



Original Article / 원저

## 三黃瀉心湯이 수컷 생쥐의 肥滿 관련 代謝疾患에 미치는 영향

이주영 · 국윤범\*

상지대학교 한의과대학 방제학교실

### Effects of Samhwangsasim-tang on obesity-related metabolic disease in mice

Ju-young Lee · Yoon-bum Kook\*

Dept. of Formula Science, College of Korean Medicine, Sangji University  
Wonju Sangjidae-gil 83, Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : Samhwangsasim-tang (SHSST) is a traditional Korean medication, which has been used in Korea for treatment of hypertension and chest pain. Hyperlipidemia and inflammation could influence hypertension and chest pain. This study investigated whether and how SHSST reduces the hyperlipidemia and inflammation related to high-cholesterol diet-induced obesity in rats.

**Methods** : Mice were divided randomly into four groups: the normal diet group, high-cholesterol diet group, low dose treatment group supplemented with 30% ethanol extract of SHSST (L) and high dose treatment group supplemented with 80% ethanol extract of SHSST (H). L and H groups were orally administered with SHSST at the dose of 50mg/kg a day respectively and others were administered with the same volume of physiological saline.

**Results** : Administration of SHSST resulted in a decrease in serum levels of total cholesterol and low-density lipoprotein. Expression of hepatic genes(SREBP2, LXR, LDLR, and HMG-CoA) related with cholesterol metabolism was also suppressed. In addition, SHSST decreased the expression of inflammation-related gene (TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1, VCAM-1, TGF- $\beta$ 1 and fibronectin). Histological examinations also showed that the size of the adipocytes was smaller in the SHSST treated group than in the

high-cholesterol diet group. In an *in vitro* study, SHSST inhibited the production of nitric oxide in a concentration-dependent manner.

**Conclusions** : This study indicates that SHSST has anti-hyperlipidemia and anti-inflammatory effects. It may also suggest that SHSST may be alternative therapy for treatment of hyperlipidemia and its complications.

**Keyword** : Samhwangsasim-tang (SHSST), anti-hyperlipidemia, anti-inflammatory, obesity, alternative therapy

## I. 緒 論

간조직은 신체의 항상성유지에 있어서 가장 중요한 역할을 담당하고 있는 장기이다. 간의 지방산 합성과 산화의 균형이 깨지면 간의 지방 축적 및 인슐린 저항성이 야기된다. 음주와 관계없이 간에 중성지방이 과도하게 축적되는 비알콜성 지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 단순 지방간(simple hepatic steatosis)으로부터 지방간염(steatohepatitis), 간섬유증(hepatic fibrosis) 및 간암(liver cancer)과 같은 만성 간질환으로 진행할 수 있다.<sup>1)</sup> 또한 이는 비만, 인슐린 저항성 제2형 당뇨, 심혈관계질환 등 대사증후군과 관련이 있는 것으로 알려지면서 최근 관심이 증가하고 있다.<sup>2)</sup> 2008년도 대한간학회에서 발표된 자료에 의하면 직장인에서 지방간질환의 발생은 20년 전보다 3배 이상 증가하였고, 특히 NAFLD의 발생률이 30%에 육박하였다고 하였다.<sup>3)</sup> 또한 NAFLD 환자의 90%에서 대사증후군의 요소 중 한 가지 이상을 가지고 있으며 33%는 대사증후군의 진단 기준을 만족한다고 하였다.<sup>4)</sup> NAFLD의 발병원인은 정확히 알려진 바 없지만 인슐린 저항성과 고인슐린혈증이 이의 발병에 중요한 역할을 하며, 인슐린 저항성 증가와 밀접한 관련이 있는 지질 이상 역시 NAFLD의 원인으로 여겨지고 있다.<sup>5-6)</sup> 따라서 이는 대사증후군의 결과가 아닌 원인으로 대사증후군의 발생을 예견하는 인자일 수 있다.

脂肪肝은 韓醫學의으로는 濕痰의 代謝障得로 기인된다. 痰이란 肢體를 潤養하는 津液이 變化된

非生理的인 病因性 派生物質로 水濕作用의 異常이나 熱로 인해 薰蒸凝結稠粘하게 되어 身體各部를 壅塞케 하는데 肝을 壅塞케 하면 脂肪肝을 發하게 된다. 成人의 경우 好酒家나 膏粱厚味를 좋아하는 자는 그 毒氣가 體內에 壅盛되어 濕痰을 더욱 축적시키게 한다. 膏粱厚味는 濕熱을 많이 助長케 하고 酒는 大熱을 발생시킨다. 飽醉하면 濕과 熱이 中焦에 壅塞케 되며 이들의 병리적 작용으로 痰飲이 더욱 축적된다. 또한 中焦에 痰飲이 있는 자가 脾虛하여 運化機能이 失調되면 濕을 조절하지 못하여 능히 生痰하므로 이러한 濕痰이 壅滯되어 발병하기 쉽다.<sup>7)</sup>

韓醫學에서 脂肪肝의 辨證施治는 크게 濕痰壅滯型, 熱毒內盛型으로 나뉜다. 濕痰壅滯型의 症狀는 濕痰이 肝部에 壅滯되어 倦怠感, 身重感, 易疲勞 등의 증상이 나타날 수 있지만 대부분 다른 증상을 호소하지 않는다. 治法은 清熱利濕 健脾消導 或 消痰除濕한다. 熱毒內盛型의 증상은 煩熱, 胸悶, 腹大堅滿, 腹痛, 黃疸, 脈弦數, 舌苔黃膩 등의 증상을 나타내며 治法은 清熱利濕, 瀉火解毒 或 清熱解毒한다.<sup>7)</sup>

瀉火解毒, 清化濕熱하는 효능을 지니고 있는 三黃瀉心湯은 『金匱要略』에 처음으로 수록된 처방으로 모든 實熱火證을 치료하며<sup>8)</sup>, 脂肪肝의 辨證施治인 濕痰壅滯型, 熱毒內盛型을 모두 아우를 수 있다고 사료되어 실험에 임하였다.

이에 본 연구는 三黃瀉心湯의 고지방식을 먹인 수컷 생쥐에서의 식이성지방간에 대한 예방 및 질병 개선에 대한 자료를 마련하고자 실험 전

\* Corresponding author : Yoon-bum Kook, PhD. Professor, Dept. of Formula Science, College of Korean Medicine, Sangji University, 83, Sangjidae-gil, Wonju-si, Gangwon-do, 220-702, South Korea.

· Tel : 82-33-730-0661

· E-mail : kook@sangji.ac.kr

• Received : May 14, 2014 / Revised : June 17, 2014 / Accepted : June 18, 2014

후 실험동물의 체중 변화를 측정하고 혈청 내 전체 콜레스테롤의 변화와 실험동물의 간에서의 LDLR, LXR, HMG-CoA, SREBP의 mRNA 발현을 측정하였다. 또한 본 처방의 항염증 작용을 알아보기 위해 LPS에 의해 염증이 유도된 Raw 264.7 cell에서 생성되는 염증매개물질인 NO, IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성 저해를 통한 항염증 효과를 알아보아 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 研究方法

### 1. 시료의 제조 및 추출

본 실험에 사용된 三黃瀉心湯은 黃連(Coptidis Rhizoma)의 根莖, 黃芩(Scutellariae Radix)의 根, 大黃(Rhei Rhizoma)의 根莖을 1:1:1의 비율로 각 300 g씩 (주)음니허브에서 구매하여 제조하였다. 三黃瀉心湯을 30% ethanol 또는 80% ethanol을 용매로 하여 추출기온도 110°C에서 각 3시간, 3회씩 반복 추출하고 rotary evaporator를 이용하여 감압 농축한 후 동결건조하였다.

### 2. 실험동물 및 사육조건

8주령 된 18±2 g C57BL/6J종 수컷 생쥐를 (주)대한바이오링크에서 공급받아 1주간 사료와 식수로 적응시켰다. 동물실의 온도는 20±1°C, 명암주기는 12시간 간격으로 하였다. 무작위로 정상식이군, 고지방식이군, 三黃瀉心湯 30%투여군, 三黃瀉心湯 80%투여군 총 4개의 군으로 나누어 10주간 사육하였다. 정상식이군은 일반사료를 고지방식이군과, 약물투여군은 고지방식을 섭취하도록 하였으며 약물은 300 mg/kg/day 용량으로 존재(sonde)를 이용하여 경구투여하였다.

### 3. 실험동물의 몸무게 측정

실험시작 첫 주와 마지막 주에 무게를 측정하여 비교하였다. 실험치의 값은 각 군별로 mean±S.D.로 나타냈다.

### 4. 시료 채취

사육이 끝난 실험동물은 diethyl ether로 마취한 후 개복한 뒤 헤파린 처리된 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였고, 분석 시까지 -80°C에 보관하였다. 실험동물의 장기조직은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 0.9% 생리식염수로 헹군 후 여과지로 물기를 제거하여 무게를 측정하고 분석 시까지 -80°C에 보관하였다.

### 5. Serum에서 지질수치 측정

혈청 총 콜레스테롤을 Richmond(1976)에 준한 효소법에 의한 kit (Total cholesterol assay kit, wako, Japan, Osaka, cat#439-17501)를 사용하여 정량하였다. 혈청 콜레스테롤은 에스테르 및 유리 콜레스테롤 두 형태로 존재하므로, 이들 모두를 정량하기 위하여 혈장 중 ester형의 콜레스테롤을 콜레스테롤 esterase인 유리형 콜레스테롤로 전환시킨 다음 이에 콜레스테롤 oxidase를 작용시켜 형성된 4-cholesterone을 peroxidase 및 4-aminoantipyrine과 작용시킨 후 quinone형 적색색소를 형성시켜 500nm에서 흡광도를 측정하여 총 콜레스테롤 농도를 계산하였다.

### 6. 세포배양

본 실험에서는 murine macrophage RAW 264.7 세포를 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였다. RAW 264.7의 세포 성장을 위한 기본 배지로는 DMEM을 사용하였고, 10% FBS, streptomycin sulfate(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), penicillin G(100 units/ $\text{ml}$ )를 첨가하여 배지를 만들어 사용하였다. RAW 264.7 세포는 2×10<sup>5</sup>cells/ $\text{ml}$ 의 농도로 T-flask에 접종하여 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 95% air)에서 37 °C의 조건으로 배양하였다. Lipopolysaccharide(LPS) 1 mg을 1× PBS 1 ml에 녹여서 필터한 후 사용하였다. 각 실험에서 세포를 24시간 배양한 다음 일정량의 약제 샘플을 LPS 처리 1시간 전에 넣어서 배양한 후 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 LPS를 처리하여 실험을

Table 1. Primer Sequences and PCR Conditions.

Gene name	Tm(°C)	Size(bp)	Sequence 5'-3'
Low density lipoprotein receptor (LDLR)	55	274	F: CAAAGTCTGCAACATGGCTAGA R: GTTGTCCAAGCATTCGTTGGTC
Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBP1c)	55	115	F: ATCGCAAACAAGCTGACCTG R: AGATCCAGGTTTGAGGTGGG
Liver X receptor (LXR)	55	119	F: TCCTACACGAGGATCAAGCG R: AGTCGCAATGCAAAGACCTG
3-hydroxy-3methylglutary-CoA (HMG-CoA)	55	285	F: GTGGCAGAAAGAGGGAAAGG R: CGCCTTTGTTTCTCGGTTGA
TNF- $\alpha$	55	275	F: AACATCCAACCTTCCCAAACG R: GACCCTAAGCCCCCAATTCTC
IL-6	55	638	F: ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC R: GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT
ICAM-1	55	200	F: GGCCTCAGTCAGTGTGA R: AACCCCATTCAGCGTCA
VCAM-1	55	141	F: CCGGATTGCTGCTCAGATTGGA R: AGCGTGGAATTGGTCCCCTCA
TGF- $\beta$	55	287	F: CCCAGCATCTGCAAAGCTC R: GTCAATGTACAGCTGCCGCA
Fibronectin	55	270	F: CCCATCAGCAGGAACACCTT R: GGCTCACTGCAAAGACTTTGAA

진행하였다.

## 7. 세포독성시험

Raw 264.7 cells를 이용하여 96well plate에 1x10<sup>5</sup>cells/well로 세포를 균일하게 분주하고 24시간 동안 배양한 후 여러 농도의 시료용액을 배지에 희석하여 첨가하였다. 24시간이 지난 후 MTT시약(5mg/ml)을 넣고 4시간 동안 incubator에서 배양한 후 상등액을 suction으로 제거하고 형성된 MTT formazan을 DMSO 100  $\mu$ l를 첨가하여 녹였다. 10분 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 8. Nitrite production 측정

Raw 264.7 cells에서 생성된 NO의 양을 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액에 존재하는 NO<sub>2</sub>를 측정하는 실험을 하였다. 1x10<sup>5</sup>cells/well로 세포를 분주한 24well plate에 시료용액을 여러 농도(6.25, 12.50, 25.00, 50.00  $\mu$ g/ml)로 1시간 전처리한 후에 LPS(1  $\mu$ g/ml)를 처리하고 24시간 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양 상등액 100  $\mu$ l와 Griess 시약[1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v)

phosphoric acid와 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCL] 100  $\mu$ l를 96 well plate에서 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 9. Real-time PCR

Easy Blue kits (Intron Biotechnology)를 이용하여 kit의 지시에 따라 전체 cellular RNA를 추출하였다. 각각의 시료에서 MuLV reverse transcriptase, 1mM dNTP 그리고 oligo(dT12-18) 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l를 이용하여 RNA를 역전사하여 cDNA를 얻었다. 얻은 cDNA를 이용하여 5'와 3' primers, SYBR green, DEPC를 포함한 전체 부피를 10uL로 만들어 PCR분석을 하였다.

## 10. 통계학적 분석

모든 실험치의 값은 mean $\pm$ S.D.로 나타냈으며 SPSS package를 이용하여 one-way ANOVA검정을 수행하였으며, 각 처리군간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test에 의해 p<0.05 수준에서 실시했다.

Table 2. Effects of SHSST on Total Body Weights in Experimental Mice.

	Body weights(g)			
	CON	HC	L	H
1 <sup>st</sup> week	22.70 ±1.13	22.13 ±0.89	22.73 ±1.06	22.99 ±0.98
20 <sup>th</sup> week	23.94 ±1.07	26.28 ±1.20 <sup>#</sup>	23.22 ±1.98 <sup>***</sup>	23.60 ±0.88 <sup>***</sup>

The data are shown as the mean ± S.D. (n = 10). #p<0.05 compared with the normal diet group (CON). \*p<0.05 compared with high-cholesterol diet group (HC), \*\*p<0.01 compared with HC, \*\*\*p<0.001 compared with HC. There were no big differences between total body weights of each groups in first week but the 20<sup>th</sup> week total body weights of HC group was increased compared with that of CON group. Total body weights of treatment groups supplemented with 30% ethanol extract of SHSST (L), treatment groups supplemented with 80% ethanol extract of SHSST (H) groups were suppressed compared with total body weights of HC group at final week of experimental period.

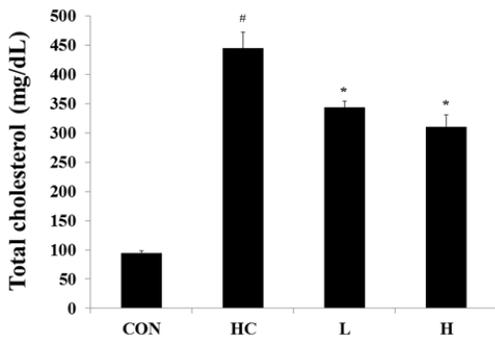


Figure 1. Effects of SHSST on total cholesterol levels in experimental mice.

The data are shown as the mean ± SD (n = 10). #p<0.001 compared with CON(normal diet group). #p<0.01 compared with CON. \*p<0.05 vs. HC, \*\*p<0.01 vs. HC, \*\*\*p<0.001 vs. HC. Administration of SHSST suppressed the plasma levels of total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein (LDL).

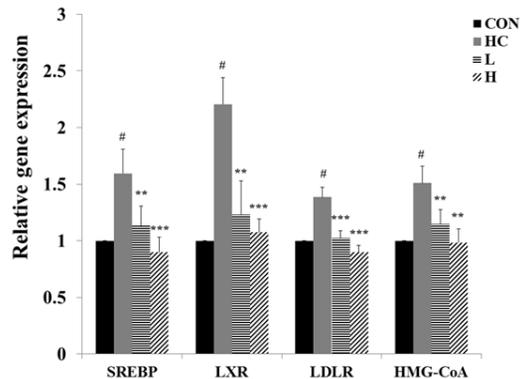


Figure 2. Effects of SHSST on cholesterol metabolism related hepatic gene.

Data were normalized to the GAPDH mRNA levels and then compared to CON(normal diet group) group measurements, which were assigned a value of 1.0. Each bar represents the mean ± S.D. of 3 independent experiments of the RNA from 10 mice per each group. #p<0.001 compared with CON. \*p<0.05 vs. HC, \*\*p<0.01 vs. HC, \*\*\*p<0.001 vs. HC.

### III. 實驗結果

#### 1. 三黃瀉心湯에 의한 체중변화

실험 첫 주와 10주째의 전체 체중의 평균을 비교하였다. 정상식이군과 고지방식이군의 체중을 비교하였을 때 실험 마지막 주에서 고지방식이군이 정상식이군보다 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(p<0.05). 고지방식이군에 三黃瀉心湯을 농도별로 투여한 2군에서는 고지방식이군에 비해 유의성있게 체중이 감소하였다(p<0.001).

#### 2. 혈청지질수치에서의 三黃瀉心湯의 효과

실험동물에게 고지방식이 및 三黃瀉心湯추출물

을 10주간 투여한 후 혈청 내 총 콜레스테롤을 측정된 결과 고지방식이군에서 정상식이군에 비해 총 콜레스테롤 수치가 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(p<0.001). 또한 三黃瀉心湯 추출물을 투여한 군 모두 고지방식이군에 비해 총 콜레스테롤이 감소하였다.

#### 3. 三黃瀉心湯의 콜레스테롤 관련 mRNA 발현 저해

Real-time PCR을 통해 간에서 mRNA(SREBP, LXR, LDLR, HMG-CoA)의 발현 변화를 확인한 결과 고지방식이군에서 유의성 있게 증가한 발현

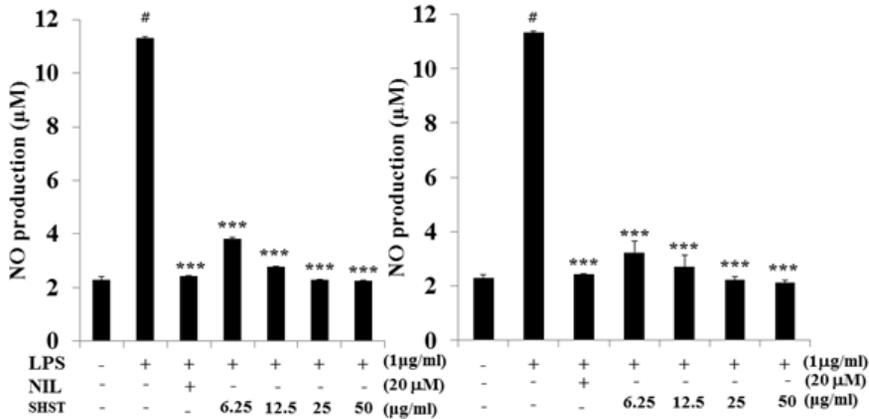


Fig. 3 . Effects of SHSST on Nitric oxide (NO) production in macrophage cell.

The Experiments were performed three times. The data are shown as the mean  $\pm$  SD. # $p$ <0.001 compared with CON(normal diet group). \*\* $p$ <0.01 vs. LPS+INT, \*\*\* $p$ <0.001 vs. HC. NO productions were suppressed in SHSST concentration-dependent manners. Furthermore, the higher concentration of SHSST, the NO productions were lower.

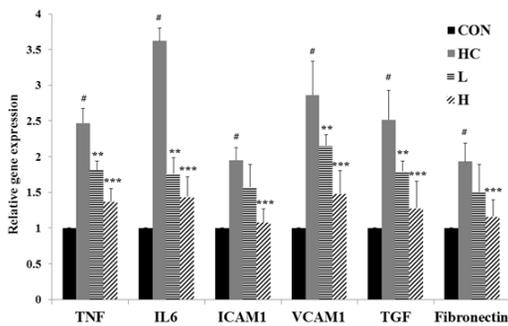


Fig. 4. Effects of SHSST on inflammation related gene in vascular tissue.

Data were normalized to the GAPDH mRNA levels and then compared to CON group measurements, which were assigned a value of 1.0. Each bar represents the mean SEM of 3 independent experiments of the RNA from 10 mice per each group. # $p$ <0.001 compared with CON. \* $p$ <0.05 vs. HC, \*\* $p$ <0.01 vs. HC, \*\*\* $p$ < 0.001 vs. HC.

량이 저해되는 것을 확인할 수 있었다.

#### 4. 三黃瀉心湯의 NO생성에 미치는 효과

LPS(Lipopolysaccharide)에 의해 활성화된 Raw 264.7 cells의 배양액 중에 생성된 NO의 양을 Griess 시약을 통해 흡광도를 측정하였다. 三黃瀉心湯은 LPS에 의해 NO생성량이 저해되었다. 양성대조군으로 iNOS 저해제로 알려진 L-NIL (20 µM)을 사용하였다.

#### 5. 三黃瀉心湯의 염증관련 mRNA 발현 저해

三黃瀉心湯의 항염증작용을 확인하기 위해 혈관 조직에서 염증관련 mRNA(TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAMI, VCAMI, TGF, Fibronectin) 발현 변화를 확인하기 위해 real-time PCR을 시행하였다. 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 발현량이 증가됨을 확인할 수 있었다. 三黃瀉心湯의 투여농도에 따라 고지방식이군에 비해 발현량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

### IV. 考 察

韓醫學에서 脂肪肝의 辨證施治는 크게 濕痰壅滯型, 熱毒內盛型으로 나뉜다. 濕痰壅滯型의 治方은 對金飲子, 葛花解醒湯 加 茵陳四苓散, 導痰湯 合 五苓散 등을 提示하고 있으나 體質의인 素因을 감안하여 藥物을 多樣하게 投與할 수 있다. 熱毒內盛型의 治方은 간기능 이상이 뚜렷하면 茵陳四苓散이나 茵陳清肝湯 또는 生肝建脾湯에 葛根, 鬱金, 柴胡, 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子 등을 隨症加減하여 投與한다. 肝機能이 정상이면 黃連解毒湯이나 太陰人의 熱多寒小湯, 清血降氣湯이나 少陽人의 涼膈散火湯 등을 적절하게 사용하게 된다.<sup>7)</sup>

이 실험에 사용된 三黃瀉心湯은 大黃, 黃連, 黃芩으로 구성되어, 顏面紅潮, 熱이 있고, 精神不安, 便秘 경향이 있는 高血壓症과 眩暈, 肩胛痛, 耳鳴, 頭重, 不眠, 不安 등의 증상에 쓰인다.<sup>8)</sup>

본 處方 중 大黃은 항종양, 항균 등에 효과가 있다. 한의학에서는 복막염, 장염, 담석증, 만성설사 황달 및 담석증 등의 치료에 응용되는 약재이며, 주요 성분으로는 emodine monoglucoside, aloemodin monoglucoside, chrysophanol, sennoside, tannin 등으로 보고되어 있다.<sup>9)</sup> 黃芩의 성분 연구는 flavonoids에 관한 것이 대부분으로 황색 결정성 성분인 wogonin을 처음 추출하여 구조가 밝혀졌으며, 주요 성분으로는 baicalein, baicalin, wogonin, kaganebananin, wogonoside 등이 함유되어 있으며, 항염, 항알레르기 작용이 있고 그 외에 항균 작용, 항바이러스작용, 해열작용, 이뇨작용, 혈압강화 작용이 있다.<sup>10)</sup> 黃連의 성분으로는 berberine, palmatine, coptisine 등이 함유되어 있으며 항염증효과가 있는 것으로 보고되었다.<sup>10)</sup>

비만은 에너지대사의 불균형으로 에너지 섭취가 에너지 소비보다 클 때 일어난다. 경제생산 활동의 증가와 식생활 문화의 변화로 몸속에 축적되는 칼로리의 양이 많아지는 반면 산업의 발달로 인하여 신체활동량은 오히려 감소하게 됨에 따라 비만의 유병율은 증가하는 추세에 있다. 또한 비만은 외형상의 문제를 야기할 뿐 아니라 당뇨병, 고혈압, 심혈관질환, 뇌졸중, 암 등을 유발함으로써 인간의 건강을 위협하고 있고, 비만의 증가는 사회적인 문제로 대두되고 있어<sup>11)</sup> 비만에 대한 적극적인 치료가 필요한 실정이다.

비만은 한의학 문헌 중 『黃帝內經』<sup>12)</sup> 「通評虛實論篇」에서 “肥貴人, 則膏粱之疾也”라고 했고, 「奇病論篇」에서 “此人必數食甘味而多肥也”라고 처음으로 언급된 이후로 비만을 肥, 肥胖, 肥人, 肉人, 肥貴人 등으로 표현하고 있으며, 대사이상으로 인한 臟腑氣虛, 濕痰瘀血을 비만의 원인으로 인식하였다.<sup>13)</sup> 고지방식이에 의하여 유발된 비만 및 고지혈증에 대하여 약물들의 효능을 관찰한 최근의 보고로는 Sung YY 등<sup>14)</sup>은 대과, 현초를, Niu C 등<sup>15)</sup>은 산사를, 이용하여 개선효과를 보고하였다.

고지방식이에 의하여 유발된 비만에 대하여 지질 대사, 염증 및 면역기능에 미치는 영향에 관한 보고에서 약물 단미의 효과에 관한 연구로는 윤<sup>16)</sup>은 달래를, 박<sup>17)</sup>은 모래지엽을, 또한 처방의 효과에 관한 연구로는 공<sup>18)</sup>은 五積散加味方을, 오<sup>19)</sup>는 調胃升清湯을 투여하여 지질강하, 염증억제 및 면역기능 강화 효과를 보고하였다.

본 연구에서는 고지방식이 마우스 비만모델을 이용하여 三黃瀉心湯의 투여가 체중 증가량의 변화에 어떤 영향을 미치는지에 대해서 알아보았다. 체중 증가량의 경우, 대조군은 정상군에 비하여 9.7% 체중 증량효과가 있었고, 대조군에 비하여 三黃瀉心湯 투여군은 11-12.7%의 체중감량 효과가 있는 것으로 나타났다.

우리나라의 2000년에서 2010년사이의 사망원인 중 심장질환은 암과 뇌혈관질환 다음으로 높은 사망률을 보여주었으며, 특히 심근경색증과 협심증 등의 허혈성 심장질환이 심각함을 알 수 있다.<sup>20)</sup>

심혈관계 질환의 임상 생화학적 바이오마커로는 혈중 TC(total cholesterol)의 증가, HDL-C(high density lipoprotein cholesterol)의 감소, LDL-C(low density lipoprotein cholesterol)의 증가, 혈중의 triglyceride(TG)의 증가와 free fatty acid 등의 증가가 있는데, 혈중 cholesterol의 증가는 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥질환의 3대 위험인자로 70년대 후반에는 HDL-C 및 LDL-C 등 지단백 수준과 분획이 심혈관계 질환의 주요 항목으로 첨가되고 있다. 또한 역학적으로 혈중 지질수준, 저수준의 HDL과 고수준의 LDL-C를 지닌 사람에게서 심혈관 질환의 발생률이 현저히 증가하는 것으로 알려졌다.<sup>21)</sup> 혈액생화학적인 수치에서는 실험동물에서 혈중 total cholesterol(TC)의 경우 三黃瀉心湯 투여군이 대조군에 비해 약 71-77.3% 정도 유의성 있게 감소하는 경향을 보였다( $p < 0.05$ ).

Sterol regulatory element binding proteins(SREBPs)는 인슐린의 역할을 매개하여 지방산과 콜레스테롤의 생합성 경로에 관련되는 효소를 활성화하여 간에서 지방산과 콜레스테롤 합성을 유도하는 중요한 전사활성인자이며<sup>22)</sup> 그 중 간 조직에서는 SREBP-1c의 발현이 우세한 것으로 알려져 있

다.<sup>23)</sup> 한 연구에서는 고도비만과 인슐린저항성이 특징인 ob/ob rats에서 발생한 지방간 병변에서 SREBP-1 gene을 비활성화시키면 간조직의 중성 지방 축적이 감소한다고 보고하였다.<sup>24)</sup>

Liver X receptor(LXR)는 핵수용체 superfamily에 속하는 전사인자로 1994년에 rat liver cDNA library 탐색을 통해서 처음 발견되었다.<sup>25)</sup> LXR은 LXRA와 LXRB 두 가지 isoform이 있으며 이 둘 사이에 DNA-binding domain과 ligand-binding domain의 아미노산 서열의 약 78%가 유사하다.<sup>26)</sup> LXR의 조직에 따른 발현 정도는 LXRA의 경우 비장, 간, 지방조직, 장, 신장, 폐에서 많이 발현되고 있으며 LXRB의 경우 모든 조직에서 발현되고 있다. LXR은 생체 내 지방 대사조절에 중요한 역할을 담당하고 있다.<sup>27)</sup> LXR agonist의 투여는 동맥경화와 당뇨의 치료에 효과가 있지만 고중성 지방혈증 (hypertriglyceridemia)과 지방간(steatosis)을 발생시킨다는 보고 또한 되어 있다.<sup>28)</sup> 이는 LXR에 의해 생체 내 지질합성에 중요한 전사조절인자인 sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c가 활성화되기 때문이다.<sup>29)</sup> SREBP는 소포체에 존재하고 있다가 활성화되면 processing 과정을 거쳐 핵으로 이동하는 basic helix loop helix leucine zipper superfamily에 속하는 전사인자이다.<sup>29)</sup> SREBP-1c는 지방산 및 중성지방의 합성과 관련된 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있으며<sup>30)</sup> SREBP-1c가 조절하는 대표적인 유전자들은 acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, stearoyl-CoA desaturase 1, glycerol-3-phosphate acyltransferase 등이 있고 이들은 모두 acetyl-CoA가 지방산을 거쳐 중성지방으로 합성되는 과정에서 중요한 효소이다. 간에서의 SREBP-1c의 전사는 인슐린에 의해 조절되고 있고 인슐린의 작용에 있어서 LXR이 중요한 매개체로 작용하고 있다.<sup>30)</sup>

비알코올성 지방간은 알코올의 섭취가 없는 사람의 간에서 알코올성 지방간과 유사한 소견이 보이는 질환으로 비만, 제2형 당뇨병 등 대사성 질환이 비알코올성 지방간과 연관되어 있다.<sup>31)</sup> 간단한 단순지방증부터 염증반응이 동반되는 지방

간염, 간경변증 등이 이 질병 범주에 속한다.<sup>31)</sup> 비알코올성 지방간의 pathophysiology는 명확하게 밝혀지지 않았지만 인슐린 저항성이 이 질병과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있고,<sup>31)</sup> 비알코올성 지방간의 발생에서 SREBP-1c는 인슐린 저항성이나 비만에서 나타나는 고인슐린혈증에 의해 혈중 인슐린 농도가 증가하게 되고, 증가된 인슐린에 의해 SREBP-1c가 간에서 활성화되어 최종적으로 중성지방을 간에 축적하게 한다.<sup>31)</sup>

LDL receptor는 세포막에 존재하는 단백질로 혈중의 LDL-cholesterol을 세포내로 흡수하는 역할을 한다.<sup>32)</sup> 가족성 고콜레스테롤혈증 환자의 경우 LDL receptor의 유전적 결함 때문에 혈중 콜레스테롤이 제거되지 않아 나이와 상관없이 고콜레스테롤혈증이 유발된다고 보고된 바 있다.<sup>32)</sup> 이러한 LDL receptor 유전자의 발현은 세포내의 sterol 함량에 의해 조절되는데 이는 SREBP라는 전사인자의 활성화와 밀접하게 연관되어 있다. 세포내의 콜레스테롤 농도가 낮은 경우 전사인자인 SREBP가 활성화되어 LDL receptor의 발현이 증가하지만 세포내 콜레스테롤 농도가 높아지면 반대로 SREBP의 활성화가 억제되어 LDL receptor의 발현이 감소하게 된다.<sup>33)</sup> 따라서 고지방식에 의한 고콜레스테롤혈증은 세포내에도 높은 콜레스테롤 함량을 유도하고 이런 높은 콜레스테롤 함량은 LDL receptor의 발현을 억제하여 결과적으로 혈중의 콜레스테롤이 제거되지 않아 혈중 콜레스테롤 수치는 더욱 상승하게 된다. 이러한 고콜레스테롤혈증 환자들에게 현재 사용되고 있는 치료제 중 simvastatin이나 lovastatin 등의 합성약제는 세포내 콜레스테롤 합성의 주효소 중의 하나인 HMG-CoA reductase의 저해제로서 고콜레스테롤의 농도를 저하시키는 능력이 다른 저해제 보다 우수한 제품으로 알려져 있으나 이들 약제가 간기능 장애환자에게는 부작용이 있어 사용될 수 없는 문제점이 있다. 三黃瀉心湯 투여군은 간조직에서 SREBP, LXR, LDLR, HMG-CoA mRNA 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다. 따라서 三黃瀉心湯이 이러한 부작용을 대체할 수 있는 고콜레스테롤혈증 치료제로 사용될

수 있으리라 생각된다.

NO는 대식세포가 활성화되면 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOS)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다. 바이러스나 기생충을 억제하는 항균 효과와 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 생리적 역할을 수행하지만, 병리적으로 과도하게 형성되면 염증을 유발하며, 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하게 된다. NO 역시 사이토카인과 비슷한 기능을 하므로 염증반응 시 생리적으로 필수적인 매개물질이지만 과량 분비 시에는 병리적인 원인으로 작용하므로 적절한 항상성을 유지해야 한다. LPS 자극 시 장기에 미치는 유독성은 이러한 NO의 과도한 작용 때문이다.<sup>34)</sup> 그러므로 NO의 발현량을 감소시킨다면 세포내의 유해한 염증반응을 억제할 수 있을 것이므로 NO의 발현량을 측정된 결과, 대조군에 비해 三黃瀉心湯 6.25 mg/ml부터 50 mg/ml까지 유의성 있게 억제하였으며 50 mg/ml 처리군은 약 81%까지 억제하였다.

비만과 관련된 염증성 질환인 죽상경화증과 같은 심혈관질환의 초기 염증단계의 내피에서 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 혹은 interleukin-6(IL-6)와 같은 전염증 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)들이 활성화되면, 내피하(sub-endothelium)로 염증세포와 monocyte의 이동을 촉진시키는 intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), E-selectin과 같은 cell adhesion molecules(CAMs)의 발현이 증가된다.<sup>35)</sup>

혈액내 세포들과 내피세포와의 결합에 처음 관여하는 CAMs가 E-selectin이며, 염증사이토카인에 의해 활성화 된 혈관내피세포에서 발현된 E-selectin과의 결합으로 호중구는 구르기(rolling)를 시작하고 혈관내피세포에서는 chemotactic factor를 분비하여 호중구의 표면 integrin을 친화력 높은 구조로 바꾼다. 그 결과 호중구의 integrin은 혈관내피세포의 ICAM-1, VCAM-1과 같은 ligand와 반응하여 단단하게 결합하고 MCP-1이나 IL-8 등에 의해 혈관내막(intima)으로 유인되어 혈관내

피세포 사이를 뚫고 염증조직으로 이동하게 된다.<sup>36)</sup> CAMs는 토끼와 수컷 생쥐에서 뿐만 아니라, 사람의 관상동맥과 복부대동맥의 죽상경화성 병변 부위에서 발견되며 신생혈관 및 염증성 침범부위의 죽상경화성 죽상판 (plaque) 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>37)</sup>

三黃瀉心湯의 혈관 내 염증을 미치는 효과를 확인하기 위하여 C57BL/6J 마우스에 고지방식을 먹인 후 혈관조직에서 Realtime-PCR을 실시하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1, VCAM-1, TGF- $\beta$  및 Fibronectin의 발현을 확인하였다. 그 결과 TNF- $\alpha$ 는 정상식이군에 비해 고지방식이군은 약 2.5배 증가하였다. 그러나 三黃瀉心湯 처리군은 대조군에 비해 30-45%까지 유의하게 억제하는 것으로 나타났다. IL-6는 고지방식이군이 정상군에 비해 3.6배 증가하였으며 三黃瀉心湯 처리군은 53-61%까지 유의성 있게 억제하였다. ICAM-1은 정상식이군에 비해 고지방 식이군이 약 1.9배 증가하였으며 L 그룹에서는 억제하는 경향만 보였고 H 그룹에서는 약 40% 정도 유의성 있게 억제하였다. VCAM-1은 정상식이군에 비해 고지방식이군이 2.8배 정도 증가하였으며 L 그룹과 H 그룹 모두 22-43% 까지 유의성 있게 억제하였다. 三黃瀉心湯의 투여가 고지방식으로 유도된 TGF- $\beta$  및 Fibronectin의 mRNA 발현 또한 유의성 있게 감소시켰다.

이러한 결과를 종합해 보면, 三黃瀉心湯은 고지방식으로 유도된 비만모델에서 체중증가와 총콜레스테롤의 증가를 억제하며, 간조직에서 콜레스테롤 생성에 관여하는 SREBP, LXR, LDLR, HMG-CoA의 mRNA 발현을 억제한다. 또한 혈관조직에서는 TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1, VCAM-1, TGF- $\beta$  및 Fibronectin 등 혈관내 염증과 관련된 인자의 mRNA 발현을 억제해주며 또한 RAW 264.7 세포주에서는 NO 생성 또한 유의적으로 억제하였다. 따라서 三黃瀉心湯은 비알코올성지방간 및 죽상경화증과 같은 비만과 관련된 대사질환의 예방 및 치료를 위한 임상적 응용이 가능하리라 사료된다.

## V. 結 論

三黃瀉心湯이 수컷생쥐의 肥滿 관련 代謝疾患에 미치는 영향에 대한 실험을 통해 아래와 같은 결론에 도달하였다.

1. 三黃瀉心湯은 고지방식으로 유도된 비만모델에서 체중증가와 총콜레스테롤의 증가를 억제한다.
2. 간조직에서 콜레스테롤 생성에 관여하는 SREBP, LXR, LDLR, HMG-CoA의 mRNA 발현을 억제한다.
3. 혈관조직에서는 TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1, VCAM-1, TGF- $\beta$  및 Fibronectin 등 혈관내염증과 관련된 인자의 mRNA 발현을 억제해주며 또한 RAW 264.7 세포주에서는 NO 생성 또한 유의적으로 억제하였다.

이를 종합하여 볼 때, 三黃瀉心湯은 비알코올성지방간 및 죽상경화증과 같은 비만과 관련된 대사질환의 예방 및 치료를 위한 임상적 응용이 가능하리라 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2013년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것임

## 參考文獻

1. Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Keum DK, Kim BI. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21:138-43.
2. Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter. *Gut.* 2006;55:123-30.
3. Jun DW. Non-alcoholic fatty liver disease. *Korean J Hepatol.* 2011;17: S332-36.

4. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology.* 2003;37: 917-23.
5. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001;50:1844-850.
6. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, Yki-Jarvinen H. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:3023-028.
7. Korean Medical Colleges Liver School Professor Edit. *Liver Internal Medicine* 4<sup>th</sup> Edition. Seoul:Korean Medicine Study Publishing Department. 2001:316-19.
8. Sa JM, Wang GP. *Geumgweyoryakselfstudy.* Beijing:zygjcbs. 1988:146-47.
9. Shah, C.S., J.S. Qardy and J.G. Bhatt. Qualitative and quantitative evaluation of anthraquinone derivatives in Indian rhubarb. *Planta Med.* 1972;22: 103-08.
10. Krakauer T, Li BQ, Young HA. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines. *FEBS Lett.* 2001;29,500(1-2):52-5.
11. Department of Internal Medicine, College of medicine, Seoul University. *Internal medicine.* Seoul:Kunja company. 1996:852-62.
12. Gwakaechun. *Canon of Medicine.* Tianjin:Tianjin Science and Technology Publishing. 1981:54, 87, 183, 194, 282.
13. Heo SY. *Oriental and Western Medical Study*

- on the investigation and treatment of Obesity. *J Ori Rehab Med.* 1997;7(1):272-86.
14. Sung YY, Yoon T, Yang WK, Kim SJ, Kim HK. Anti-obesity effects of *Geranium thunbergii* extract via improvement of lipid metabolism in high-fat diet-induced obese mice. *Mol Med Report.* 2011;4(6):1107-113.
  15. Niu C, Chen C, Chen L, Cheng K, Yeh C, Cheng J. Decrease of blood lipids induced by Shan-Zha (fruit of *Crataegus pinnatifida*) is mainly related to an increase of PPAR $\alpha$  in liver of mice fed high-fat diet. *Horm Metab Res.* 2011;43(9):625-30.
  16. Yoon KR. Biological effects of *Allium monanthum* extracts on the lipid metabolism, anti-oxidation and pro-inflammatory cytokines production in rat fed high fat diet. Sangji University Graduate School. 2011.
  17. Park WH. Effects of stem bark extracts of *Cornus walteri* Wanger on the lipid lowering, anti-oxidative activity and concentration of proinflammatory cytokines in rat fed high fat diet. Sangji University Graduate School. 2009.
  18. Kong IP. Effects of Ojeoksangamibang on the Lipid Metabolism, Anti-oxidation and Concentration of Proinflammatory Cytokines in High Fat Diet Induced Obese Rats. Sangji University Graduate School. 2011.
  19. Oh SW. Effects of Jowiseungcheung-tang (JWSCT) extract on the lipid metabolism, anti-oxidation and inflammatory response in obesity rat fed high fat diet. Sangji University Graduate School. 2011.
  20. <http://kostat.go.kr>
  21. Horton, J.D., Bashmakov, Y., Shimomura, I., Shimano, H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refeed mice: *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95(11):5987-992.
  22. Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S. Differential Expression of Exons 1a and 1c in mRNAs for Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 in Human and Mouse Organs and Cultured Cells: *J Clin Invest.* 1997;99(5):838-45.
  23. Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver: *J Clin Invest. Cell.* 2002;109:1125-131.
  24. Yahagi, N., Shimano, H., Hasty, A.H., Matsuzaka, T., Ide, T., Yoshikawa, T. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates Jorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in *Lepob/Lepob* mice. *J Biol Chem.* 2002;277(22): 19353-9357.
  25. Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59 Suppl7: 31-55.
  26. Ulven SM, Dalen KT, Gustafsson JA and Nebb HI. LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Esset Fatty Acids.* 2005;731:59-63.
  52. Rapa JJ and Mangelsdorf DJ, The role of orphan nuclear receptors in regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16: 459-81.
  27. Schultz JR, Tu H, Luk A, Rapa JJ, Medina JC, Li L. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes DEV.* 2000;1422,2831-838.
  28. Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plosch T, Kok T, Bloks VW., Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem.* 2002;27737,34182-4190.
  29. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P and Foufelle F. SREBP transcription factors: mater regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.*

- 2004; 839-48,8611.
30. Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL and Brown MS. Cental tole for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 10131,11245-1250.
  31. Postic C and Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab*. 2008;346,643-48.
  32. Goldstein, J. L. and Brown, M. S. : Progress in understanding the LDL receptoe and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plama cholesterol. *J. Lipid Res*. 1984;25:1450-461.
  33. Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, MR., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J. L. and Brown, M.S. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. 1984;75:187-97.
  34. Park SJ, Kim JY, Jang YP, Cho YW, Ahn EM, Baek NI, Lee KT. Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by genistein-4'-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside through the NF- $\kappa$ B inactivation in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Pharmacogn*. 2007;38(4):339-48.
  35. Pearson JD. Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 1999;12:329-41.
  36. Libby, P., Ridker, P. M., Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002:135 - 43.
  37. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Furgerson M, Hudkins K, Benjamin CD, Lobb R, Alpers CE. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1993; 92:945-51.