.
- 17) Morrison RF and Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. J Nutr. 2000;130:3116S-3121S.
- 18) Ntambi JM and Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. J Nutr. 2000;130:3122S-3126S.
- 19) Fox KE, Fankell DM, Erickson PF, Majka SM, Crossno JT and Klemm DJ. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. J Biol Chem. 2006;281:40341-40353.

- 20) Schroeder-Gloeckler JM, Rahman SM, Janssen RC, Qiao L, Shao J, Roper M, Fischer SJ, Lowe E, Orlicky DJ, McManaman JL, Palmer C, Gitomer WL, Huang W, O'Doherty RM, Becker TC, Klemm DJ, Jensen DR, Pulawa LK, Eckel RH and Friedman JE. CCAAT/enhancer-binding protein beta deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in *Lepr(db/db)* mice. *J Biol Chem.* 2007;282:15717-15729.
- 21) Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR and Darlington GJ. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science.* 1995;269:1108-1112.
- 22) 鄭普燮, 辛民教. 圖解鄉藥(生藥)大辭典: 永林社; 1990. P.291-292.
- 23) 서부일, 김봉현, 변준석. 지구자 및 관련 한약재에 관한 고찰. *동서의학.* 1998;23(3):21-31.
- 24) 蘇敬. 新修本草: 上海古籍出版社; 1985. P.149-150.
- 26) 冉善德. 中華藥海: 哈爾濱出版社; 1993. P.(上)1652-1653, (下)236-1237.
- 25) 孟詵. 食療本草(養生妙方): 巴蜀書社; 1993. P.72.
- 27) 唐慎微. 重修政和經史證類備用本草: 大星文化社; 1993. P.353-354
- 28) Kim TJ. Korean Resources Plants: Seoul National University Press, Seoul, Korea; 1996.
- 29) Hase K, Ohsugi M, Xiong Q, Basnet P, Kadota S, and Namba T. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* Thunb. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine / lipopolysaccharide. *Biol Pharm Bull.*

1997;20:381-385.

- 30) Ko BS, Jang JS, Hong SM, Kim DW, Sung SR, Park HR, Lee JE, Jeon WK and Park S. Effect of New Remedies Mainly Comprised of *Hoveniadulcis* Thunb. on Alcohol Degradation and Liver Protection in Sprague Dawley Male Rats. J Korean Soc Food Sc Nutr. 2006;35:828-834.
- 31) Ma JY and Kim SW. Effect of Hovenia dulcis on liver protection in SD male rats treated with CCl₄. Korean Joriental med. 2006;12:103-109.
- 32) Kim HL, Sim JE, Choi HM, Choi IY, Jeong MY, Park J, Jung Y, Youn DH, Cho JH, Kim JH, Hwang MW, Jin JS, Hong SH, Cho HW and Um JY. The AMPK pathway mediates an anti-adipogenic effect of fruits of Hovenia dulcis Thunb. Food Funct. 2014;22;5:2961-2968
- 33) Cowherd RM, Lyle RE and McGehee RE Jr. Molecular regulation of adipocyte differentiation. Semin Cell Dev Biol. 1999;10:3-10.
- 34) Bray MS. Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. American J Applied Physiology. 2000;88:788-792
- 35) 전국한 의과대학 재활의학교실. 동의재활의학과학: 서원당; 1995. P.570-571.
- 36) Jo HG and Kim BT. Causes and treatment of obesity and literature review on stage. Korea Inst Sci Technol Inform. 1992;1:61-71.
- 37) Korean Intellectual Property Office (특허청). 2008
- 38) Kim HJ, Kang CH and Kim SK. Anti-adipogenic effect of Undaria pinnatifida extracts by ethanol in 3T3-L1 adipocytes. J Life Sci. 2012;22: 1052-1056.
- 39) Park JA, Park C, Han MH, Kim BW, Chung YH and Choi YH. Inhibition of

- adipocyte differentiation and adipogenesis by aged black garlic extracts in 3T3-L1 preadipocytes. *J Life Sci.* 2011;21:720-728.
- 40) Suzuki R, Tanaka M, Takanashi M, Hussain A, Yuan B, Toyoda H and Kuroda M. Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway. *Nutr Metab (Lond).* 2011;8, 14.
- 41) 김재길. 동양천역약물원색도감: 영림사; 1995. P.289.
- 42) 吳儀洛. 本草從新: 상해과학기술출판사; 1983. P.166.
- 43) MacDougald OA, Hwang C, Fan H and Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Science.* 1995;92:9034-7
- 44) Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006;4:263-273.
- 45) Gregoire FM, Smas CM and Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1988;78:783-809.
- 46) Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA and Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27:875-88.
- 47) Rosen ED and Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:145-171.
- 48) Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P and Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:1293-1307.
- 49) MacDougald OA and Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression

- during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem.* 1995;64: 345-373.
- 50) Reusch JE, Colton LA and Klemm DJ. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol.* 2000;20:1008-1020.
- 51) Otto TC and Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2005;40:229-242.
- 52) Freytag SO, Paielli DL and Gilbert JD. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev.* 1994;8:1654-1663.
- 53) Rossen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS and Spiegelman BM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 1999;4:611-617.
- 54) Park SJ, Lee IS, Lee SP and Yu MH. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by supercritical fluid extracts and marc from *Cinnamomum verum*. *J Life Sci.* 2013;23:510-517.
- 55) Lim JP, Choe H and Sung JM. Effect of Fruits of *Hovenia Dulcis* Thunb. on Learning Ability of Ethanol-induced Rats. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2003;11:232-235.
- 56) Ghosh C, Chung HY, Nandre RM, Lee JH, Jeon TI, Kim IS, Yang SH and Hwang SG. An active extract of *Ulmus pumila* inhibits adipogenesis through regulation of cell cycle progression in 3T3-L1 cells. *Food Chem Toxicol.* 2012;Jun;50(6):2009-15.

- 57) Kubota H, Morii R, Kojima-Yuasa A, Huang X, Yano Y and Matsui-Yuasa I. Effect of Zizyphus jujuba extract on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. Am J Chin Med. 2009;37(3):597-608.
- 58) Jung CH, Jang SJ, Ahn J, Gwon SY, Jeon TI, Kim TW and Ha TY. Alpinia officinarum inhibits adipocyte differentiation and high-fat diet-induced obesity in mice through regulation of adipogenesis and lipogenesis. J Med Food. 2012 Nov;15(11):959-67.
- 59) Sung YY, Yoon T, Yang WK, Kim SJ, Kim DS and Kim HK. The Antiobesity Effect of Polygonum aviculare L. Ethanol Extract in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:626397.



ABSTRACT

The study on anti-obesity effect of Hoveniae Semen cum Fructus. extract fractions

by Jung Eun Sim

Department of Biological Sciences of Korean Medicine

Graduate School of Kyung Hee University

Advised by Prof. Jae-Young Um, Ph.D. and Prof. Hyeung-Jin Jang, Ph.D.

This study was designed to investigate the anti-obesity effect of Hoveniae Semen cum Fructus which is known as a treatment for liver disease by detoxifying agents of alcohol poisoning. The anti-obesity effect of various fractions from Hoveniae Semen cum Fructus (the fruits of *Hovenia dulcis* Thunb.) was examined in 3T3-L1 preadipocytes. Lipid accumulation level was measured by Oil red O staining method for ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol and n-hexane fractions of Hoveniae Semen cum Fructus. Among them, methylene chloride extract from the Hoveniae Semen cum Fructus (MHF) was remarkably effective for the attenuation of 3T3-L1 adipocytes differentiation. To verify the result, regulatory factors of 3T3-L1 adipocytes differentiation were examined at mRNA and Protein levels. As a result, MHF significantly down-regulated the expressions of the peroxisome proliferator-

activated receptor- γ , CCAAT/enhancer-binding protein α , adipocyte fatty acid-binding protein 2, adiponectin and resistin in both mRNA and protein levels. These results indicate that MHF has a significant anti-obesity effect and suggest that the MHF may be useful for weight management.



국문 초록

지구자 추출물 분획의 항 비만 효과 연구

심정은

한의생명과학과

경희대학교 대학원

지도교수 엄재영, 장형진

지구자(枳椇子)는 헛개나무 열매로, 알코올 분해 및 간기능 회복에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 지구자(*Hoveniae Semen cum Fructus*) 추출분획물의 비만에 대한 효과를 백색지방전구세포(3T3-L1 preadipocytes)를 통해서 확인하였다.

지구자를 ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol, n-hexane 용매로 추출분획하여 실험을 진행하였으며, 분화 억제 정도를 Oil Red O 측정법을 통하여 확인하였다. 그 결과, 지구자의 methylene chloride, n-hexane 분획에서 유의성 있는 지방축적 억제 효과를 볼 수 있었다. 이 두 용매 추출 분획 중에서 더욱 지방 축적 억제효과가 탁월한 methylene chloride 분획(methylene chloride extract from the *Hoveniae Semen cum Fructus*, MHF)에 대하여 이후 실험을 진행하였다. 3T3-L1 지방전구세포에서 MHF의 지방세포분화 관련인자들의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, MHF가 peroxisome proliferators activated receptor γ , CCAAT/enhancer-binding protein α , aP2, adiponectin, resistin을 포함한 지방세포 분화조절인자를 억

제함을 mRNA 발현과 단백질 발현 측정을 통해 확인하였다. 본 연구는 MHF가 백색지방세포의 분화 조절을 통해 항 비만 효과를 나타냄을 확인하였고, 천연물질이자 건강 기능 식품으로서의 지구자의 항 비만 치료제에 대한 새로운 가능성을 제시할 수 있다.

