

## 추출조건에 따른 배암차즈기 추출물의 지방세포 분화 및 지방축적 억제 효과

최수임\*† · 곽호영\* · 김재윤\* · 최종길\* · 이제혁\*\*

\*㈜와이디생명과학연구소, \*\*공주대학교 식품영양학과

### Antiadipogenic Effects of *Salvia plebeia* R. Br. Extracts by Extraction Conditions in 3T3-L1 Preadipocytes

Soo Im Choi\*†, Hoyoung Kwak\*, Jae Yoon Kim\*, Jong Gil Choi\* and Je Hyuk Lee\*\*

\*YD Life Science Research Institutes, YD Life Science Co. Ltd., Seongnam 462-807, Korea.

\*\*Department of Food and Nutrition, Kongju National University, Yesan 340-802, Korea.

**ABSTRACT :** This study was carried out to investigate the effects of *Salvia plebeia* R. Br. ethanolic extract with different aspects (stem/leaf and whole plant) on differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. The morphological changes and the degrees of lipid accumulation in 3T3-L1 cells were measured by Oil Red O staining and intra-cellular triglyceride (TG) assay. The mRNA expressions of special peroxisome proliferation activated receptor- genes (PPAR), CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP $\alpha$ ), fatty acid synthase (FAS) and lipoprotein lipase (LPL) were detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The 50% ethanolic extracts (100  $\mu$ g/mL) of stem and leaf (SALE) and 30% ethanolic extracts (100 g/mL) of whole plant (SAE) from *Salvia plebeia* R. Br. were significantly attenuated lipid accumulation during adipogenesis in 3T3-L1 cells. Ethyl acetate-soluble fractions (50  $\mu$ g/mL) significantly inhibited lipid droplet accumulation in 3T3-L1 cells. In addition, SALE induced down-regulation of specific adipogenic transcriptional factors (C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$ ) and target genes (FAS and LPL) during adipogenesis. *Salvia plebeia* R. Br. may be used as a safe and efficient natural substance to manage obesity.

**Key Words :** *Salvia plebeia*, 3T3-L1, Adipogenesis, C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , FAS, LPL

## 서 언

비만 (Obesity)은 에너지 섭취와 소비의 밸런스 조절기능의 이상으로 지방조직이 과다하게 축적되어 각종 질병의 이환율과 사망률을 높이는 대사성 만성질환으로 지방 대사와 당 대사에 불균형을 초래하여 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 당뇨병, 지방간, 관절 이상 등 각종 대사성 질환, 심혈관계 질환 및 암을 유발하는 직접적인 상관관계를 보이는 것으로 밝혀져 그 심각성이 세계적으로 대두되고 있다 (Leung *et al.*, 2003). 세계보건기구 (WHO)의 보고에 따르면, 2008년 20세 이상 성인 중 5억 명이 비만으로, 세계 성인 인구의 11%에 달하는 숫자이며, 2015년에는 15억 명으로 증가할 것이라 예측된 바 있다 (World Health Organization, 2013).

비만은 지방전구세포의 분화 및 지방생성 (adipogenesis) 과정에 의하여 섭취한 영양소를 중성지방 (triglyceride)의 형태로 지방세포에 축적되어 발생한다. 미분화 지방전구세포 (preadipocyte)가 성숙한 지방세포 (matured adipocyte)로 분화되는 과정은 세포의 형태, 호르몬 민감성 변화, 유전자 및 단백질의 발현 등을 수반하며, CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)과 peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )를 중심으로 adipogenesis를 조절하면서 분화가 진행되는 것으로 알려져 있다 (Morrison and Farmer, 2000). 또한 지방세포 내의 지방구 (lipid droplet) 내에 주로 존재하고 있는 triglyceride의 분해와 이로 인한 glycerol의 유출은 세포 내 지방의 축적을 조절하는 중요한 기작으로 보고되고 있다 (Fraysn *et al.*, 2003). 따라서 이러한 기작 조절을 기반으로 비만 예방

†Corresponding author: (Phone) +82-2-6959-5665 (E-mail) si.choi@ydgls.com

Received 2015 March 2 / 1st Revised 2015 April 2 / 2nd Revised 2015 April 17 / 3rd Revised 2015 May 1 / Accepted 2015 May 4

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

및 치료를 위한 세포 내 지방의 축적을 예방하거나 축적된 지방을 분해하도록 자극하는 방안에 관한 연구가 최근 주목을 받고 있다 (Kim *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012).

비만조절 요법 중 약물 치료제인 sibutramine과 orlistat 제제의 부작용이 보고되면서 안전성과 유효성이 입증된 치료제 개발의 필요성이 절실한 실정이며 최근 안전성이 확보된 천연물로부터 항비만 효능을 보유한 소재 발굴과 그에 대한 연구가 다수 진행되고 있다. 항비만 활성의 생물학적 연구를 위해 mouse embryo로부터 유래된 지방전구세포인 3T3-L1 세포에 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone, insulin 등의 MDI 분화유도인자를 사용하는 연구가 주를 이루고 있고 (Jessen and Stevens, 2002), 이에 대한 각종 천연물 추출물의 항비만 연구가 최근까지 보고되고 있다 (Kim *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2014).

배암차즈기 (*Salvia plebeia* R. Br.)는 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 일년생 또는 이년생 직립초목으로 우리나라 전 지역에서 자생한다. 설건초, 나인초, 수양이(水羊耳), 과송청(過冬靑)이라고도 하며 경엽 (어린잎)은 식용으로 이용되고 있으며, 한 방에서는 향기로운 가지가 달린 풀이라 하여 여지초 (枝草)라 불리며 약용으로 사용된다. 예로부터 기침, 천식, 간염, 설사, 염증 등에 대한 효과가 알려져 있다 (Lim *et al.*, 2007). 주요 성분으로 flavonoid, polyphenol, saponin, 강심배당체, 불포화 스테롤, 정유 등이 있으며 종자의 지방유 등이 보고되어 있다 (Shin *et al.*, 2001). 현재 배암차즈기 추출물에 대한 항산화, 항균, 항알레르기, 항염증, 콜레스테롤 유출 촉진 효과 등이 보고되어 있다 (Jo *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2012; Park, 2003). 또한 배암차즈기의 flavonoid 성분인 hispidulin은 AMPK 활성화를 유도하여 난소암에서 apoptosis를 일으키며 (Yang *et al.*, 2010), glioblastoma multiforme 뇌종양 세포에서 mTOR 억제 및 p21을 유도기전으로 암세포 증식을 억제하는 것으로 보고되어 있다 (Lin *et al.*, 2010).

이에 본 연구에서는 배암차즈기 경엽 (지상부)과 전초의 주정 및 용매분획물에 대한 지방세포분화 및 지방축적 억제 효능을 비교 측정하였고 비만관련 기능성 소재 또는 식품첨가물로써의 가능성을 확인하였기에 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 재료

본 실험에 사용한 mouse embryonic fibroblast 3T3-L1 지방전구 세포주는 American type culture collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 및 fetal bovine serum (FBS), calf serum, penicillin-streptomycin,

trypsin-EDTA는 Gibco® (Waltham, MA, USA)사에서, insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthin, Oil red O, formalin, dimethyl sulfoxide (DMSO)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포 생존율 측정은 Promega (Madison, WI, USA)사의 MTS 시약 (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)을 이용하였으며, 중성지방 측정은 아산제약 (Seoul, Korea)의 Cleantech TG-S 제품을 구입하여 사용하였다. RNA 분리 및 RT-PCR을 위한 Trizol reagent는 Invitrogen Life Technologies (Waltham, MA, USA), Maxime RT PreMix Oligo dT 및 Maxime PCR PreMix i-StarTaq는 IntronBio (Seongnam, Korea)에서 구입하였고, Oligo-nucleotide (primer)는 Bioneer (Deajeon, Korea)에서 제작하여 사용하였다. 또한 시료 추출 및 분획물 제조 등에 사용한 시약 및 용매는 일급 또는 특급으로 (주)SCI international (Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 배암차즈기 주정추출물 및 분획물 제조

본 실험에 사용된 배암차즈기 (*Salvia plebeia* R. Br.)는 경기도 여주 농가에서 재배된 것으로 경엽 지상부와 전초를 각각 4월 초와 6월 중순에 수확하여 음지에서 건조한 것을 시료로서 사용하였다. 실험에 사용된 배암차즈기 경엽 표본 (GC-Y-201404)과 전초 표본 (GC-O-201406)은 (주)와이디생명과학 기업부설 연구소에 보관되어 있다. 경엽지상부와 전초는 이물질 제거 및 수세 후 열풍건조하였다. 배암차즈기의 생육시기에 따른 최적 추출용매를 확보하기 위해 건조된 경엽 지상부와 전초를 각각 100 g씩 추말 세절한 다음 각각 10배의 30, 50, 70, 95% (v/v) 주정용매에 침적하여 상온에서 24시간동안 침적추출 하였다. 추출물은 여과하여 여액과 잔사를 얻었고, 잔사를 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출 및 여과하여 최종 배암차즈기의 경엽 지상부 주정추출물 (SALE) 및 전초 주정추출물 (SAE)을 얻었다. 전초 시료의 극성에 따른 용매 분획물을 확보하기 위해 95% 주정추출물 100 g을 증류수에 완전히 현탁시킨 후 용매극성에 따라 *n*-hexane (Hex), methylene chloride (MC), ethyl acetate (EA), *n*-butanol (BuOH)으로 순차분획을 실시하여 전초 용매분획물을 확보하였다. 각각 얻어진 추출물 및 분획물은 감압 농축 및 동결 건조하여 수율을 확인하였고 -20°C 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

### 3. 3T3-L1 지방전구세포 배양 및 세포 독성 시험

3T3-L1 지방전구세포를 DMEM 배지 (10% calf serum, 100 units/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin)에 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 75% confluence가 되도록 배양한 후, 0.25% (w/v) trypsin-0.53 mM EDTA 용액으로 처리하여 2~3일 간격으로 계대배양하여 실험에 사용하였다. 3T3-L1 세

**Table 1.** Oligo-nucleotide sequences and conditions for RT-PCR.

Gene code	Accession ID		Sequence (5' → 3')	Tm (°C)	Product length (bp)
PPAR $\gamma$	NM_001127330.1	Forward	GGCTGAGGAGAAGTCACACT	55	258
		Reverse	ATCACGGAGAGGTCCACAGA		
C/EBP $\alpha$	NM_001287514.1	Forward	TCGGTGCCTAAGATGAGG	55	176
		Reverse	TCAAGGCACATTTTTGCTCC		
LPL	NM_007988.3	Forward	CAAGTGCCACCAACAAGCG	60	120
		Reverse	GGAGCCGAGGATAGACTCAC		
FAS	NM_008509.2	Forward	TGCCGCTGTTTTGTTTTACC	53	546
		Reverse	TCACAGTTTCTGCTCCCAGC		
GAPDH	NM_001289726.1	Forward	TAAGAGGGATGCTGCCCTTAC	57	302
		Reverse	GATGGGCTTCCCGTTGATGA		

포에 대한 세포생존율은 MTS 검정법으로 측정하였다. 96 well plate에  $2 \times 10^6$  cells/mL로 분주하여 배양한 3T3-L1 세포에 각각의 주정추출물 및 용매분획물을 10~100  $\mu$ g/mL로 처리하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양하였다. 시료를 처리한 각각의 well에 MTS 시약을 첨가하여 2시간 반응 후 분광기를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다.

**4. 3T3-L1 지방전구세포의 분화 유도 및 Oil Red O 염색**

미분화된 3T3-L1 지방전구세포의 분화유도를 위해 6-well plate에 세포가 confluent 상태가 되도록 동일한 조건에서 배양하고 48시간 후에 분화유도배지 (MDI; 10% FBS, 0.5 mM IBMX, 0.25  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/mL insulin가 포함된 DMEM)로 교환하여 지방전구세포의 분화를 유도 (D0)하였다. 분화유도 2일째 (D2)와 5일째 (D5)에 각각 10  $\mu$ g/mL insulin이 포함된 분화유도 배지로 교환하여 지방전구세포의 분화를 촉진하였고 8일째까지 분화시켰다. 배암차즈기 추출물의 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 효능을 확인하기 위해 지방전구세포 분화 시에 형성된 지방과립의 함량을 Oil Red O 염색법 (Jeong *et al.*, 2014)을 이용하여 측정하였다. 각각의 배암차즈기 주정 추출물 및 분획물은 배지에 각각 100  $\mu$ g/mL의 농도로 녹여 처리하였고, 배지만 처리한 것을 대조군 (MDI)으로 하였다. 세포분화 후 배지는 제거하고 PBS로 3회 세척한 후 10% formalin 용액으로 상온에서 1시간 동안 지방세포를 고정시켰다. 60% isopropyl alcohol로 세척한 후 Oil Red O 용액으로 실온에서 30분간 염색하고 PBS로 세척한 후 현미경으로 지방세포의 염색정도를 관찰하였다. Isopropyl alcohol을 사용하여 염색된 지방을 용해하고 540 nm의 흡광도를 측정 후 생성된 지방과립의 함량을 분석하였다.

**5. 3T3-L1 지방세포 내 중성지방 함량 측정**

3T3-L1 세포를 분화유도시킨 후 세포에 축적된 중성지방

(triglyceride, TG) 함량을 TG assay kit을 이용하여 정량법에 따라 측정하였다. 3T3-L1 세포분화 후 배지를 제거한 후 PBS로 세척하고 1 mM EDTA가 포함된 25 mM Tris buffer (pH 7.5)를 이용하여 lysis 시킨 후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액만 취하여 Cleantech TG-S 시약을 첨가하여 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 중성지방의 함량은 중성지방 표준용액곡선을 이용하여 환산하였으며, 이때 단백질 양을 Bradford (1976) 방법으로 정량하여 세포수를 보정하였다.

**6. RT-PCR (Reverse-transcription polymerase chain reaction) 분석**

3T3-L1 세포를 분화유도 시킨 후 8일째에 세포를 회수하였고 세포 내 총 RNA는 Trizol reagent를 이용하여 분리하였다. cDNA 합성 및 RT-PCR은 Maxime RT PreMix Oligo dT와 Maxime PCR PreMix i-StarTaq을 이용하여 수행하였다. RT-PCR에 사용된 oligo-nucleotide의 염기서열과 annealing temperature (Tm)은 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 pre-denaturation; 95°C, 10분, denaturation; 95°C, 30초, annealing; 55~50°C, 30초, elongation; 72°C, 1분, final-elongation; 72°C, 5분으로 35 cycles 실시하였고, 반응물은 2% agarose gel에 전기영동한 후, EtBr 염색하여 UV transilluminator (UVP ChemiDoc-It, Upland, CA, USA)로 band를 관찰하였고, 정량적 분석은 VisionWorksLS (version 7.1) 프로그램을 이용하여 측정하였다.

**7. 통계분석**

본 실험 결과는 Graphpad Prism® Version 4.0 (Graphpad Software, USA) 프로그램을 이용하여 평균 (mean) ± 표준편차 (standard deviation, SD)로 표시하였다. 통계적 유의성은 One-way ANOVA로 분석한 후, Tukey's multiple comparison test로  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

**Table 2.** Cytotoxicity of ethanolic extract and solvent fraction from *Salvia plebeia* R. Br. on 3T3-L1 preadipocytes.

		Yield (%, Dry basis)	Cell viability (IC <sub>50</sub> , µg/mL)
SALE** Ethanolic extract	30%	17.6 ± 2.3	> 200
	50%	17.2 ± 3.1	> 200
	70%	18.6 ± 1.2	> 200
	95%	16.5 ± 2.6	149.1*
SAE*** Ethanolic extract	30%	22.7 ± 3.0	> 200
	50%	23.9 ± 1.3	> 200
	70%	21.5 ± 2.4	> 200
	95%	19.5 ± 1.4	> 200
Solvent fraction****	<i>n</i> -Hexane	74.5 ± 2.1	92.36*
	Methylene chloride	2.54 ± 1.2	77.23*
	Ethyl acetate	3.56 ± 2.0	> 200
	<i>n</i> -Butanol	4.33 ± 2.6	> 200
	Water	12.91 ± 1.8	> 200

3T3-L1 preadipocytes were incubated for 24 h in culture medium with ethanolic extract and solvent fraction from *Salvia plebeia* R. Br. Cell viability was determined by MTS assay. Wells containing incubation media without sample were used as control. Values are expressed as percentage of the viability of control. Data were expressed as mean ± SD of triplicate experiments. Value of IC<sub>50</sub> was calculated by nonlinear regression method using Graphpad Prism® Version 4.0.

\**p* < 0.05, statistically significant compared with control group.

\*\*SALE; ethanolic extract of stem and leaf from *Salvia plebeia* R. Br.

\*\*\*SAE; ethanolic extract of whole plant from *Salvia plebeia* R. Br.

\*\*\*\*Solvent fraction from SAE.

## 결과 및 고찰

### 1. 배암차즈기 조추출물 및 용매분획물의 추출 수율

배암차즈기의 경엽과 전초의 건재 추말 시료를 각각 30%, 50%, 70%, 95% 주정용매로 추출한 조추출물과 전초 95% 주정조추출물을 용매극성에 따라 분획하여 얻은 분획물에 대하여 추출수율을 측정하였다 (Table 2). 경엽조추출물 (SALE)의 수율은 건조시료 중량 대비 약 17%였으며, 전초조추출물 (SAE)은 약 22%로 경엽의 추출수율보다 5% 정도 높았으며 모두 주정 함유량에 따른 수율 차이는 보이지 않았다. 전초의 용매분획물은 *n*-hexane 분획물이 74.5%로 가장 높은 수율을 나타내었고, MC, EA, BuOH 분획물은 약 3.5% 정도로 상대적으로 매우 낮았다. 물분획물은 약 13%의 수율을 나타냈다.

### 2. 지방전구세포 3T3-L1에 대한 세포 독성

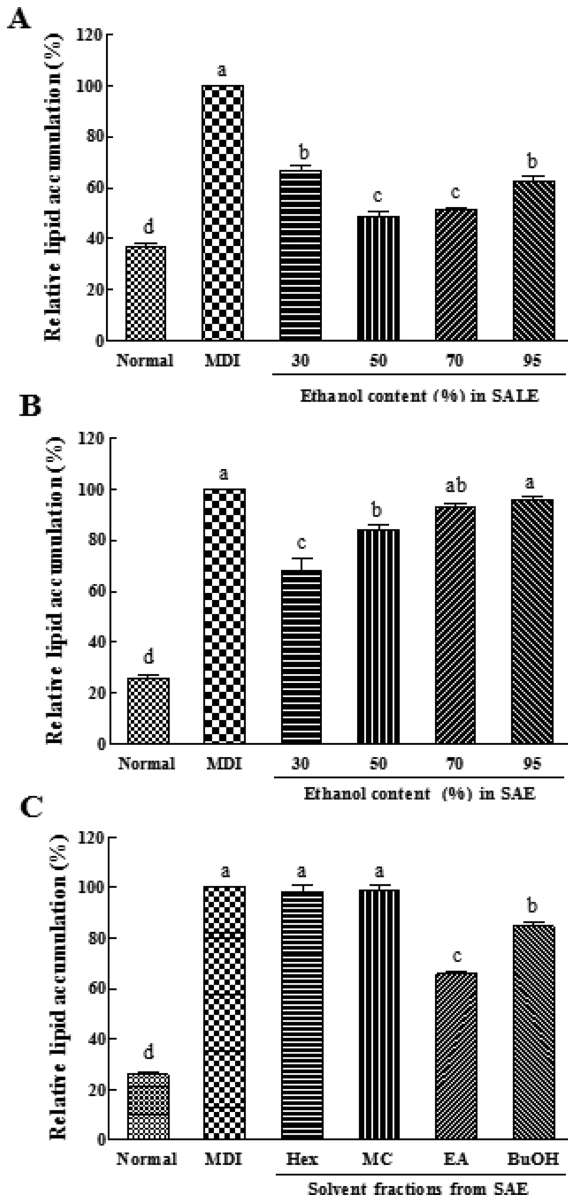
배암차즈기 경엽추출물 (SALE)과 전초추출물 (SAE) 및 전초 용매분획물의 처리에 따른 3T3-L1 지방전구세포의 생존율을 측정하기 위하여 MTS solution을 이용한 검정법을 실시하였다. 그 결과 (Table 2), 경엽의 95% 주정추출물에서 세포독성을 나타내었고, IC<sub>50</sub> 농도는 149.1 µg/mL (*p* < 0.05)였다. 전초의 경우 모든 추출물 200 µg/mL 처리 농도에서 세포독성은 나타내지 않았다. 또한 전초 용매분획물의 경우 비극성인 *n*-hexane 및 MC 분획물에서 세포독성을 보였고, IC<sub>50</sub> 농도는 각각 92.4 µg/mL, 77.2 µg/mL (*p* < 0.05)였다.

### 3. 3T3-L1 지방세포 분화 및 지방생성 억제 효과

지방전구세포인 3T3-L1는 *in vitro*에서 분화유도물질인 MDI를 첨가하였을 때 지방세포로 전환되며 세포내 지방을 축적 (adipogenesis)한다. 세포분화가 유도되는 동안 C/EBP family와 PPAR $\gamma$  등의 전사인자들의 전사 발현이 증가되고 이들 전사인자들 사이의 상호 전사를 유도함으로써 지방세포 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Morrison and Farmer, 2000).

배암차즈기 추출물 및 용매분획물의 처리에 따른 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 효과는 Oil Red O 염색법을 이용하여 측정하였다. SALE 30%, 50%, 70%, 95% 주정추출물 각각 100 µg/mL씩을 세포에 처리한 경우 (Fig. 1A), 각각 33%, 51%, 49%, 38% (*p* < 0.001)의 지방세포 분화 억제활성을 나타내었으며, 50%와 70% 추출물에서 IC<sub>50</sub> 농도는 약 100 µg/mL로 저해효과가 가장 높았다. 반면, SAE 주정추출물 각각 100 µg/mL씩을 세포에 처리한 경우 (Fig. 1B), 70%, 95% 주정추출물에서는 저해효과를 보이지 않았으나, 30%, 50% 주정추출물에서 각각 32% 및 16% (*p* < 0.001)의 분화 억제활성을 나타내었다. 동일 처리 농도에서 SALE 추출물의 경우 지방분해 억제 효과가 더 우수하였다.

전초 조추출물로부터 얻어진 용매분획물의 지방세포분화 억제 활성을 측정하였다. 세포 독성을 나타내지 않은 농도로서 각각 50 µg/mL로 처리한 결과 (Fig. 1C), 비극성 *n*-hexane과 MC 분획물은 지방세포분화 억제 활성을 나타내지 않은 반면, BuOH 분획물이 15% (*p* < 0.001)의 약간의 활성을 나타내었



**Fig. 1. Inhibitory effect of *Salvia plebeia* R. Br. on the lipid accumulation in MDI-induced 3T3-L1 adipocytes.** 3T3-L1 cells were cultured in differentiation medium (MDI) with (A) SALE (100 µg/mL), (B) SAE (100 µg/mL), and (C) Solvent fractions from SAE (50 µg/mL) during adipogenesis. The intercellular lipid accumulation contents of adipocytes were determined by Oil red O staining. Results are expressed as the mean ± SD. Values with different letter (a-d) within sample concentration are significantly different at  $p < 0.05$ . SALE; ethanolic extract of stem and leaf, SAE; ethanolic extract of whole plant, Solvent fractions; *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, and *n*-butanol from 95% SAE.

며, EA의 분획물이 35%로 가장 우수한 저해활성 ( $p < 0.001$ )을 나타내었다. Cho 등 (2007)은 배암차즈기 경엽을 메탄올

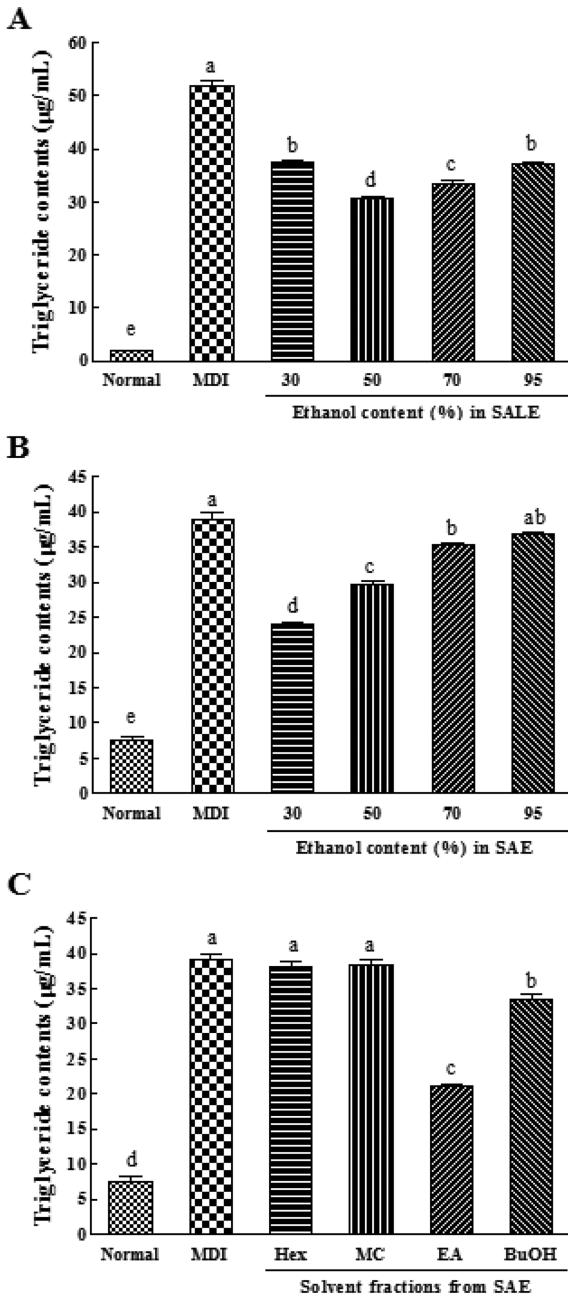
로 추출하여 추출액의 EA 분획물로부터 rosmarinic acid, luteolin-7-*O*-β-glucopyranoside, hispidulin-7-*O*-glucopyranoside 등을 구조 동정하였으며, 이 중 rosmarinic acid의 항산화활성이 가장 높은 것으로 보고하였다. 최근 지방 세포 내 과도하게 생성된 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)는 지방전구세포의 분화를 촉진시키거나 지방세포 주변에 위치한 macrophage를 자극하여 다른 활성산소종을 생성함으로써 비만의 주요 원인으로 작용한다고 보고된 바 있다 (Lee *et al.*, 2009).

#### 4. 3T3-L1 지방세포에서의 중성지방 축적 억제 효과

지방세포 내 지방구의 형성이 증가하면서 중성지방 생성량이 증가하고 지방축적에 관여하는 효소가 활성화되면서 점차적으로 지방세포 내 지방 축적이 일어나게 된다 (Frayn *et al.*, 2003).

본 연구에서 배암차즈기 추출물 및 용매분획물의 처리에 따른 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화과정 시 지방세포 내 중성지방의 축적에 미치는 영향을 확인하였다. 결과, 배암차즈기 경엽 (SALE) 30%, 50%, 70%, 95% 주정추출물 각각 100 µg/mL씩을 세포에 처리한 경우 (Fig. 2A), 28%, 41%, 35%, 28%의 중성지방 축적 저해활성을 나타내었고, 50% 주정추출물에서 가장 효과가 우수하였다. 반면, 배암차즈기 전초 (SAE)의 주정 함량별 추출물에 대한 중성지방 축적 저해활성을 확인한 결과 (Fig. 2B), 각각 100 µg/mL로 각각 처리했을 경우, 30% 주정추출물에서 38%의 분화 저해활성 ( $p < 0.001$ )으로 가장 우수하였으며, 50% 및 70% 주정추출물에서 각각 24% ( $p < 0.001$ ), 10% ( $p < 0.01$ )의 저해활성을 보였고, 95% 주정추출물에서는 효과를 나타내지 않았다. 또한 전초 조추출물로부터 얻어진 극성에 따른 용매분획물의 중성지방 축적 저해활성을 측정된 결과 (Fig. 2C), 각각 50 µg/mL로 처리했을 경우, BuOH 분획물이 14% ( $p < 0.01$ )의 약간의 활성을 나타내었으며, EA의 분획물이 46%로 가장 우수한 저해활성 ( $p < 0.001$ )을 나타내었다. 반면, 비극성 *n*-hexane과 MC 분획물은 지방세포 내 중성지방의 축적 억제 활성을 보이지 않았다. 배암차즈기 경엽 50%과 전초의 30% 조추출물에 대한 성분분석패턴이 유사하여 전초의 EA 분획물의 활성 결과가 경엽에서도 동일할 것으로 사료된다.

지방세포 내 축적된 중성지방이 분해되면 glycerol과 지방산으로 나누어지는데 glycerol의 유출은 세포 내 지방의 축적을 조절하는 중요한 기전으로 3T3-L1 지방세포계에서는 free glycerol의 함량이 지방구 내 중성지방의 분해 정도를 간접적으로 나타내는 척도가 된다고 알려져 있다 (Slavin *et al.*, 1994). 분화된 3T3-L1 지방세포에 경엽추출물 (SALE)과 전초추출물 (SAE)을 처리한 후 배지내로 분비된 free glycerol의 함량을 측정된 결과 대조군 (MDI)과 비교하여 분비량에서 통



**Fig. 2.** Inhibitory effect of *Salvia plebeia* R. Br. on the triglyceride contents in MDI-induced 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 cells were cultured in differentiation medium (MDI) with (A) SALE (100 µg/mL), (B) SAE (100 µg/mL), and (C) Solvent fractions from SAE (50 µg/mL) during adipogenesis. The intercellular triglyceride contents of adipocytes were determined by TG-S staining. Results are expressed as the mean ± SD. Values with different letter (a-e) within sample concentration are significantly different at  $p < 0.05$ . SALE; ethanolic extract of stem and leaf, SAE; ethanolic extract of whole plant, Solvent fractions; *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, and *n*-butanol from 95% SAE.

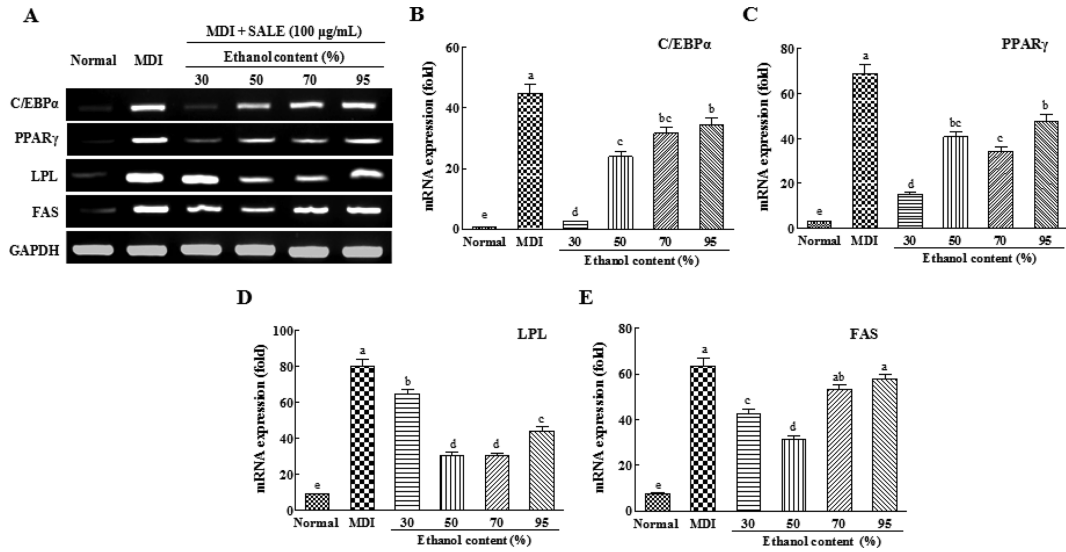
계유의적인 차이는 없었다 (결과 미제시). 따라서 배암차즈기 추출물은 지방세포의 중성지방 합성에는 관여하나 기 축적된 세포내 중성지방의 분해에는 관여하지 않음을 확인하였으며, 이때 경엽 50% 주정추출물, 전초 30% 주정추출물 및 EA 용매분획물에서 저해 효과가 가장 높았다.

### 5. 지방세포 분화 전사인자 C/EBP $\alpha$ 및 PPAR $\gamma$ mRNA 발현 측정

지방세포 분화유도 후 세포는 형태의 변화가 유발되고 일정 세포분열이 동반되며 5~7일간에 지방세포의 표현형을 나타내게 된다. 지방세포의 지방세포 내 지방 합성과 저장에 관여하는 효소들의 발현을 조절하는 전사인자는 분화초기에 발현이 유도되고 분화 후기가 되면 다양한 adipogenic 유전자들의 발현을 유도하며, 그 발현량이 현저히 증가된다. C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$ 는 각각 IBMX와 dexamethasone에 의해 분화과정의 초기에 발현이 유도되며, 분화 후기에 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 가 발현되면서 다수 종류의 지방세포 특이성 mRNA 등의 전사 활성화가 유도되는 것으로 알려져 있다 (Brun *et al.*, 1996).

배암차즈기 경엽 주정추출물 (SALE)은 지방세포 분화 및 지방축적 저해 효과가 가장 높게 나타났으며 현재 식용으로 이용되고 있어 기능성 소재로서 개발 가능성이 용이하다. 본 연구에서는 배암차즈기 경엽 주정추출물 (SALE)에 대하여 지방세포 분화 전사인자인 C/EBP $\alpha$  및 PPAR $\gamma$ 와 이들의 표지 유전자인 lipoprotein lipase (LPL) 및 fatty acid synthase (FAS) 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 (Fig. 3), 분화 배지만 처리한 군 (MDI)에서 이들 전사인자 및 유전자의 발현은 현저하게 증가되는 양상을 나타내었다. 30% SALE 10 µg/mL 처리한 경우, C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 에 대한 mRNA 발현 억제율은 각각 94.2%, 77.7% ( $p < 0.001$ )로 매우 높았으나, FAS 및 LPL 유전자에 대한 발현 억제율은 각각 33.2%, 23.5%로 상대적으로 낮았다. C/EBP $\alpha$ 는 지방전구세포에서 인슐린 민감성을 유도하고, 지방생성 및 PPAR $\gamma$ 와 더불어 지방세포로의 분화 후기과정에서 중요한 역할을 하며 분화와 관련된 유전자들의 발현을 조절한다 (Freytag *et al.*, 1994). 또한 PPAR $\gamma$ 는 지방조직에 주로 존재하고 지방형성을 총괄적으로 조절하며 지방세포를 분화시키는 능력이 다른 전사인자들보다 월등히 높고 지방세포로 분화시키는 분화된 상태를 유지하는데 필수적이다. PPAR $\gamma$ 는 C/EBPs에 의해 그 발현량이 조절되며 그 중에서도 C/EBP $\beta$ 에 의해 지방세포분화의 초기단계에 PPAR $\gamma$ 의 발현이 유도된다고 알려져 있다 (Schroeder-Gloekler *et al.*, 2007).

반면, 50% 주정추출물은 상기 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 에 대한 mRNA 발현 억제율은 각각 46.6%, 44.0% ( $p < 0.001$ )였으나, 상대적으로 FAS 및 LPL 유전자 mRNA 발현 억제율은 각각 52.8% 및 63.6% ( $p < 0.001$ )로 더 높았다. 70% 주정추출물의



**Fig. 3.** Effect of SALE on the mRNA expression of transcriptional factors and adipocytes-specific genes. 3T3-L1 cells were cultured in differentiation medium (MDI) with SALE (100  $\mu$ g/mL) for 8 days. The mRNA levels of C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , LPL and FAS were analyzed by RT-PCR. Relative mRNA expression was normalized with GAPDH expression. The values were calculated as fold of gene expression of the MDI-treated group. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. Values with different letter (a-e) within sample concentration are significantly different at  $p < 0.05$ . SALE; ethanolic extract of stem and leaf.

경우 PPAR $\gamma$  및 LPL에 대해서만 각각 53.2%, 61.2% ( $p < 0.001$ )의 발현 억제효과를 보였다. 전사인자인 PPAR $\gamma$ 가 발현되면 이의 표지 유전자인 FAS, LPL, aP2 등 adipogenic 유전자들의 발현이 유도 및 발현 양이 크게 증가하며, triglyceride의 축적과 같은 형태적 특징을 나타낸다 (Flier and Maratos Flier, 1998). 특히, 지방대사에 관여하는 지방합성 효소인 FAS는 지방조직에서 가장 많이 발현되며 지방세포분화의 최종인자로서 항비만 효과의 지표중 하나로 알려져 있다. LPL은 혈중 지방산을 세포 내로 전달하는 효소로서 지방조직 내 LPL로 인해 세포내로 유입된 fatty acid가 triglyceride로 전환되어 저장되므로 LPL의 발현 및 활성이 억제되면 lipoprotein 내의 분해되지 않은 triglyceride가 체내로의 흡수가 저해되어 체중감소의 효과를 나타낼 수 있다고 알려져 있다 (Lafontan and Langin, 2009). Lee 등 (2009)은 미나리 (*Oenanthe javanica*) 및 울무 (*Coicis lachryma-jobi* L. var.) 추출물이 지질대사 관련 효소인 LPL의 활성을 억제시켜 중성지방의 지방세포 유입 억제 활성을 나타내는 것으로 보고하였고, Seo 등 (2011)은 회향종자 (*Foeniculi fructus*) 추출물이 고지방식이 유도 비만 마우스에서 LPL의 활성을 억제시켜 세포내로 지방산의 유입을 억제하는 항비만 효능이 있음이 보고하였다. 상기 결과로부터 배암차즈기 경엽추출물 (SALE)의 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 에 대한 발현 저해 효과는 30% 주정추출물에서 현저히 우수하였고, 50% 주정추출물은 C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , FAS와 LPS에 대하여 모두 50% 이상의 높은 발현 억제율을 나타

내었다. 또한 70% 주정추출물은 PPAR $\gamma$  및 LPL 발현을 억제하였다.

본 연구결과로서 배암차즈기 경엽 및 진초추출물은 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화 및 지방세포 내 중성지방 축적을 현저히 억제시켰으며, 진초보다 경엽에서, 극성용매추출물 및 에틸아세테이트 분획물에서 더 우수한 효과를 나타내었다. 또한 주요 지방세포분화 전사인자인 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 발현을 억제시킴으로써 FAS 및 LPL의 지방세포 표지 유전자 발현량을 감소시키고 최종 세포 내 중성지방의 생성 및 축적을 감소시키는 것으로 확인하였으며, 이는 배암차즈기 추출물이 비만을 예방할 수 있는 우수한 기능성 식품 소재로서의 가능성을 보여주었다.

### 감사의 글

본 논문은 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업 연구비 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.

- Brun RP, Kim JB, Hu E, Altiock S and Spiegelman BM.** (1996). Adipocyte differentiation: A transcriptional regulatory cascade. *Current Opinion in Cell Biology*. 8:826-832.
- Cho KJ.** (2007). Development of functional medicinal food materials and separation of physiological active substances from native plants. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Sejong, Korea. p.3-146.
- Flier JS and Maratos FE.** (1998). Obesity and the hypothalamus: Novel peptides for new pathways. *Cell*. 92:437-440.
- Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA and Coppack SW.** (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *International Journal of Obesity*. 27: 875-888.
- Freytag SO, Paielli DL and Gilbert JD.** (1994). Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes and Development*. 8:1654-1663.
- Gregoire FM, Smas CM and Sul HS.** (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews*. 78:783-809.
- Jeong HR, Sung MS, Kim YH, Ham HM, Choi YM and Lee JS.** (2012). Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 41:888-894.
- Jeong HY, Jin SJ, Nam SW, Hyun SK, Kim SG, Kim BW and Kwon HJ.** (2014). Anti-adipogenic activity of cortex ulmi pumilae extract in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Life Science*. 24:137-147.
- Jessen BA and Stevens GJ.** (2002). Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene*. 299:95-100.
- Jo SY, Lee UY, Kim EY, Lee SJ, Her JW and Yoon TJ.** (2010). A study on the anti-inflammatory and anti-allergic effect of *Salvia plebeia* R. extracts. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 41:31-37.
- Kim HY, Lim SH, Kwon CJ, Park YH, Lee KJ, Park DS, Kim KH, Kim SM and Park CB.** (2011). Effect of *Lythrum salicaria* L. ethanol extract on lipid metabolism and anti-obesity in rat fed high fat diet. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:319-324.
- Kim HJ, Kang CH and Kim SK.** (2012). Anti-adipogenic effect of *Undaria pinnatifida* extracts by ethanol in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Life Science*. 22:1052-1056.
- Lafontan M and Langin D.** (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research*. 48:275-297.
- Lee HJ, Chung MJ, Kim DJ and Choe M.** (2009). Effects of *Oenanthe javanica*, *Coicis lachryma-jobi* L. var., and *Plantaginis asiatica* L. water extracts on activities of key enzymes on lipid metabolism. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 38:1516-1521.
- Lee JK, Kang MG, Kim YH and Lee JS.** (2012). Screening of medicinal plants containing lipase inhibitor and optimal extraction conditions. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:1-7.
- Lee OH, Kwon YI, Hong HD, Park CS, Lee BY and Kim YC.** (2009). Production of reactive oxygen species and changes in antioxidant enzyme activities during differentiation of 3T3-L1 adipocyte. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 52:70-75.
- Leung WY, Thomas GN, Chan JC and Tomlinson B.** (2003). Weight management and current options in pharmacotherapy: Orlistat and sibutramine. *Clinical Therapeutics*. 25:58-80.
- Lim JA, Yun BW and Baek SH.** (2007). Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of methanol extract from *Salvia plebeia* R. Br. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:183-188.
- Lin YC, Hung CM, Tsai JC, Lee JC, Chen YL, Wei CW, Kao JY and Way TD.** Hispidulin potently inhibits human glioblastoma multiforme cells through activation of AMP-activated protein kinase(AMPK). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 9511-9517.
- Morrison RF and Farmer SR.** (2000). Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *Journal of Nutrition*. 130:3116-3121.
- Park SH, Kim JL, Kang MK, Gong JH, Han SY, Shim JH, Lim SS and Kang YH.** (2012). Sage weed (*Salvia plebeia*) extract antagonizes foam cell formation and promotes cholesterol efflux in murine macrophages. *International Journal of Molecular Medicine*. 30:1105-1112.
- Park YJ, Kim MS, Kim HR, Kim JM, Hwang JK, Yang SH, Kim HJ, Lee DS, Oh HC, Kim YC, Ryu DG, Lee YR and Kwon KB.** (2014). Ethanol extract of *Alismatis* rhizome inhibits adipocyte differentiation of OP9 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014:1-9.
- 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.** (2007). CCAAT/enhancer-binding protein beta deletion reduces adiposity, hepatic steatosis and diabetes in *Lepr(db/db)* mice. *Journal of Biological Chemistry*. 282:15717-15729.
- Seo DJ, Kim TH, Kim HS and Choe M.** (2011). Effects of *Foeniculi fructus* water extracts on activities of key enzymes of lipid metabolism related with obesity. *Korean Journal of Plant Resources*. 24:181-188.
- Shin MK, Kim SK, Lee SK, Yang EY, Lee HO and Baek SH.** (2001). Cytotoxicity and antimicrobial effect of the extract of *Salvia plebeia*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 32:55-60.
- Slavin BG, Ong JM and Kern PA.** (1994). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *Journal of Lipid Research*. 35:1535-1541.
- World Health Organization(WHO).** (2013). Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
- Yang JM, Hung CM, Fu CN, Lee JC, Huang CH, Yang MH, Lin CL, Kao JY and Way TD.** (2010). Hispidulin sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activation leading to Mcl-1 block in translation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:10020-10026.