65종 한약처방이 3T3-L1 지방전구세포의 지방 분화에 미치는 효능 비교 연구

최혜민 · 유병우 · 김민주 · 김정옥

한국한의학진흥원 한의기술 R&D 2팀

Comparative Study on the Differentiation Effect of Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocyte by 65 Herbal Medicine Prescriptions

Hye-Min Choi, Byung-Woo Yu, Min-Ju Kim, Jung-Ok Kim

Korean Medicine R&D Team 2, National Institute for Korean Medicine Development

Received: October 30, 2020
Revised: November 27, 2020
Accepted: December 9, 2020

Correspondence to: Jung-Ok Kim
Korean Medicine R&D Team 2,
National Institute for Korean Medicine
Development, 94 Hwarang-ro,
Gyeongsan 38540, Korea
Tel: +82-53-810-0395
Fax: +82-53-810-0245
E-mail : kjo1226@nikom.or.kr

Copyright © 2020 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: To expand and provide information on the efficacy of herbal medicines, anti-obesity effects were evaluated. In many studies, plant-derived components with anti-obesity efficacies have been investigated for their potential inhibitory effects on 3T3-L1 preadipocyte cells. The purpose of this study was to investigate the anti-obesity effects of 65 herbal medicine in 3T3-L1 preadipocyte cells.

Methods: Preferentially, 3T3-L1 cells were treated with 65 herbal medicines (500 µg/mL) during differentiation for 8 days. Next, 3T3-L1 cells were treated with selected herbal medicines at concentrations ranging from 50 to 200 µg/mL during differentiation for 8 days. The accumulation of lipid droplets was determined by Oil Red O staining. The expressions of genes related to adipogenesis were measured by reverse transcription polymerase chain reaction and Western blot analyses.

Results: Among the 65 kinds of herbal medicines, 13 herbal medicines that been shown to be effective against the accumulation of lipid droplets were selected. Finally, selected *Banhasasim-tang* and *Samhwangsasim-tang* showed inhibitory activity on adipocyte differentiation at 3T3-L1 preadipocytes without affecting cell toxicity. In addition, *Banhasasim-tang* and *Samhwangsasim-tang* significantly reduced the expression levels of several adipocyte marker genes including peroxisome proliferator activated receptor-γ and CCAAT/enhancer binding protein-α.

Conclusions : These results suggest that the ability of *Banhasasim-tang* and *Samhwangsasim-tang* has inhibited overall adipogenesis and lipid accumulation in the 3T3-L1 cells. *Banhasasim-tang* and *Samhwangsasim-tang* may be a promising medicine for the treatment of obesity and related metabolic disorders.

Key Words: Herbal medicine, obesity, 3T3-L1

서론

비만은 활동 감소, 스트레스, 영양과잉 등에 의한 요인으로 한의학에서의 비만은 습(濕), 담(痰), 기허(氣虛) 등에서 기인하여 폐(肺)의 선발(宣發)과 숙강(肅降), 비(脾)의 운화수포(運化輸布) 및 신(腎)의 증증기화(蒸騰氣化)와

같은 기능의 저하가 습(濕)이나 담(痰)과 같은 수액대사의 이상이 비생리적 체액의 저류를 일으켜 비만이 유발된다고 논하고 있다^{1,2)}.

최근 현대사회의 발달로 식생활을 비롯한 전반적인 생활습관이 급속한 서구화에 따라 불규칙한 식생활의 변화 양상과 신체 활동량의 감소로 비만이 증가하고 있다. 이

러한 비만이 문제시 되고 있는 이유는 비만인 사람에게서 나타나는 생활습관병 또는 대사증후군 등과 같은 질병 때문인데, 이는 고혈압(혈압상승), 비만(복부비만), 당대사 이상(혈당상승), 이상지질혈증(지질대사이상)의 임상적 특징을 갖는 증후군으로, 협심증, 심근경색 등의 심혈관 질환과 당뇨, 뇌졸중, 암 등의 발생을 증가시키는 위험요인으로 알려져 있기 때문이다^{3,4)}.

임상에서는 비만 질환을 예방, 치료하기 위하여 많은 노력들이 지속되어 서양의학에 근거한 의약품들이 개발되었다. 하지만 이러한 의약품들 중에는 감정변화, 자살 충동, 위장관 및 심혈관 부작용 등이 심각하여 시판이 중단되거나 사용이 감소되고 있다^{5,6)}. 따라서 최근에는 부작용이 적고 안전성이 확보된 천연소재를 이용하여 항비만 연구 및 제품 개발이 많이 이루어지고 있는 추세이다⁷⁻⁹⁾.

세포수준에서 비만은 지방전구세포의 분화로 인한 지방세포 수와 크기의 증가가 원인으로 작용한다. 이와 관련하여 최근에는 마우스에서 유래된 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 활발한 연구를 하고 있다¹⁰⁻¹³⁾. 지방전구세포는 일정한 분화 조건에 의해서 지방세포로 분화되어 세포 내 지방을 축적하는데, 이 지방전구세포의 분화 및 지방세포의 축적을 억제하는 물질이 비만을 예방하거나 치료할 수 있다고 기전이 밝혀져 있다.

이에 본 연구도 항비만 효과가 있는 천연소재인 한약처방을 개발하기 위해 대한민국약전 및 대한민국약전의 한약(생약)규격집에 수재되어 있는 한약처방 65종을 대상으로 연구하여 항비만에 유의한 효과가 있는 한약처방을 확인하여 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 65종 한약처방 구성 약재

본 연구에 사용된 65종 한약처방 구성 약재들은 (주)휴먼허브(대구, 한국)에서 구입하였고 전문가 감별 후 사용하였다. 각각의 구성 한약재들의 표본은 한국한약진흥원 한의기술 R&D 2팀의 한약재보관실에 보관하였다.

2) 세포실험 분석 시약

3T3-L1 마우스 유래 배아섬유아세포는 미국세포주은행(American Type Culture Collection, CL-173™)에서 구입

하여 사용하였으며, fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin, phosphate buffered saline (PBS)는 Hyclone사(Logan, UT, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약 중 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone (DEX), Oil red O 시약들은 Sigma Aldrich사(St Louis, MO, USA), bovine calf serum (BCS), Insulin 시약은 Thermo Scientific 사 (Rockford, IL, USA), peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ), CCAAT-enhancer-binding proteins- α (C/EBP α), β -actin 1차 항체 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 처방 구성 및 추출방법

본 연구에 사용한 65종 한약처방은 공정서인 대한민국약전 및 대한민국약전외한약(생약)규격집(KP/KHP)에 표기된 처방 내용에 따라 구성 한약재를 비율대로 칭량하여 분쇄한 후 약탕기(대용약탕기, 서울, 한국)로 정제수 10배량을 가해 100°C에서 3시간 추출하였다. 상기 추출액은 Whatman filter paper No. 4 (25 μ m; Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과 후 농축한 연조엑스를 얻은 것으로 분무건조기(서강엔지니어링, 충남, 천안)를 사용하여 분말을 얻었다. 각각의 65종 한약처방 및 수율은 Table 1에 나타내었다.

2) 세포독성 평가

한약 처방의 3T3-L1 세포에 대한 독성평가를 위하여 3-[4,5-dimethylthiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 수행하였다. 먼저, 3T3-L1 세포(1×10^5 cell/96 well)를 Seeding 후 24시간 뒤 50-500 μ g/mL 농도별로 처리하여 24시간 배양 후 MTT 시약을 첨가하여 2시간 동안 반응하고 dimethyl sulfoxide로 석출하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 정도는 시료를 처리하지 않은 대조군(CON)과 약물 처리군의 비율로 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times (\text{treated sample}) / (\text{Non-treated sample [CON]})$$

3) 3T3-L1 세포 배양 및 분화유도

3T3-L1 세포는 10% BCS, 1% penicillin/streptomycin을

Table 1. The Contents and Yield of 65 Herbal Medicine Prescriptions*

Number	Herbal medicine prescription	Yield (%)	Number	Herbal medicine prescription	Yield (%)
1	<i>Gamigwibi-tang</i>	21.95	34	<i>Sosiho-tang</i>	17.38
2	<i>Gamisoyosan</i>	24.46	35	<i>Socheongryong-tang</i>	16.45
3	<i>Galguen-tang</i>	21.70	36	<i>Sihogyoji-tang</i>	7.79
4	<i>Galgeun-tanggachungungsini</i>	12.29	37	<i>Sihocheonggan-tang</i>	13.25
5	<i>Gammaecdaejo-tang</i>	8.87	38	<i>Sibjeondaebo-tang</i>	24.08
6	<i>Gyejibokryeong-hwan</i>	5.80	39	<i>Ssanghwa-tang</i>	18.56
7	<i>Gyejibokryeonghwangadae-hwang</i>	10.05	40	<i>Anjung-san</i>	5.11
8	<i>Goakhyangeonggi-san</i>	16.66	41	<i>Yeongyopaedog-san</i>	23.22
9	<i>Gumiganghwal-tang</i>	25.04	42	<i>Oncheongeum</i>	19.14
10	<i>Gwigigeunjung-tang</i>	18.31	43	<i>Yukgunja-tang</i>	10.40
11	<i>Gilkyung-tang</i>	27.96	44	<i>Yukmijihwang-tang</i>	14.58
12	<i>Naeso-san</i>	7.29	45	<i>Eungyo-san</i>	18.92
13	<i>Danggwigeeonjung-tang</i>	39.55	46	<i>Ijung-tang</i>	21.38
14	<i>Danggwiakyak-san</i>	21.58	47	<i>Insampaedog-san</i>	19.36
15	<i>Daesiho-tang</i>	13.05	48	<i>Injinoryeong-san</i>	12.48
16	<i>Daecheongryong-tang</i>	9.23	49	<i>Injinho-tang</i>	14.99
17	<i>Daehwanggamcho-tang</i>	16.82	50	<i>Jaeumganghwa-tang</i>	24.26
18	<i>Daehwangmokdanpi-tang</i>	15.12	51	<i>Jagyakgamcho-tang</i>	18.58
19	<i>Mahwang-tang</i>	10.21	52	<i>Jowiseunggi-tang</i>	20.69
20	<i>Maegmundong-tang</i>	8.03	53	<i>Cheongsanggyeontong-tang</i>	28.08
21	<i>Banhasasim-tang</i>	14.52	54	<i>Cheongsangbangpung-tang</i>	26.03
22	<i>Banhahubag-tang</i>	4.40	55	<i>Palmijihwang-hwan</i>	9.99
23	<i>Banggihwanggi-tang</i>	14.93	56	<i>Paedok-san</i>	24.53
24	<i>Bangpungtonseong-san</i>	24.58	57	<i>Pyeongwi-san</i>	30.49
25	<i>Baenongsangeub-tang</i>	21.95	58	<i>Pyeongworyeong-san</i>	10.18
26	<i>Banhabaekchulcheonma-tang</i>	14.00	59	<i>Hyangso-san</i>	14.91
27	<i>Baegchul-tang</i>	20.21	60	<i>Hyangsapyeongwi-san</i>	16.17
28	<i>Bojungikgi-tang</i>	33.53	61	<i>Hyeonggaeyeongyo-tang</i>	28.86
29	<i>Samul-tang</i>	33.99	62	<i>Hyeongbangpaedok-san</i>	19.75
30	<i>Samsoeum</i>	20.58	63	<i>Hwanggeum-tang</i>	18.86
31	<i>Samhwangsasim-tang</i>	15.02	64	<i>Hwanggigeonjung-tang</i>	31.23
32	<i>Saenggangsasim-tang</i>	11.89	65	<i>Hwangryeonhaedok-tang</i>	21.49
33	<i>Sogeonjung-tang</i>	46.14			

*65 herbal medicine of Korean Pharmacopoeia, Korean Herbal Pharmacopoeia.

포함한 DMEM 배지로 37 °C, 5% CO₂ 배양기(MCO-15AC; Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 배양된 세포는 6-well plate에 seeding 후 120% 이상 confluence 상태가 되면 배양액을 분화유도 배양액(0.5 mM IBMX, 2 µM DEX, 167 nM insulin [MDI] / 10% FBS)으로 바꾸고 3일간 배양한다. 3일 후 167 nM insulin / 10% FBS 배지로 교환하며 성숙한 지방세포(adipocytes)로 만들었다. 그리고 Table 2와 같이 8일간 분화유도하며 1차적으로 65종 한약처방 실험군을

500 µg/mL의 농도로 대조군 하이드록시구연산(hydroxycitric acid, HCA) 500 nM와 비교 실험하였고, 2차적으로 앞선 실험으로 선정된 한약처방을 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 HCA 100 nM와 함께 비교 실험하였다.

4) 지방세포 분화 억제능 측정(Oil red O staining)

분화 완료된 6-well plate의 배지를 제거한 후 1×PBS로 2회 씻어주었다. 10% formalin으로 2시간 이상 고정시킨

Table 2. 3T3-L1 Cells were Applied for Fat Production in the Presence of 65 Herbal Medicine, HCA Depending on the Differentiation Stages during Day 0 to Day 8

No.*	Early Differentiation		Differentiation			Analysis
1st	0 day	3 day	4 day	6 day	8 day	Oil red O staining
	MDI+10% FBS+65 herbal medicine & 500 nM HCA		Insulin+10% FBS+65 herbal medicine & 500 nM HCA			
2nd	0 day	3 day	4 day	6 day	8 day	
	MDI+10% FBS+selected herbal medicine & 100 nM HCA		Insulin+10% FBS+selected herbal medicine & 100 nM HCA			
3rd	0 day	2 day	3 day			
	MDI+10% FBS+selected herbal medicine & 100 nM HCA		RNA & protein sampling			

*1st: 65 herbal medicine on lipid accumulation, 2nd: selected herbal medicine from 65 herbal medicine on lipid accumulation, 3rd: Selected herbal medicine from 65 herbal medicine on the expression of anti-obesity marker gene.
HCA: hydroxycitric acid, MDI: 0.5 mM IBMX, 2 μ M DEX, 167 nM insulin, FBS: fetal bovine serum, RNA: ribonucleic acid.

세포를 40% iso-propanol로 세척 후 완전히 건조시켰다. 그 후, Oil red O working solution으로 1시간 염색하였고 40% isopropanol로 3회 세척하였다. 염색된 세포는 사진 촬영 후 100% iso-propanol로 염색된 Oil red O solution을 녹여 520 nm에서 흡광도를 측정 정량하였다.

5) 중합효소 연쇄반응법(reverse transcription polymerase chain reaction)에 따른 지방분화 조절 유전자 측정

3T3-L1 지방전구세포에 선정된 한약처방을 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 처리하며 지방세포로 분화를 유도한 후 TRIzol (Takara, Tokyo, Japan)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA는 1 μ g으로 정량하여 Oligo-dT, DEPC를 첨가한 완충 반응액(Maxime RT PreMix; Invitrogen, Washington, USA)을 넣어 45°C에서 약 60분간 반응시킨 후 95°C에서 5분간 처리하여 cDNA를 합성하였다. 이 template cDNA와 Taq polymerase 등이 포함된 반응 혼합액(WizPure™ FX-PCR 2X Master; Wizbiosolutions, Seongnam, Korea)과 각각의 primer sequence인 5'-ATT CTG GCC CAC CAA CTT CGG-3' (Forward), 5'-TGG AAG CCT GAT GCT TTA TCC CCA-3' (Reverse); PPAR- γ , 5'-GCA ACG CCG CCT TTG GCT TT-3' (Forward), 5'-AGT GCG CGA TCT GGA ACT GC-3' (Reverse); C/EBP α , 5'-CAA CTC CCA CTC TTC CAC CT-3' (Forward), 5'-CTT GCT CAG TGT CCT TGC TG-3' (Reverse); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase로 PCR 증폭 후 1.5% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

6) Western blotting에 따른 지방분화 조절 단백질 측정

3T3-L1 지방전구세포에 선정된 한약처방을 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 처리하며 지방세포로 분화를 유도한 후, 1×PBS로 세척하고, protease & phosphatase inhibitor cocktail을 포함하는 RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, WALTHAM, MA, USA)로 균질화 하였다. 균질화된 sample은 적정량의 단백질로 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis에 분리한 후 polyvinylidene fluoride membrane으로 단백질을 전이시켰다. 그 후 5% skin milk를 처리하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 하였고 1차 항체(C/EBP α , PPAR- γ , β -actin)를 4°C에서 overnight 반응시킨 후 horseradish peroxidase가 중합된 2차 항체를 반응시켰다. 검출하고자 하는 단백질은 enhanced chemiluminescent (Thermo Scientific)로 감광시켜 chemiluminescent detection system을 이용하여 현상하였다.

3. 통계 분석

실험결과의 통계 처리는 SPSS package (IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하였으며 실험에 대한 측정값은 mean $\pm$ standard error of the mean로 표시하였고, 분석에 대한 유의성은 one-way analysis of variance를 실시하였다. 분석결과에 대한 P<0.05, P<0.01의 수준에서 least significant difference 다중검정법으로 사후검정을 실시하여 각 처리구간의 평균치에 대한 유의성을 분석하였다.

결과

1. 65종 한약처방이 지방세포분화에 미치는 영향

1) 65종 한약처방 지방세포 분화 억제능 측정

3T3-L1 지방전구세포에 65종 한약처방 및 HCA 500 nM

을 처리하며 8일 동안 분화를 유도한 후 Oil red O 염색을 통하여 지방세포 분화능을 측정한 결과, 분화를 유도한 지방세포(adipocytes, PC)에서는 지방전구세포(preadipocytes, NC)에 비해 유의적인 지방 분화를 나타내었다. 이와 비교하여 지방분화를 유도하며 대조군 HCA 500 nM을 함께

Table 3. Effect of 65 Herbal Medicine on Lipid Accumulation during the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes

HCA 500 nM			Inhibition of lipid accumulation (%)		
			67.99±8.32		
Number	Herbal medicine	500 ug/mL	Number	Herbal medicine	500 ug/mL
1	<i>Gamigwibi-tang</i>	40.64±5.56	34	<i>Sosihotang*</i>	78.68±6.62
2	<i>Gamisoyo-san</i>	41.18±7.51	35	<i>Socheongryong-tang</i>	9.64±7.08
3	<i>Galguen-tang</i>	-23.26±3.43	36	<i>Sihogyeeji-tang*</i>	66.51±8.38
4	<i>Galgeun-tanggachungungsini</i>	-19.78±7.98	37	<i>Sihocheonggan-tang</i>	14.95±9.61
5	<i>Gammaecdaejo-tang*</i>	65.33±2.38	38	<i>Sibjeondaeho-tang</i>	29.95±3.86
6	<i>Gyejibokryeong-hwan</i>	44.90±4.34	39	<i>Ssanghwa-tang</i>	28.60±1.38
7	<i>Gyejibokryeonghwagadae-hwang</i>	29.48±10.29	40	<i>Anjung-san</i>	5.50±1.32
8	<i>Goakhyangjeonggi-san</i>	55.53±7.52	41	<i>Yeongyopaedog-san</i>	-18.83±0.49
9	<i>Gumiganghwal-tang</i>	51.57±1.85	42	<i>Oncheongeum*</i>	69.52±8.94
10	<i>Gwigijeunjang-tang*</i>	61.91±1.72	43	<i>Yukgunja-tang</i>	25.05±15.95
11	<i>Gilkyung-tang*</i>	63.03±0.78	44	<i>Yukmijihwang-tang</i>	29.36±12.66
12	<i>Naeso-san</i>	54.58±3.89	45	<i>Eungyo-san</i>	24.82±7.94
13	<i>Danggwigeonjang-tang</i>	44.31±6.54	46	<i>Ijung-tang</i>	39.76±2.53
14	<i>Danggwijakyak-san</i>	34.32±1.90	47	<i>Insampaedog-san</i>	10.70±4.19
15	<i>Daesiho-tang*</i>	61.26±6.73	48	<i>Injinoryeong-san</i>	-37.91±11.65
16	<i>Daechongryong-tang</i>	34.50±6.99	49	<i>Injinho-tang</i>	-24.32±10.36
17	<i>Daehwanggamcho-tang</i>	47.20±6.73	50	<i>Jaeumganghwa-tang</i>	42.00±5.93
18	<i>Daehwangmokdanpi-tang</i>	51.22±6.06	51	<i>Jagyakgamcho-tang</i>	-10.68±4.75
19	<i>Mahwang-tang</i>	-17.24±9.29	52	<i>Jowiseunggi-tang</i>	14.60±2.58
20	<i>Maegmundong-tang</i>	59.48±5.07	53	<i>Cheongsanggyeontong-tang</i>	22.16±3.73
21	<i>Banhasasim-tang*</i>	66.16±8.80	54	<i>Cheongsangbangpung-tang</i>	41.53±6.84
22	<i>Banhahubag-tang</i>	55.68±8.67	55	<i>Palmijihwang-hwan</i>	-1.05±7.77
23	<i>Banggihwanggi-tang*</i>	64.62±3.16	56	<i>Paedok-san</i>	19.20±2.35
24	<i>Bangpungdongseong-san</i>	43.36±4.65	57	<i>Pyeongwi-san</i>	42.95±4.48
25	<i>Baenongsangeub-tang</i>	30.31±6.86	58	<i>Pyeongwionryeong-san</i>	-10.80±4.43
26	<i>Banhabaekchulcheonma-tang</i>	25.47±2.77	59	<i>Hyangso-san*</i>	61.32±1.78
27	<i>Baegchul-tang</i>	55.88±7.92	60	<i>Hyangsapyeongwi-san*</i>	60.55±3.61
28	<i>Bojungikgi-tang</i>	24.17±8.39	61	<i>Hyeonggaeyeongyo-tang</i>	25.29±7.10
29	<i>Samul-tang</i>	15.84±8.52	62	<i>Hyeongbangpaedok-san</i>	25.52±1.41
30	<i>Samsoeum</i>	32.85±4.87	63	<i>Hwanggeum-tang</i>	39.82±6.02
31	<i>Samhwangsasim-tang*</i>	72.42±4.19	64	<i>Hwanggigeonjang-tang*</i>	61.97±3.52
32	<i>Saenggangsasim-tang</i>	42.12±1.44	65	<i>Hwangryeonhaedok-tang*</i>	61.91±1.10
33	<i>Sogeonjang-tang</i>	58.13±5.50			

The values of independent experiments are expressed as means±standard error of the mean (n=3).

*The values of independent experiments are expressed as means±standard error of the mean (n=6). *P(0.01 vs HCA.

The intracellular lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining, HCA: hydroxycitric acid.

처리한 세포는 $67.99 \pm 8.32\%$ 의 유의적인 지방분화 억제 경향을 나타내었다. 이와 같이 실험군 65종 한약처방과 대조군인 HCA 500 nM와 비교한 결과 실험군 감맥대조탕, 귀기전중탕, 길경탕, 반하사심탕, 방기황기탕, 삼황사심탕, 소시호탕, 시호계지탕, 온청음, 향소산, 향사평위산, 황기전중탕, 황련해독탕으로 총 13종의 한약처방이 유의적으로 지방분화 억제함을 확인하였다(Table 3).

2) 65종 중 선택된 한약처방의 3T3-L1 세포 독성

65종 중 선택된 한약처방을 3T3-L1 지방전구세포의 독성 검사를 위해서 50-500 $\mu\text{g/mL}$ 농도 구간별로 처리하여 24시간 배양한 후 MTT assay를 수행하였다(Fig. 1). 3T3-L1 지방전구세포에 대한 한약처방의 세포독성은 한약처방을 처리하지 않고 배양한 대조군(CON)의 세포생존율 100%를 기준으로 실험 농도 구간인 50-500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 유의한 세포독성이 나타나지 않았다.

3) 65종 중 선택된 한약처방의 지방세포 분화 억제능 측정

대조군인 HCA 500 nM와 비교하여 65종 한약처방 중 유의적으로 지방 분화 억제능을 나타낸 실험군 감맥대조탕, 귀기전중탕, 길경탕, 반하사심탕, 방기황기탕, 삼황사심탕, 소시호탕, 시호계지탕, 온청음, 향소산, 향사평위산, 황기전중탕, 황련해독탕, 총 13종의 한약처방을 50-200 $\mu\text{g/mL}$ 농도 구간으로 대조군 HCA 100 nM와 함께 재평가하였

다. 그 결과, 대조군인 HCA 100 nM는 $20.86 \pm 1.13\%$ 억제 효능을 나타내었고, 이와 비교하여 최종적으로 반하사심탕과 삼황사심탕이 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 $35.04 \pm 2.19\%$, $34.87 \pm 4.09\%$ 억제 효능으로 지방 분화 억제능이 가장 유의적인 한약처방으로 확인하였다(Fig. 2).

2. 한약처방이 지방세포 분화 조절인자에 미치는 영향

65종 한약처방 중 지방 분화 억제능이 가장 유의적인 한약처방으로 선정된 최종 한약처방인 반하사심탕과 삼황사심탕의 지방세포 분화 조절인자에 미치는 영향을 조사하기 위해 지방 생성 주요 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR- γ 의 유전자 및 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과 지방전구세포(NC)에 비해 분화를 유도한 지방세포(PC)의 경우 C/EBP α 와 PPAR- γ 의 유전자 및 단백질 발현이 유의적으로 증가하였으나, 대조군인 HCA 100 nM을 처리한 군에서의 C/EBP α 와 PPAR- γ 의 유전자 발현이 각각 $57.31 \pm 6.92\%$ 로 유의적인 감소를 나타내었으며 이와 함께 반하사심탕과 삼황사심탕 또한 농도 의존적으로 유의적인 감소 결과를 보였다(Fig. 3).

고찰

지방은 인체의 필수적인 구성성분으로 중요한 열량원이기도 하지만 에너지 섭취와 소비간의 불균형으로 인한 과도한 지방세포 증가 및 분화는 비만의 주된 원인으로

Fig. 1. Effect of selected herbal medicine from 65 herbal medicine on the viability of 3T3-L1 cells. Cells were treated with indicated concentrations of selected herbal medicine for 24 h. CON: non-treated sample, HCA: hydroxycitric acid. The values of independent experiments are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (n=3).

Fig. 2. Effect of selected herbal medicine from 65 herbal medicine on lipid accumulation during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. NC: preadipocytes, PC: adipocytes, HCV: hydroxycitric acid. The intracellular lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining. The values of independent experiments are expressed as means±standard error of the mean (n=6). #P<0.01 vs NC, *P<0.01 vs PC, †P<0.01 vs HCA.

알려져 있다¹⁴). 이와 관련된 질병이 비만의 주된 문제가 되고 있어 비만의 예방 및 치료를 위한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁵).

비만의 예방 및 치료를 위해서는 지방세포의 지방 축적을 감소시키고 지방세포의 수를 줄이는 것이 핵심이다.

비만과 가장 밀접하게 관련되어 있는 지방세포 분화 (adipogenesis)는 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 과정을 말한다. 지방세포 분화에는 C/EBPs과 PPAR-γ와 같은 여러 transcription factors이 주요 에너지 대사 지표이다. C/EBPs 중 C/EBPα는 백색지방조직과 갈색지방조직에

Fig. 3. Effect of selected herbal medicine from 65 herbal medicine on the expression of C/EBP α and PPAR- γ mRNA and protein in 3T3-L1 adipocytes. The cells were treated with selected herbal medicine and 100 nM HCA at different concentrations for during 3 days on differentiation. C/EBP α : CCAAT-enhancer-binding proteins- α , PPAR- γ : peroxisome proliferator activated receptor- γ , GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, NC: preadipocytes, PC: adipocytes, HCA: hydroxycitric acid. The values of independent experiments are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (n=3). [#]P<0.01 vs NC, ^{*}P<0.01 vs PC, ⁺P<0.01 vs HCA.

서 발현되는 지방세포분화 전사인자로서 C/EBP β 와 C/EBP δ 는 지방세포 분화과정의 초기단계에 발현이 증가되어 PPAR- γ 의 발현을 유도하고, PPAR- γ 의 발현증가로 C/EBP α 의 지방세포 분화후기의 발현을 유도하며 지방세포 증식과 인슐린 민감도 향진에 관여한다. 이와같이 C/EBP α 및 PPAR- γ 는 지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 과정 중 지방생성 관여에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자이며 특히 후기 분화의 주요 전사인자로도 알려져 있다^{16,17}.

이와 같은 배경으로 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포에 65종 한약처방을 처리하며 지방세포로 분화를 유도한 후 adipogenesis 억제효능을 확인하고, 최종적으로 지방세포 분화전사인자인 C/EBP α 와 PPAR- γ 의 유전자 및 단백질 발현량에 미치는 효과도 확인하였다.

우선적으로 65종 한약처방에 대한 지방세포 분화 억제능을 확인하기 위해 대조군인 HCA 500 nM와 비교하여 500 μ g/mL 농도로 처리된 65종 한약처방 중 감맥대조탕, 귀기전중탕, 길경탕, 반하사심탕, 방기황기탕, 삼황사심탕, 소시호탕, 시호계지탕, 온청음, 향소산, 향사평위산, 황기전중탕, 황련해독탕으로 총 13종의 한약처방이 지방분화 억제를 유의하게 억제함을 확인하였고(Table 3), 이를 다시 50-200 μ g/mL 농도 구간으로 대조군 HCA 100 nM와 함께 재평가하였다. 그 결과, 최종적으로 반하사심탕과

삼황사심탕이 200 μ g/mL의 농도에서 지방 분화 억제능이 가장 유의한 한약처방임을 확인하였다(Fig. 2). 또한 선택된 두 처방은 단순한 지방축적 및 분화의 억제뿐만 아니라 분화전사인자인 C/EBP α 및 PPAR- γ 또한 농도 의존적으로 대조군인 HCA 100 nM보다 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

65종 한약처방 중 선택된 한약처방인 반하사심탕(半夏瀉心湯)은 상한론(傷寒論)에서 처음으로 ‘하위강역(和胃降逆), 개결제비(開結除痞)’라 하여 비위불화(脾胃不和)로 심하(心下)가 비만불통(痞滿不通)하고, 건구(乾嘔) 또는 구토(嘔吐)하며, 장명하리(腸鳴下痢)한 증상에 처방하는 목적으로 사용하였다¹⁸. 이 처방의 실험 보고로는 소화계통의 질환으로서, 간손상¹⁹ 및 위장계 질환²⁰, 면역계 질환으로 항암^{21,22} 및 항염증²³ 관련 연구가 보고되었고, 영양 및 대사질환 관련된 것으로는 항당뇨에 대한 연구만 보고되었다²⁴. 또다른 한약처방인 삼황사심탕(三黃瀉心湯)은 고혈압, 동맥경화증에 대응하는 대표 처방으로, 앞선 연구에서 비만동물 모델의 대사질환에 효과가 있다는 것이 확인되었으며²⁵, 구성 약재인 황금과 황련은 지질대사 관련 동물실험에서도 뛰어난 조절효과가 있다고 보고되었다²⁶. 하지만 삼황사심탕의 명확한 adipogenesis 억제 분자생물학적 기전연구가 이루어지지 않았다. 따라서 본 연

구는 삼황사심탕의 adipogenesis 억제 기전을 세포수준으로서 연구하여 항비만 소재의 가능성을 제시하였다.

이상의 결과들로 65종의 한약처방 중 유의적으로 지방 축적 억제 및 항비만 효과를 지닌 소재로서는 반하사심탕과 삼황사심탕 한약처방이 선정되었고, 이러한 한약처방은 항비만 관련 천연 소재 개발에 기여할 것으로 생각한다.

결론

본 연구에서는 3T3-L1 지방 전구 세포에서 지방 분화를 유도하며 65종의 한약처방이 지방축적 및 세포내 지방분화 매개 인자에 미치는 영향을 검증하여 유의한 한약처방을 발굴하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군인 HCA 500 nM에 비해 65종 한약처방 중 감맥대조탕, 귀기건중탕, 길경탕, 반하사심탕, 방기황기탕, 삼황사심탕, 소시호탕, 시호계지탕, 온청음, 향소산, 향사평위산, 황기건중탕, 황련해독탕으로 총 13종의 한약처방이 지방전구세포 분화를 유의하게 억제함을 Oil Red O 염색으로 확인하였다.
2. 65종 한약처방 중 감맥대조탕, 귀기건중탕, 길경탕, 반하사심탕, 방기황기탕, 삼황사심탕, 소시호탕, 시호계지탕, 온청음, 향소산, 향사평위산, 황기건중탕, 황련해독탕 총 13종의 한약처방 50-500 µg/mL 농도 구간에서 지방전구세포의 독성이 없음을 확인하였다.
3. 대조군인 HCA 100 nM에 비해 13종의 선택된 한약처방 중 반하사심탕과 삼황사심탕이 50-200 µg/mL에서 농도 의존적으로 지방전구세포 분화를 유의하게 억제함을 Oil Red O 염색으로 확인하였다.
4. 대조군인 HCA 100 nM에 비해 13종의 선택된 한약처방 중 반하사심탕과 삼황사심탕이 지방분화 전사인자인 C/EBPα 및 PPAR-γ를 농도 의존적으로 유의하게 억제함을 유전자 및 단백질 발현량으로 확인하였다.

이상의 연구결과는 반하사심탕 및 삼황사심탕의 유의한 항비만 활성을 통한 항비만 개선 소재로서의 가능성을 보여준다. 추후 심층적으로 동물실험 및 임상 연구가 추가로 필요하며, 결과를 바탕으로 한약제제의 적응증 확대에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 생각한다.

References

1. Yoo SR, Seo CS, Kim OS, Shin HK, Jeong SJ. Anti-adipogenic and antioxidant effects of the traditional Korean herbal formula Samchulgeonbitang: an in vitro study. *Int J Clin Exp Med*. 2015 ; 8(6) : 8698-708.
2. Lee JS, Lee SH. The reductive effects of oriental medicine on the body fat and abdominal obesity. *J Korean Soc Study Obes*. 2001 ; 1 : 33-42.
3. Korea Centers for Disease Control and Prevention. 2009 Korea national health and nutrition and examination survey. Seoul : Ministry of Health and Welfare. 2010.
4. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 ; 404 : 635-43.
5. Fujioka K, Seaton TB, Rowe E, Jelinek CA, Raskin P, Levovitz HE, et al. Weight loss with sibutramine improves glycaemic control and other metabolic parameters in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*. 2000 ; 2(3) : 175-87.
6. McMahon FG, Fujioka K, Singh BN, Mendel CM, Rowe E, Rolston K, et al. Efficacy and safety of sibutramine in obese white and African American patients with hypertension: a 1-year, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Arch Intern Med*. 2000 ; 160(14) : 2185-91.
7. Sui Y, Hui HL, Wong VCW, Brown N, Li XL, Hui HLW, et al. A systematic review on use of Chinese medicine and acupuncture for treatment of obesity. *Obesity Reviews*. 2012 ; 13(5) : 409-30.
8. Xu L, Zhao W, Wang D, Ma X. Chinese medicine in the battle against obesity and metabolic diseases. *Front Physiol*. 2018 ; 9 : 850.
9. Fu C, Jiang Y, Guo J, Su Z. Natural products with anti-obesity effects and different mechanisms of action. *J Agric Food Chem*. 2016 ; 64(51) : 9571-85.
10. Otto TC, Lane MD. Adipose development : from stem cell to adipocyte. *Rev Biochem Mol Biol*. 2005 ; 40 : 229-42.
11. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974 ; 3 : 127-33.
12. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998 ; 78 : 783-809.

13. Green H, Kehinde O. Sublines of mouse 3T3cells that accumulate lipid. *Cell*. 1974 ; 1 : 113-6.
14. Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutritional Biochemistry*. 2008 ; 19 : 717-26.
15. Dave S, Kaur NJ, Nanduri R, Dkhar HK, Kumar A, Gupta P. Inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis and lipolysis by stem bromelanin in 3T3-L1 adipocytes. *PLos One*. 2012 ; 7 : e30831.
16. Rosen ED. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 ; 73 : 31-4.
17. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004 ; 10 : 355-61.
18. Yoon KY. Dongui imsang bangjehak. Seoul : Myoung Bo Press. 1985 : 50.
19. Lu HY, Cai JF, Du LB, Wang Z, Ye WW, Lou CJ. Study on improvement of Banxia Xiexin decoction against irinotecan-induced injury of stomach in nude mice bearing human small-cell lung cancer. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*. 2012 ; 30(6) : 1289-90.
20. Shin MR, Seo BI, Son CG, Roh SS, An HJ. Banhasasim-tang treatment reduces the severity of esophageal mucosal ulcer on chronic acid reflux esophagitis in rats. *BioMed Research International*. 2017 ; 2017 : 7157212.
21. Zhou FX, Chen YL, Pang YF, Wu YS. Effects of Banxia Xiexin decoction and its components on cell cycle and apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*. 2012 ; 18(23) : 203-6.
22. Lu HY, Cai JF, Du LB, Wang Z, Ye WW, Lou CJ. Study on improvement of Banxia Xiexin decoction against irinotecan-induced injury of stomach in nude mice bearing human small-cell lung cancer. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*. 2012 ; 30(6) : 1289-90.
23. Jin SE, Lim HS, Kim Y, Seo CS, Yoo SR, Shin HK, et al. Traditional herbal formula banhasasim-tang exerts anti-inflammatory effects in RAW 264.7 macrophages and HaCaT keratinocytes. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015 ; 2015 : 728380.
24. Zhang F, Sun X, Qiu G, Zhou X, Liu T, Xiushen H. Study regulation of Banxi Xiexin decoction of fasting blood-glucose and gastrointestinal hormones of diabetic rats. *China Press of Traditional Chinese Medicine*. 2014 ; 30(1) : 8-10.
25. Lee JY, Yoon BK. Effects of Samhwangsasim-tang on obesity-related metabolic disease in mice. *Dept. of Korean Medicine*. 2014 ; 22(1) : 93-104.
26. Yoon HJ, Park YS. Effects of scutellaria baicalensis water extract on lipid metabolism and antioxidant defense system in rats fed high fat diet. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2010 ; 39(2) : 219-26.