

혼합추출 및 개별추출 방식의 삼정환의 항산화 및 항비만효과

한경선 · 왕경화 · 임동우¹ · 진영원² · 최영희² · 최한석³ · 이명종 · 김호준

동국대학교 일산한방병원 한방재활의학과, ¹동국대학교 한의과대학 한방병리학교실, ²동국대학교 약학대학 약학교실, ³동국대학교 의과대학 내분비내과학교실

Anti-Oxidative and Anti-Obesity Effect of Combined Extract and Individual Extract of Samjunghwan

Kyungsun Han, Jinghua Wang, Dongwoo Lim¹, Young-Won Chin², Young Hee Choi², Han-Seok Choi³, Myeong-Jong Lee, Hojun Kim

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, Dongguk University Ilsan Oriental Hospital,

¹Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Dongguk University,

²Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Dongguk University,

³Department of Endocrinology Medicine, College of Medicine, Dongguk University

Received: November 15, 2014

Revised: December 2, 2014

Accepted: December 4, 2014

Correspondence to: Hojun Kim
Department of Oriental Rehabilitation
Medicine, Dongguk University Ilsan
Oriental Hospital, College of Oriental
Medicine, Dongguk University, 27
Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang
410-773, Korea
Tel: +82-31-961-9111
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2014 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: This study is to confirm the effect of combined extract and individual extract of Samjunghwan (SJH) in anti-oxidative and anti-obesity effect.

Methods: Combined ethanol extract of readily made SJH and individual ethanol extract of *Atractylodes japonica*, *Cortex lycii radialis*, and *Morus alba Linne* was combined after the extraction. To evaluate the anti-oxidative effect of SJH, total phenol compound and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging ability were conducted. Real-time quantitative-polymerase chain reaction analysis of transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)- α 1, tumor necrosis factor- α (TNF α) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMG-CoA reductase) were done with 3T3-L1 cells to investigate the anti-obesity effect. Also, cell viability analysis were done to see to toxicity of SJH.

Results: Individual extract of SJH showed significant decrease in TNF α and AMPK transcription while PPAR γ showed significant increase. Combined extract and individual extract of SJH both showed decrease in HMG-CoA reductase. DPPH free radical scavenging ability and total phenol compound was analogous between two groups.

Conclusions: Individual extract of SJH appears to be more effective in anti-oxidation and anti-obesity effect compared to combined extract of SJH.

Key Words: Samjunghwan, Obesity, Antioxidants

서론

대사증후군은 에너지의 섭취와 소비간의 불균형에 의해 발생할 수 있는 여러 가지 질병상황 중 비만, 혈압의 상승, 혈당의 상승, 중성지방의 상승, 고밀도 콜레스테롤의 감소 중 세 가지 이상 충족시키는 것으로 정의하는데¹⁾, 이 중 복부비만은 대사증후군의 중요한 요소 중 하나이다. 내장지방

에 의해 상승된 혈중 종양괴사인자알파(tumor necrosis factor- α , TNF α)의 증가는 인슐린 저항성을 유발시킬 뿐 아니라, 염증성 사이토카인의 생성을 증가시키고 이로 인해 만성 염증이 지속되면 고혈압, 동맥경화, 당뇨의 위험성을 더욱 증가시켜 악순환을 유발하게 된다²⁾. 서구화된 식습관 및 스트레스 등 복합적인 요인에 의해 대사증후군의 발병은 급격히 증가하고 있으며, 이에 따라 기존의 비만 및 대사증

후군의 치료와 더불어 천연물 및 한약재의 효과에 대한 연구 역시 활발히 이루어지고 있다^{3,4)}.

삼정환(Samjunghwan)은 동의보감에서 오랫동안 복용하면 몸이 가벼워지고 수명을 연장시킬 수 있고, 얼굴이 동자와 같이 된다(久服輕身 延年益壽 面如童子)고 기재되어 있다. 또한 간장과 신장을 자양하고 비장을 튼튼히 하며 습을 말리는 효능이 있다고 하였다(滋補肝腎 健脾燥濕). 한의학적으로 습은 현대의학적인 비만, 고지혈증 등 대사질환과의 관련성이 있으며 삼정환을 구성하고 있는 창출(*Atractylodes japonica*)⁵⁾, 지골피(*Cortex lycii radices*)⁶⁾, 상삼자(*Morus alba Linne*)⁷⁾의 항고지혈증, 항산화, 혈압강하효과 등은 이미 알려진 바 있어 대사증후군 및 비만치료에 응용할 수 있을 것으로 판단하였다. 삼정환 역시 여러 세포실험 및 동물실험 연구에서 삼정환의 면역반응 개선효과⁸⁾, 신경보호효과⁹⁾, 항우울효과^{10,11)} 등이 밝혀진 바 있으나, 이 중 항비만 효과 또한 많은 비중을 차지하고 있다¹²⁻¹⁴⁾. 그러나 삼정환에 대한 기존 연구들은 모두 삼정환을 열수 추출 혹은 에탄올 추출을 한 방식으로 실험에 사용을 하였고 각각의 약재를 혼합한 상태로 추출한 것과 복합추출을 한 결과를 비교한 연구는 없었다.

한약은 약물의 형태에 따라 탕제, 환제, 산제, 고제 등 다양한 형태로 존재하며 이 중 가장 널리 사용하는 방식인 탕제 이외에도 등근 형태로 약물을 배합하여 만든 환제의 경우 흡수가 완만해 약효가 오래 지속되어 만성 질병에 응용한다고 하며, 산제의 경우 약물을 가루 내어 고르게 배합한 것으로 흡수를 빠르게 한다는 장점이 있다. 게다가 탕전의 형태의 한약은 복용상 편의 및 보관 등의 제약이 많아 선호도가 줄고 있는 실정이다¹⁵⁾. 삼정환의 경우 환제로 복용하는 대표적인 처방이나 약물을 추출하는 과정에서 각각의 한약재의 특성을 살리기 위한 개별추출 방법 및 혼합추출방법의 비교에 대해 아직 밝혀진 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 삼정환을 혼합추출한 군과 세 가지 구성 약물들을 각각 추출하여 혼합한 개별 추출군을 나누어 비교한 실험을 하였다. 삼정환의 혼합추출물과 개별추출물을 통해 항산화효과의 지표에 해당하는 총 페놀 함량과 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 자유라디칼 소거 활성, 세포생존율, TNF α 전사인자의 유전자발현 변화를 분석하였으며, 항비만 효과를 규명하기 위해 세포실험을 통

한 지방분해 관련 전사인자인 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMG-CoA reductase), adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)의 발현을 확인하였다.

대상 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용한 삼정환 및 삼정환의 재료인 상삼자, 지골피, 창출은 동국대학교 일산한방병원에서 구입하였다. 실험에 사용된 삼정환은 상삼자, 지골피, 창출을 일정 비율(3:1:1)로 구성하여 21 g 및 20 g의 건조 시료를 준비하였다. 각각의 건조 시료에 30% 에탄올(100 ml)을 첨가하여 1 시간 열탕 추출을 진행하여 추출액을 얻었으며, 이를 감압 농축하여 1.5 g (3:1:1 혼합 시료)을 확보하였다.

2. 3T3-L1 세포의 배양 및 분화유도

마우스 지방전구세포인 3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 사용하였다. 배양은 Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 10% fetal bovine serum (Invitrogen)과 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)를 첨가하여 5% CO₂, 37°C의 환경에서 배양하였다. 세포가 100% confluent한 상태가 되면 4 \times 10³ cells/well의 밀도로 96 well에 분주한 후 48시간 배양하였다. 이후 DMEM에 1 μ M dexamethasone (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 μ g/ml insulin (Sigma Aldrich), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Calbiochem, Darmstadt, Germany)이 첨가된 분화배지를 사용하여 72시간 동안 분화를 유도한 후 분화된 지방세포에 혼합추출 삼정환과 개별추출 삼정환 시료를 각각 Oil red O staining을 위해 well당 200 μ g/ml의 농도로 처리하였고, 대조군으로는 약물처리 없이 동일한 양의 배지만을 첨가하였다. 세포생존을 실험을 위해서는 2 \times 10³ cells/well의 농도로 96 well plate에 배양한 후 분화를 유도시키지 않은 채 복합추출 삼정환과 개별

추출 삼정환을 각각 농도별로(50, 100, 200, 400 µg/ml) 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 Ex-cytox assay를 통한 세포 생존율을 구하였다. Real-time polymerase chain reaction (PCR)법에는 분화시키지 않은 3T3-L1세포를 사용하였다.

3. DPPH 자유라디칼 소거능

한약재의 자유라디칼 소거활성을 확인하기 위하여 자유라디칼인 DPPH (Sigma Aldrich)에 대한 환원력을 측정하였는데, 각 군별 삼정환을 희석하여 농도별로(0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/ml) 준비하였다. DPPH를 에탄올에 녹여 300 µM DPPH/EtOH를 준비하고 760 µl당 각 샘플 40 µl를 혼합하였다. 혼합한 시료들을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 96 well plate에 옮겨 VersaMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 515 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다. Free radical의 억제율 (inhibition rate)은 하기 공식을 통해 구하였다.

$$\text{Inhibition rate} = (\text{control optical density [O.D]} - \text{sample O.D}) / \text{control O.D} \times 100$$

4. 총 페놀함량 분석

총 페놀함량은 Folin-Ciocalteu 방법¹⁶⁾을 이용하여 실험하였다. 혼합추출한 삼정환과 개별추출을 통해 얻은 삼정환, gallic acid를 각각 40 µl씩 Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma Aldrich) 200 µl, 증류수 1,160 µl와 함께 혼합한 후 실온에서 3분 동안 반응시켰다. 반응물에 20% sodium carbonate 600 µl를 첨가하여 어두운 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 UV ELISA microplate reader를 이용해 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 표준물질인 gallic acid를 이용하여 작성된 표준곡선으로부터 총 페놀 함량을 환산하였다.

5. Oil red O 염색

약재를 처리한 분화된 3T3-L1세포의 배지를 모두 제거한 후 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 10% formaldehyde 용액으로 5분간 상온에서 반응시켰다. 반응시킨 formaldehyde 용액을 버리고 새로운 10% formaldehyde

용액을 가하여 parafilm을 이용해 밀봉한 뒤 1시간 동안 추가적으로 고정시켰다. Formaldehyde 용액을 버린 후 60% isopropanol을 통해 세척하여 완전히 마르도록 기다리고 Oil red O working solution (Sigma Aldrich)을 첨가하여 상온에서 10분간 염색한 후 용액을 제거하여 즉시 증류수로 세척하였다. 염색된 지방세포는 100% isopropanol로 용해하여 충분히 pipetting한 시료를 96 well plate에 1 ml씩 분주하여 UV ELISA microplate reader를 이용해 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 대조군에 대한 상대적인 값을 구하기 위해 하기 공식을 사용하였다.

$$\text{Relative absorbance value} = (\text{experimental value} / \text{control}) \times 100$$

6. 세포생존율

세포생존율의 측정은 Water soluble tetrazolium salt (WST)를 이용한 EZ-Cytox enhanced cytotoxicity assay kit (iTSBiO, Seoul, Korea)를 사용하였다. 약재를 처리한 분화된 3T3-L1세포에 한 개의 well당 10 µl의 WST solution을 첨가하여 배양기에서 2시간 동안 반응시킨 후 UV ELISA microplate reader를 이용해 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 대조군에 대한 상대적인 값을 구하기 위해 하기 공식을 사용하였다.

$$\text{Relative absorbance value} = (\text{experimental value} / \text{control}) \times 100$$

7. Real-time PCR

분화시키지 않은 미분화 지방세포에 배지만을 사용한 대조군과 복합추출 혹은 개별추출 삼정환을 가한 후 2시간 동안 배양시킨 후 배지를 제거하여 PBS로 세척하여 Trizole reagent (Invitrogen)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 각 군에서 얻은 2 µg의 RNA는 cDNA synthesis kit (Sprint™ RT Complete Oligo(dT)18; Clontech, Mountain View, CA, USA)를 이용해 역전사하였다. 각 시료는 Light-Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green (Roche, Indianapolis, ID, USA)과 각 primer (Table 1)를 사용해 LightCycler instrument (Roche 480 real time PCR system)를 통해 진행하였다. PCR 증폭은 초기변성 95°C 10초, 적정 변동온도(Table 1)에 따라 10초, 신장반응 72°C

Table 1. Primer Sequences Used for Gene Expression Analysis

Gene name	Primer sequence	OAT (°C)
HMG-CoA	5'-GTAAGCGCAGTTCCTTCCGC-3' 5'-TTGTAGCCTCACAGTCCTTGG-3'	58
AMPK- α 1	5'-AAGCCGACCCAATGACATCA-3' 5'-CTTCCTTCGTACACGCAAAT-3'	52
TNF α	5'-GAACTGGCAGAAGAGGCACT-3' 5'-AGG GTC TGG GCC ATA GAAC-3'	60
PPAR γ	5'-GCCCTTTGGTGACTTTATGG-3' 5'-CAGCAGGTTGTCTTGGATGT-3'	53
Beta-actin	5'-GCAAGTGCTTCTAGGCGGAC-3' 5'-AAGAAAGGGTGTAAAACGCAGC-3'	56

OAT: optimal annealing temperature, HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, AMPK: adenosine monophosphate-activated protein kinase, TNF: tumor necrosis factor, PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor.

15초로 하여 cycle 동안 진행하였다. 실험결과는 Light-Cycler Software (Roche)를 통해 분석하였고 유전자의 발현량은 $2^{-(\Delta Ct)}$ 를 구하는 방식으로 계산하였으며, 결과는 house keeping gene β -actin을 나누어 상대적인 값을 측정하였다.

8. 통계방법

측정값은 평균(mean)과 표준편차(standard deviation)로 표시하였으며, 각 실험군 간의 통계적인 분석은 Student's t-test (IBM SPSS version 20.0.0 for Windows; IBM, Armonk, NY, USA)를 통해 시행하였다. 모든 실험은 1회 시행하였으며, Oil red O 염색, DPPH 자유라디칼 소거능, 총 페놀함량 분석, 세포생존율 실험은 3개의 well을 사용해 측정된 평균값을 사용하였고, real-time PCR은 2개의 well의 평균값을 사용하였다. 통계적인 유의성은 P-value가 0.05 이하인 경우에 유의한 결과로 인정하였다.

결과, 고찰 및 결론

1. 항산화효과에 대한 혼합추출물과 개별추출물 비교

삼정환에 포함된 총 페놀 함량을 비교한 결과 혼합추출물의 경우 16.65 mg/g 함유되어 있는 반면, 개별추출물의 경우 17.87 mg/g으로 개별추출물에 더욱 많은 페놀이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 천연물에 많이 함유되어 있는 페놀화합물은 자유라디칼을 소거함으로써 항산화 역할에 기여한다는 연구가 보고되어 왔으며¹⁷⁾, 건조된 상삼자와 상

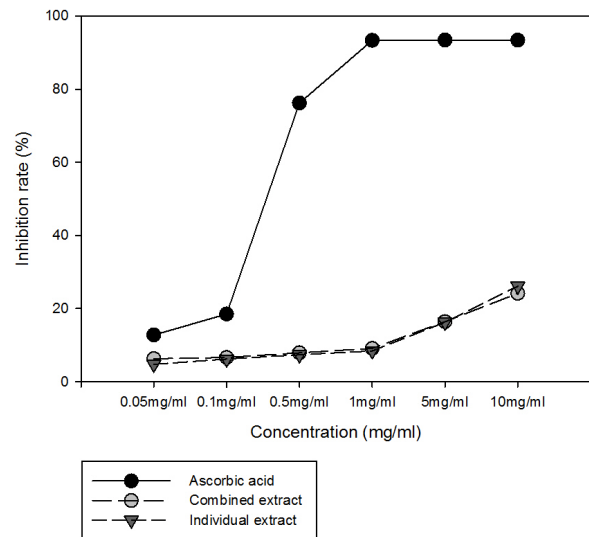


Fig. 1. Comparison between combined extract of Samjungwan (SJH) and individual extract of SJH on 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical inhibition analysis. Ascorbic acid is used as a positive control.

삼자 농축액을 비교한 한 연구에서는 시료농도가 0.2 mg/ml일 때 건조 상삼자에는 0.039 mg/ml, 상삼자 농축액에는 0.24 mg/ml의 페놀이 함유되어 있는 것을 확인하였는데¹⁸⁾, 본 실험에 사용한 상삼자는 건조 상삼자로 전통적인 방식으로 상삼자 즙을 사용한 삼정환보다 총 페놀함량이 낮게 함유되어 있을 것으로 유추할 수 있었다.

항산화활성을 확인하기 위한 방법 중 DPPH 자유라디칼 소거능의 경우 안정적인 라디칼에 해당하는 DPPH를 소거시키는 능력에 대한 측정방법으로 짙은 자색을 띠는 DPPH가 방향족 아민류 등에 의해 환원이 되어 색이 변화하는 것을 통해 자유라디칼 소거능을 확인하는 방법이다¹⁹⁾. 삼정환의 추출방법에 따라 농도별로 자유라디칼의 소거능을 확인한 결과 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었으나 혼합추출물과 개별추출물 간의 차이는 크게 나타나지 않았다(Fig. 1).

대사질환 및 비만에서의 주요한 인자로 알려져 있는 TNF α 는 활성화된 대식세포에 의해 분비되는 염증성 사이토카인 중 하나로, 면역세포를 조절하고 대사질환에서 유발된 만성 염증의 주요한 인자로 알려져 있다²⁰⁾. 삼정환을 투약했을 때 분화된 3T3-L1 세포에서 TNF α 의 유전자발현을 억제시키는 정도에 대해 실험을 한 결과, 혼합추출물과 개별추출물 모두 대조군에 비해 TNF α 의 발현을 억제시키

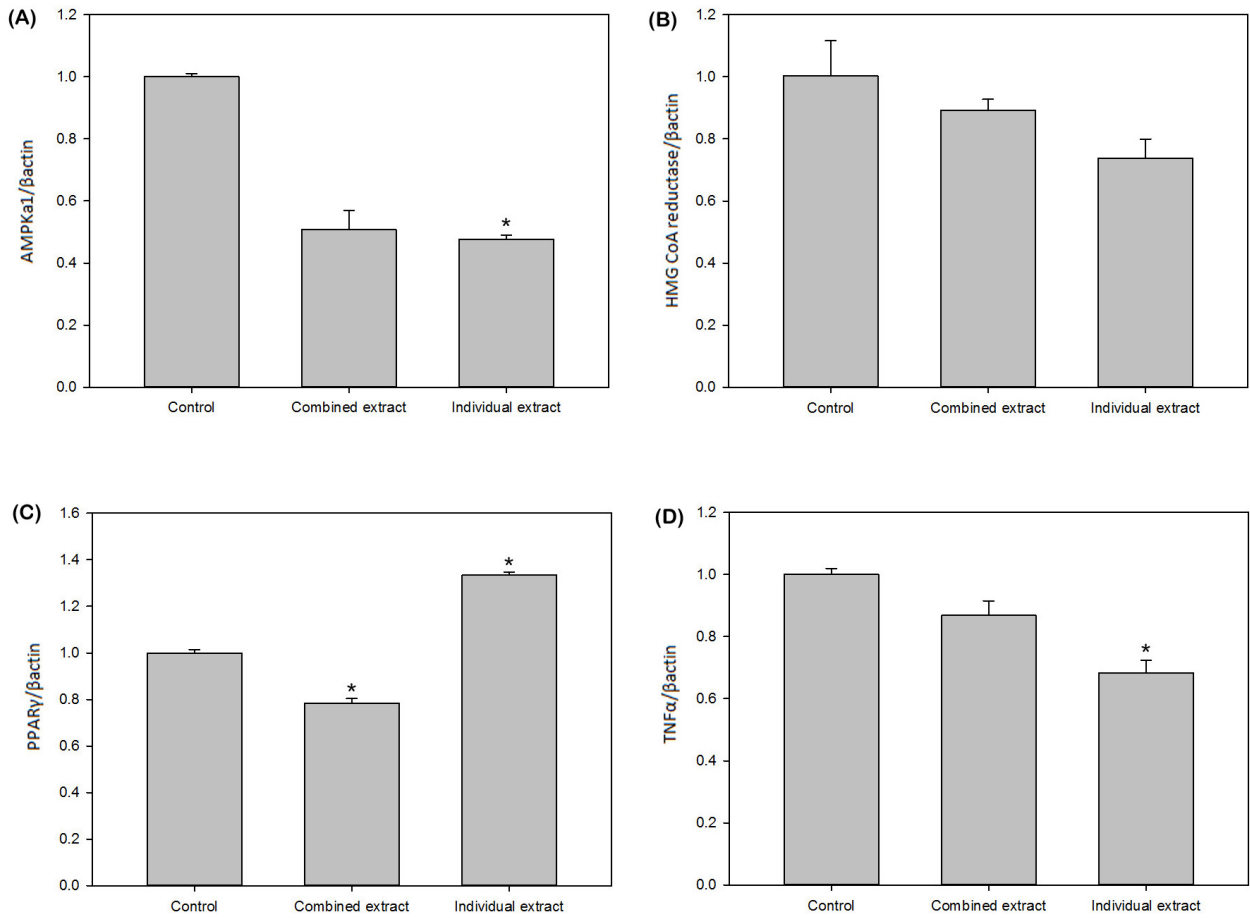


Fig. 2. Real-time quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) analysis. (A) Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-α1/βactin, (B) 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMG-CoA reductase)/βactin, (C) peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ)/βactin (D) tumor necrosis factor-α (TNFα)/βactin. Data shown in mean ± standard deviation. *P < 0.05.

는 것을 확인할 수 있었으나 개별추출물을 처리한 지방세포에서 TNFα의 유전자 발현이 더욱 유의성 있는 감소를 나타냈다(Fig. 2D, P=0.026).

2. 세포생존율에 대한 혼합추출물과 개별추출물 비교

마우스 지방전구세포인 3T3-L1 세포를 지방세포로 분화시켜 삼정환 추출물을 농도별로 2시간 동안 처리한 결과 복합추출물 및 개별추출물 간의 농도별 세포생존율은 비슷한 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있었는데, 본 실험에서는 수용성 tetrazolium salt (WST)를 살아있는 세포와 반응시켜 수용성 formazan을 생성한 결과물의 흡광도를 측정해 세포가 얼마나 살아있는지 확인하는 방법인 WST assay를 이용하였다. 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 50 μg/ml, 100 μg/ml의 삼정환을 처리한 실험군에서는 혼합추출물과 개

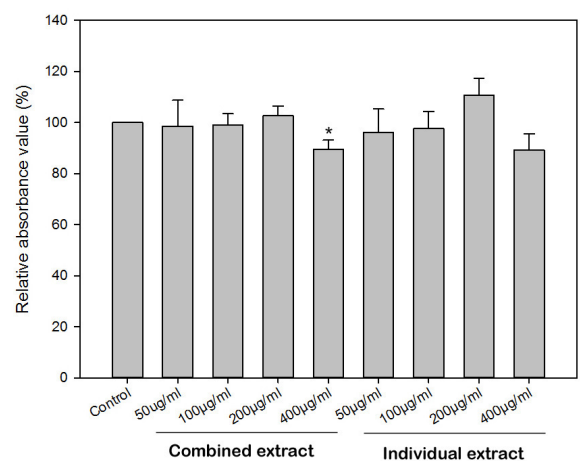


Fig. 3. Comparison between combined extract of Samjungwan (SJH) and individual extract of SJH on 3T3-L1 cell viability, Data shown in mean ± standard deviation. *P < 0.05. Relative absorbance value=(experimental value/control) × 100.

별추출물 모두 아무것도 처리하지 않은 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았고, 혼합추출물 및 개별추출물 모두 200 µg/ml의 농도에서는 오히려 혼합추출물의 경우 2.63%, 개별추출물의 경우 10.58% 세포생존율을 증가시키는 결과를 나타낸 반면, 400 µg/ml의 농도에는 혼합추출물에서는 10.40%, 개별추출물에서는 10.71%로 모두 오히려 세포생존율을 감소시키는 것을 확인할 수 있었으나, 400 µg/ml의 혼합추출물(P=0.037)을 제외한 결과는 모두 유의성 있는 결과를 보이지는 않았다. 이러한 세포생존의 경향성으로 미루어 보아 삼정환 역시 일정 농도 이상에서는 오히려 세포독성을 나타낼 수 있으나 적정농도에서는 오히려 세포의 증식을 증가시키는 것을 의미하며 그 정도는 혼합추출물보다 개별추출물에서 더욱 효과가 뛰어난 것을 알 수 있었다.

3. 항비만효과에 대한 혼합추출물과 개별추출물 비교

분화된 3T3-L1 지방세포에 삼정환을 처리한 Oil red O 실험에서 염색된 지방구에 의한 흡광도는 삼정환의 혼합추출물에서는 흡광도가 대조군에 비해 0.87% 정도 미약하게 증가한 것을 확인할 수 있었고, 개별추출물의 경우 25.78% 감소한 것을 알 수 있었지만 두 군 모두 유의성은 크게 관찰되지 않았다(Fig. 4).

삼정환을 처리했을 때 3T3-L1세포 내 비만과 관련된 유전자의 발현 변화를 확인하기 위해 real-time qPCR 실험을 한 결과는 Fig. 2A, B, C에 나타내었다. AMPK-α1은 세포 내 adenosine monophosphate를 감지하는 센서의 역할로서

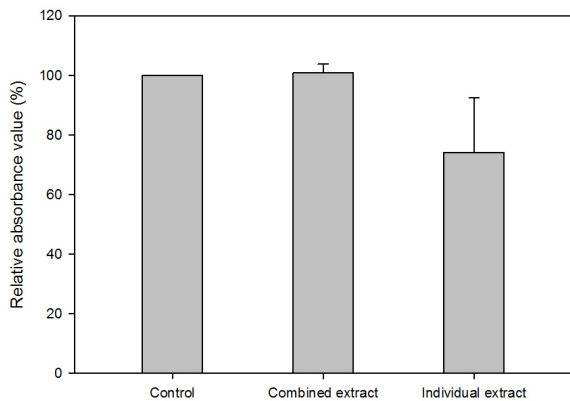


Fig. 4. Oil red O staining analysis. Data shown in mean±standard deviation, Relative absorbance value=(experimental value/control) × 100.

ATP 소모는 억제하고 ATP를 합성하는 신호전달경로를 활성화하여 세포 외의 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 단백질로²¹⁾, AMPK의 다양한 생리기능 중에서도 대표적인 기능은 항비만 효과와 관련된 타겟 분자로 작용한다는 것이다²²⁾. 본 연구에서의 실험결과, 대조군(1.0±0.01)에 비해 AMPK의 유전자발현이 삼정환을 투약한 두 군 모두 혼합추출군 0.51±.006과 개별추출군 0.48±0.01로 크게 감소한 것을 알 수 있었으며 개별추출군에서만 유의성 있는 결과를 얻을 수 있었다(P=0.001).

AMPK와 함께 항비만 효과에서 중요한 역할을 하고 있는 PPARγ는 핵의 호르몬 수용체로 포도당 대사, 지방산 산화 및 지질대사에 관여하는 여러 유전자들의 발현을 조절하는 역할을 한다. PPARα의 경우 근육과 간세포에 주로 분포하고 활성물질인 fibrate가 중성지방을 낮추고 고밀도콜레스테롤을 상승시키는 반면, PPARγ는 지방세포에 존재하여 지방분화를 조절하는 역할을 한다고 알려져 있다²³⁾. 이에 임상에서는 PPARα/PPARγ agonist를 인슐린저항성 개선 및 혈당조절을 위한 치료제로 사용하고 있다²⁴⁾. 삼정환의 혼합추출물을 처리한 군에서는 대조군에 비해 오히려 PPARγ의 발현이 감소한 것을 알 수 있었던 반면(P=0.008), 개별추출물을 처리한 군에서는 PPARγ의 발현이 유의성 있게 증가하였다(P=0.002). 이는 삼정환을 개별추출할 경우 지방분화를 조절하고 인슐린저항성을 낮추는 역할을 한다는 것을 시사하며, 추후 PPARα의 유전자발현을 함께 분석한다면 혈당 및 지질대사를 함께 개선할 수 있는 가능성을 다시 한 번 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

고지혈증 치료제로 임상적으로 널리 쓰이고 있는 statin 계열의 약물들은 콜레스테롤의 생성 단계 중 mevalonate pathway에서 HMG-CoA가 mevonic acid로 환원되는 과정을 유도하는 HMG-CoA reductase의 활성을 억제하는 방식으로 콜레스테롤의 합성을 저하는 기전을 갖고, 이를 통틀어 HMG-CoA reductase 저해제라고 한다²⁵⁾. 지질합성의 과정에서의 삼정환의 작용을 살펴보기 위해 HMG-CoA reductase의 유전자발현을 실험한 결과, 삼정환의 혼합추출물과 개별추출물 모두 대조군에 비해 HMG-CoA reductase의 발현이 억제된 것을 알 수 있었고, 개별추출군에서 더욱 그 효과가 큰 것으로 나타났지만 두 군 모두 유의성있는 결과는 얻지 못했다.

위 결과를 종합적으로 살펴보면 삼정환의 혼합추출물과 개별추출물 모두 대조군에 비해 지질대사 개선효과 및 항산화효과를 갖는 것을 알 수 있었으나, 그 효과는 대부분 개별추출물에서 더욱 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 전통적으로 한약을 제조하는 방법에서 삼정환이 한약재를 한꺼번에 넣고 달이는 탕전의 형태가 아닌 갈아서 혼합해 사용한 환제로 사용한 데 대한 이유를 역으로 추론할 수 있는 계기를 마련해주었다. 이에 추후 한약의 효능에 대한 실험을 시행할 때 제형 및 추출방법에 대해 고려를 해 실험을 한다면 더욱 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이라고 판단하였다. 그러나 본 연구의 한계점은 대사질환의 개선에 효능이 밝혀진 상삼자의 구성약재의 개별사용과 함께 비교하지 못한 점을 들 수 있다. 각 한약재의 효능과 삼정환의 효능을 함께 비교한 것과 더 나아가 열수추출물 등 다양한 추출 방식에 대한 비교에 대해서도 추후 연구되어야 할 것이다.

4. 요약

본 연구에서는 삼정환의 혼합추출물과 개별추출물을 비교하여 항산화에 중요한 역할을 하고 있는 총 페놀 함량과 DPPH 자유라디칼 소거능 및 TNF α 의 유전자발현변화를 분석하였고, 항비만과 지질대사개선에 밀접한 요소인 AMPK- α 1, HMG-CoA reductase, PPAR γ 의 유전자 발현 변화와 3T3-L1세포에서 Oil red O 실험을 하여 세포 내 지방구 함량의 변화를 살펴보았다. DPPH 자유라디칼 소거능은 두 군에서 큰 차이를 보이지 않았으며, 3T3-L1세포의 세포생존율은 삼정환의 혼합추출물과 개별추출물에서 모두 200 μ g/ml의 농도에서 높은 생존율을 보였다. 총 페놀함량 역시 개별추출물에서 더욱 많이 나타난 것을 알 수 있었으나, 종합적으로 항산화능력은 혼합추출물과 개별추출물이 유사한 것으로 나타났다. 비만과 관련성 있는 지질대사와 관련된 지표들을 분석해본 결과, Oil red O staining에서 혼합추출물을 처리한 군은 대조군과 큰 차이를 보이지 않은 반면, 개별추출물에서 지방구의 수가 감소한 것을 확인하였고, 항비만 효과에 주요한 타깃 유전자로 알려져 있는 AMPK- α 1과 PPAR γ 모두 혼합추출물에 비해 개별추출물에서 유의성 있는 변화를 확인하였다. 지질대사를 활성화시키는 HMG-CoA reductase 역시 유의성 있는 효과는 확인하지 못했으나 개별추출물에서 더욱 감소된 것을 알 수 있

었다. 종합적으로, 삼정환을 혼합한 상태로 추출을 한 것보다 개별 약재를 추출한 것을 혼합하여 사용한 개별추출군이 항산화 및 항비만 효과에 더 나은 효능이 있는 것을 확인하였고, 이는 기존 환제의 제형으로 사용하던 약제의 실험에서 추출방법 및 제형에 더욱 심도 있는 연구가 필요하다는 것을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원을 통해 보건복지부 ‘한의약 선도기술개발사업’의 재정 지원을 받아 수행된 연구임 (과제고유번호: HI14C0556).

References

1. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004 ; 109(3) : 433-8.
2. Hotamisligil GS. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med*. 1999 ; 245(6) : 621-5.
3. Moon GA. Human and animal study on the natural food for obesity and metabolic syndrome risk factors. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2003 ; 32(8) : 1394-400.
4. Kim DW. Study on the changes in the blood lipid profile levels of patients with metabolic syndrome while receiving oriental medicine treatments. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2009 ; 23(2) : 512-9.
5. Kim YC, Jun M, Jeong WS, Chung SK. antioxidant properties of flavone C-glycosides from atractylodes japonica leaves in human low-density lipoprotein oxidation. *J Food Sci*. 2005 ; 70(9) : S575-80.
6. Gao D, Li Q, Liu Z, Li Y, Liu Z, Fan Y, et al. Hypoglycemic effects and mechanisms of action of Cortex Lycii Radicis on alloxan-induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi*. 2007 ; 127(10) : 1715-21.
7. Kim AJ, Park SJ, Rho JO. Mulberry fruit extract consumption is inversely associated with hyperlipidemia in middle-aged men. *Korean J Food Nutr*. 2008 ; 21(2) : 121-6.
8. Kim SY, Jeong JC. Effects of Samjunghwan on the IL-1 Gene expression in the macrophage. *Korean J Orient Intern Med*. 2006 ; 27(1) : 228-36.
9. Kim HG, Ju MS, Park H, Seo Y, Jang YP, Hong J, et al.

- Evaluation of Samjunghwan, a traditional medicine, for neuroprotection against damage by amyloid-beta in rat cortical neurons. *J Ethnopharmacol.* 2010 ; 130(3) : 625-30.
10. Lee S, Kim G, Koo B. Experimental study on the antidepressant effect of Sam-Jeong-Hwan. *J Orient Neuropsychiatry.* 2008 ; 19(3) : 101-15.
 11. Lee DJ, Jeong JC. Peroxynitrite scavenging activity of Samjunghwan. *Korean J Orient Intern Med.* 2006 ; 27(1) : 178-87.
 12. Song M, Bose S, Kim H. Effect of probiotics-fermented Samjunghwan on differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2013 ; 42(1) : 1-7.
 13. Jeong HJ, Kim SY, Jeong JC. Effects of Samjunghwan on obesity and lipid metabolism in high fat diet rats. *J Korean Orient Med.* 2006 ; 27(3) : 24-35.
 14. Song M, Bose S, Kim H. Anti-obesity effects of fermented Samjung-hwan in high fat diet rats. *J Korean Med Obes Res.* 2013 ; 13(1) : 17-23.
 15. Kim Y, Kim S, Chang H, Park J, Jeong M, Park Y. Survey on the preference formula for the improvement of oriental herbal medicine insurance. *Korean J Herbol.* 2009 ; 24(4) : 17-23.
 16. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protoc.* 2007 ; 2(4) : 875-7.
 17. Prakash D, Suri S, Upadhyay G, Singh BN. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *Int J Food Sci Nutr.* 2007 ; 58(1) : 18-28.
 18. Jeon HL, Hong YP, Lee JH, Kim HD, Kim MR. Antioxidant activities and quality characteristics of mulberry concentrate, freeze-dried mulberry, and pomace. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012 ; 41(10) : 1402-8.
 19. Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Brée F, Zini R, et al. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Rad Biol Med.* 1998 ; 25(1) : 113-20.
 20. Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1993 ; 6(4) : 341-60.
 21. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2007 ; 100(3) : 328-41.
 22. Yin W, Mu J, Birnbaum MJ. Role of AMP-cerebrovascular kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2003 ; 278(44) : 43074-80.
 23. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 1999 ; 4(4) : 611-7.
 24. Lee J. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α / γ agonist. *Korean J Med.* 2014 ; 87(1) : 19-25.
 25. Tobert JA. New developments in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase. *Circulation.* 1987 ; 76(3) : 534-8.