

부자추출물의 골격근 세포에서의 에너지 조절 작용

송미영

동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Effect of *Aconitum carmichaeli* Debx on Energy Metabolism in C2C12 Skeletal Muscle Cells

Mi-Young Song

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dugguk University

Received: November 21, 2016

Revised: November 30, 2016

Accepted: November 30, 2016

Correspondence to: Mi-Young Song
Department of Rehabilitation Medicine
of Korean Medicine, College of Korean
Medicine, Dugguk University, 123
Dongdae-ro, Gyeongju 38066, Korea
Tel: +82-54-770-1256
Fax: +82-54-770-1200
E-mail: miyoungsong@dongguk.ac.kr

Copyright © 2016 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: The all anti-obesity drugs currently approved by the US Food and Drug Administration work by reducing energy intake. In fact, no approved drug targets energy expenditure. In Korean medicine, it is known to Qi or Yang invigorating therapy could increase energy metabolism. *Aconitum carmichaeli* Debx (ACD) is a Yang invigorating herb, often used for treat obesity in Korean medicine. In the present study, the authors investigated the regulatory effects of ACD in energy metabolism and mitochondrial biogenesis in C2C12 skeletal muscle cells.

Methods: The water extract of ACD (0.2, 0.5 and 1.0 mg/ml) were treated in differentiated C2C12 cells. The protein or mRNA levels of target genes were analyzed and mitochondrial mass were investigated.

Results: ACD activated the expressions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), nuclear respiratory factor 1 and TFAM and increased mitochondrial mass. ACD also increased adenosin monophosphate-activated protein kinase (AMPK), and acetyl-CoA carboxylase.

Conclusions: This study suggests that ACD has the potential to increase energy metabolism and mitochondrial biogenesis by activating AMPK and PGC1 α .

Key Words: *Aconitum carmichaeli* Debx, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, AMP-activated protein kinases, Energy metabolism, C2C12

서론

비만 인구가 유행병처럼 증가하고 있다. 2014년 기준, 전 세계적으로 성인 인구 중 약 19억 명이 과체중 이상이며, 그 중 6억 명이상이 비만인 것으로 나타났다¹⁾. 국내에서도 비만 유병률이 가파르게 증가하고 있는데, 2015년 국민건강 영양조사를 통해 성인 인구의 33.2%가 비만인 것으로 보고 되었다²⁾. 비만 및 비만으로 유발되는 다양한 합병증들에 관한 위험성 문제는 전 세계적으로 관심의 대상이 되고 있지만, 효과적인 비만치료제 개발은 미비한 상태이다. 비만치료의 방법은 크게 ‘에너지 흡수(energy intake) 억제’ 또는

‘에너지 소비(energy expenditure) 증가’의 두 가지로 나눌 수 있다³⁾. 현재 미국식품의약국(Food and Drug Administration)에서 승인된 비만 치료제는 중추 신경에 작용하여 식욕을 억제시키는 식욕억제제 또는 위장관에서 지방의 체내 흡수를 억제하는 약물이며, 에너지 소비 증가 효능으로 승인된 약물은 없는 상황이다⁴⁾. 식욕억제제는 중추신경계에 작용하므로 항 정신성 부작용을 일으킬 수 있으며, 또한 식욕 억제제를 통한 장기간의 식이제한 시 인체 항상성 조절 기전으로 기초대사율이 저하되어 체중 감량 효과가 점차 줄어들어가는 문제점이 있다. 따라서 보다 효율적이며 안정적인 비만 치료를 위해서는 에너지 소비 증가를 통한 항비만

작용의 약물 개발이 필요하다³⁾.

한편 골격근은 미토콘드리아가 가장 풍부한 조직으로 에너지 대사 및 열생산의 핵심기관이며 당 및 지방산 대사 조절을 통해 비만 및 2형 당뇨병 발현에 직접적으로 영향을 미치는 기관이다³⁻⁶⁾. 골격근 내에서 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC-1 α)는 세포 에너지 대사의 핵심 인자로 지방산 산화를 조절하고, 미토콘드리아 생합성을 증가시키는 작용을 한다⁷⁾. Adenosin monophosphate-activated protein kinase (AMPK) 역시 세포 내 에너지 항상성 유지에 관여하는 효소로 골격근 내에서 지방산의 산화와 당 흡수를 촉진하며, 근육 내 AMPK의 활성화는 PGC-1 α 발현을 직접적으로 증가시키는 것으로 알려져 있다⁸⁾.

생체 에너지는 한의학에서의 氣의 개념으로도 이해할 수 있는데⁹⁾, 한의학에서 氣의 작용은 推動 및 溫煦 작용으로 대표된다¹⁰⁾. 이에 저자는 보기 혹은 보양 약물의 추동 및 온후 작용이 에너지 대사를 조절할 수 있을 것이라는 데 연구 아이디어에 착안하여, 한약 중 특히 보기, 보양 약물을 중심으로 에너지 대사 조절 효능을 연구하여 왔다. 그 결과 황기¹¹⁾, 육계, 부자¹²⁾, 백출¹³⁾의 골격근 세포에서 에너지 대사 조절 효능을 확인할 수 있었다. 그 중 부자(*Aconitum carmichaeli* Debx)는 골격근 세포에서 adenosine triphosphate (ATP) 생성을 증가시키고, 세포내 당 대사를 증가시킴을 확인하였지만¹²⁾, 관련 연구가 부족하여 본 연구에서 미토콘드리아 생합성 관련 및 에너지 조절 관련 인자들의 발현 변화 확인을 통해 부자의 생체 에너지 조절 효능을 보다 구체적으로 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 약재

부자는 포부자(광명당제약, 울산, 한국)를 구입하여 부자 200 g에 정제수 2 L를 가하여 열탕 추출기에서 3시간씩 2회 가열하여 얻은 추출물을 여과지(Whatman NO. 1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 여과한 후 감압 농축하여 동결 건조한 물 추출물을 조제하였다(수득률 22.5%).

2. 세포배양

C2C12 골격근세포(CRL-1772; ATCC, Manassas, VA, USA)는 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 및 1% penicillin/streptomycin mix (Invitrogen)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen)으로 배양하였다. C2C12 세포의 분화 유도를 위해, 100% confluence가 되면 2% horse serum을 포함한 배지로 바꾸어 24시간마다 배지를 교환하면서 4일간 분화시킨 후 약물을 처리하였다. 동일 약물 및 세포 모델을 사용한 이전 연구에서 세포 독성 실험을 통해 부자 1.0 mg/ml 농도에서 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였으며¹²⁾, 이를 근거로 부자추출물을 0.2, 0.5 및 1.0 mg/ml의 농도로 처리하였다.

3. Western blot

이상과 같은 방법으로 세포를 분화시킨 후, 농도별로 약물을 45분간 처리하였다. 세포를 수거하여 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 phosphate buffer saline (PBS) 용액으로 2회 세척하고 lysis 용액(50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 μ g/ml aprotinin)을 이용하여 부유시킨 후 얼음에 30분간 반응시켰다. 20 μ g의 단백질을 2 \times sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithiothreitol, 4% sodium dodecyl sulphate [SDS], 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)와 섞어 100°C에서 3분 끓인 다음 8%~15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 분리하였다. 전기영동을 통해 분리된 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30 V로 16시간 동안 transfer시켰다. Membrane은 10% skim milk로 실온에서 1시간 동안 blocking한 다음, 각 단백질의 항체와 상온에서 2시간 반응시켰다. 이를 tris buffered saline with Tween 20로 3회 세척한 후 anti-pAMPK, AMPK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)로 각각 처리한 후, 상온에서 1시간 반응시키고 enhanced chemiluminescence 용액으로 기질반응시켜 X-ray film에 감광하였다. X-ray film상의 밴드는 이미지(Image-J) 프로그램을 이용하여 AMPK에 대한 pAMPK의 발현 비율

로 표시하였다.

4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

분화된 골격근 세포에 농도별로 약물을 24시간 동안 처리하였다. 각 세포를 수거하여 5,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 TRIzol 시약을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA에 역전사 중합효소(reverse transcriptase)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 PGC-1 α , nuclear respiratory factor 1 (NRF1), mitochondrial transcription factor (TFAM) 및 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase의 primer들(Table 1)을 각각 혼합하고, 10 \times PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μ M dNTP, 1 U Tag polymerase 등을 혼합한 후 denaturation을 위해 94 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing을 위해 55 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C에서 30초 및 extension을 위해 70 $^{\circ}$ C에서 60초 조건에서 30 cycles을 수행하였다. 이상으로 얻어진 반응물을 EtBr이 포함된 1.5% 한천 (agarose) gel에서 전기영동한 후, ultraviolet lamp를 이용하여 확인하였으며, 이미지(Image-J) 프로그램을 이용하여 도표화하였다.

5. Mitochondrial mass 측정

미토콘드리아 양은 10-N-Nonyl acridine orange (NAO; a fluorescent probe) (ENZO Life Sciences, East Farmingdale, NY, USA) 염색을 이용하여 측정하였다. 분화된 골격근 세포에 농도별로 약물을 24시간 동안 처리한 후, 빛은 차단한 상태에서 10 nM 농도의 NAO로 10분간 염색하였다. 그 후 trypsin으로 세포를 수거하고 PBS로 2회 washing한 후, luminometer (Promega, Fitchburg, WI, USA)를 이용하여

540 nm 파장에서 형광 발현도를 측정하였다.

6. 통계분석

GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 통계처리하였다. 각 3회의 반복 실험의 결과를 mean \pm standard errors of mean으로 나타내고, analysis of variance (Tukey's test)를 사용하여 분석하였으며, 통계적인 유의성은 P-value가 0.05 이하인 경우에 인정하였다.

결과 및 고찰

1. 골격근 세포에서 부자의 PGC-1 α 활성화 효능

PGC-1 α 의 mRNA 및 단백질 발현량을 측정했을 때, 부자 1.0 mg/ml 농도에서 모두 유의하게 증가한 것으로 나타났다(Fig. 1). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma의 coactivator인 PGC-1 α 는 세포 내 에너지 대사를 조절하는 핵심 인자로 당 대사에도 관여하는데, glucose transport 4를 증가시켜 당 대사에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. 본 연구자의 이전 연구에서 부자는 골격근 세포 내에서 당대사를 증가시키는 것을 확인하였는데, 구체적으로 glucose uptake를 증가시키고, glucose consumption을 상승시켰다¹²⁾. 본 결과를 통해 부자의 골격근 세포 내 당대사 조절 효능은 PGC-1 α 의 증가와 관련 있을 것으로 생각된다.

2. 골격근 세포에서 부자의 NRF1 및 TFAM 활성화 효능

PGC-1 α 는 또한 미토콘드리아 생합성을 증가시키는데, PGC-1 α 가 전사인자인 NRF-1 및 TFAM을 활성화시키고, 이는 미토콘드리아 증식과 DNA의 전사를 촉진하여 미토콘드리아 생합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

Table 1. Primer Sequences for Polymerase Chain Reaction Analysis

Primers	Forward	Reverse
PGC-1 α	CAC CAA ACC CAC AGA AAA CAG	GGG TCA GAG GAA GAG ATA AAG TTG
NRF1	AAT GTC CGC AGT GAT GTC C	GCC TGA GTT TGT GTT TGC TG
TFAM	CAC CCA GAT GCA AAA CTT TCA G	CTG CTC TTT ATA CTT GCT CAC AG
GAPDH	ATT CAA CGG CAC ACT CAA GG	CAG TGT AGC CCA AGA TGC CCT

PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, NRF1: nuclear respiratory factor 1, TFAM: mitochondrial transcription factor, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

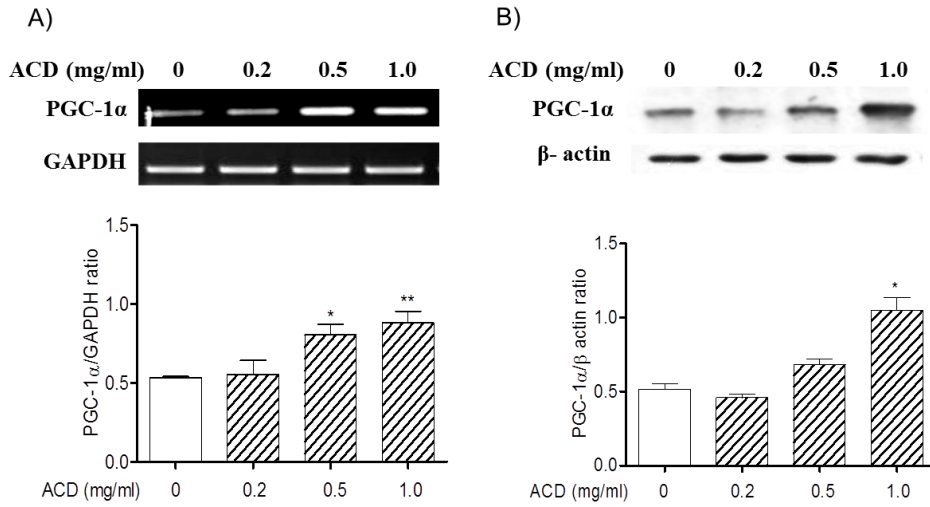


Fig. 1. Effect of ACD extract on the expression of PGC-1 α in C2C12 cells. PGC-1 α mRNA (A) and protein (B) levels were determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and Western blot. Values in histogram are the mean \pm standard errors of means of the three independent experiments. ACD: *Aconitum camichaeli* Debx, PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *P < 0.05 and **P < 0.01 versus non-treated differentiated cells.

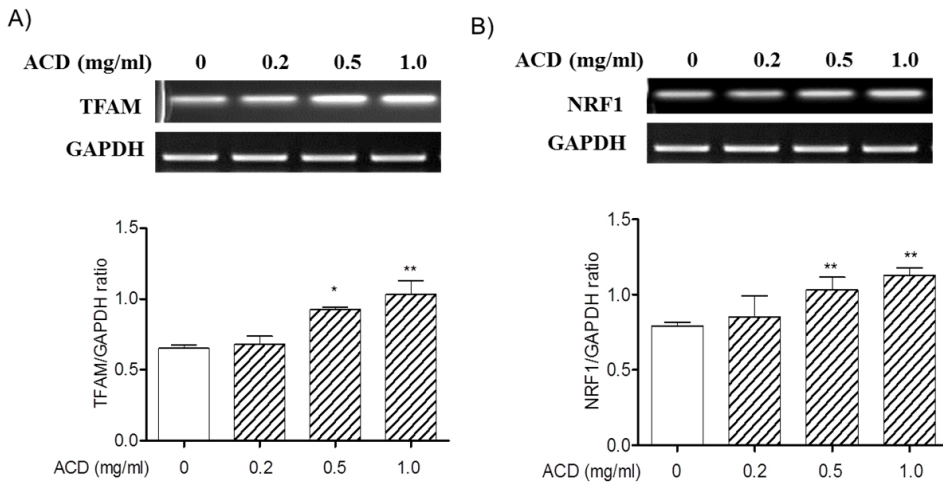


Fig. 2. Effect of ACD extract on the expression of TFAM and NRF1 in C2C12 cells. The mRNA levels of TFAM (A) and NRF1 (B) were determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Values in histogram are the mean \pm standard errors of means of the three independent experiments. ACD: *Aconitum camichaeli* Debx, TFAM: mitochondrial transcription factor, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, NRF1: nuclear respiratory factor 1. *P < 0.05 and **P < 0.01 versus non-treated differentiated cells.

NRF-1 및 TFAM의 mRNA 발현량을 측정하는 결과, 부자가 농도 의존적으로 두 전사인자의 mRNA 발현량을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 2). 따라서 부자가 골격근 내 미토콘드리아 생합성 증가에 관여하리라 추측할 수 있다. 미토콘드리아는 ATP 및 열생산 작용을 하는데, 이전 연구에서 부자추출물 1.0 mg/ml의 농도에서 ATP 생산이 유의하게 증가함을 확인할 수 있었는데, 본 연구결과는 이전 연구결과와 일치하는 바이다.

3. 골격근 세포에서 부자의 미토콘드리아 양 증가 작용

부자 처리로 미토콘드리아 생합성이 증가하여 실제적으로 미토콘드리아 양이 증가되었는지를 확인하기 위하여 NAO 형광 염색법을 통해 실험하였다. NAO는 미토콘드리아

아 내막에 있는 cardiolipin에 특이적으로 부착되는 특징이 있으므로, 미토콘드리아 양이 증가할수록 NAO를 통한 형광 발현량이 증가하게 된다¹⁶⁾. 부자 처리 후 농도 의존적으로 세포내 NAO 부착으로 인한 형광 강도가 증가하는 것으로 나타났으며, 이를 통해 미토콘드리아 양이 증가하였음을 간접적으로 확인할 수 있었다(Fig. 3).

4. 골격근 세포에서 부자의 AMPK 활성화 효능

AMPK는 인산화를 통해 PGC-1 α 활성화에 직접적으로 작용한다⁸⁾. 이에 부자의 PGC-1 α 의 활성화 작용에 AMPK의 관련성을 평가하기 위하여 AMPK 및 pAMPK의 단백질 발현량을 측정하였다. 이전 연구에서 부자가 AMPK의 인산화를 증가시키는 것으로 나타났지만 단일농도(1.0 mg/ml)

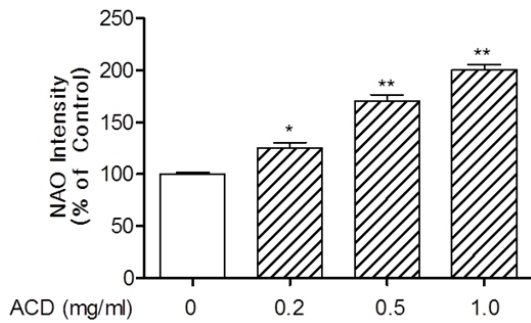


Fig. 3. Effect of ACD extract on mitochondrial mass in C2C12 cells. The mitochondrial mass were measured by fluorescence staining with NAO. Values in histogram are the mean \pm standard errors of means of the three independent experiments. NAO: Nonyl acridine orange, ACD: *Aconitum carmichaeli* Debx. *P<0,05 and **P<0,01 versus non-treated differentiated cells.

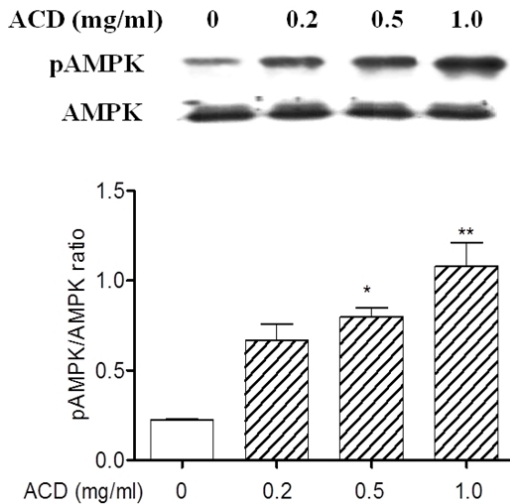


Fig. 4. Effect of ACD extract on phosphorylation of AMPK in C2C12 cells. The protein levels of total AMPK and phosphorylated AMPK were determined by Western blot. Values in histogram are the mean \pm standard errors of means of the three independent experiments. ACD: *Aconitum carmichaeli* Debx, AMPK: adenosin mono-phosphate-activated protein kinase. *P<0,05 and **P<0,01 versus non-treated differentiated cells.

만으로 처리되었기 때문에 농도에 따른 발현량의 변화 및 약물의 작용 여부를 보다 명확히 하기 위하여 부자추출물을 농도별로 처리하고 발현량을 측정하였다. 그 결과 부자 0.5 및 1.0 mg/ml의 농도에서 AMPK의 인산화가 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 이는 앞선 PGC-1 α 발현량의 변화와 일치하는 내용으로 부자는 AMPK 활성화를 통해 PGC-1 α 를 증가시키는 것으로 예상된다(Fig. 4).

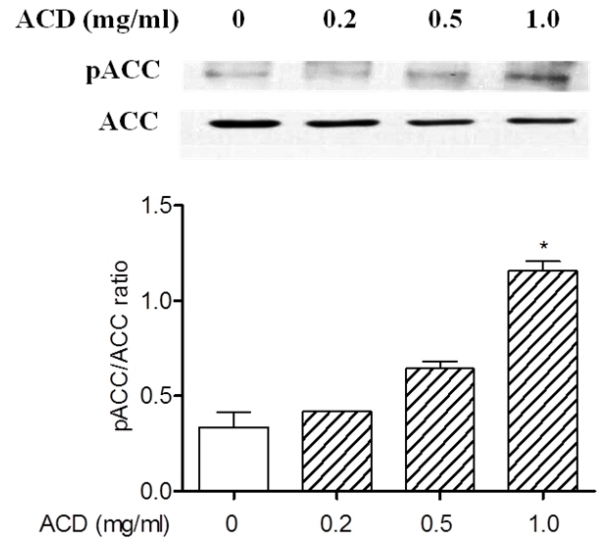


Fig. 5. Effect of ACD extract on phosphorylation of ACC in C2C12 cells. The protein levels of total ACC and phosphorylated ACC were determined by Western blot. Values in histogram are the mean \pm standard errors of means of the three independent experiments. ACD: *Aconitum carmichaeli* Debx, ACC: acetyl-CoA carboxylase. *P<0,05 versus non-treated differentiated cells.

5. 골격근세포에서 부자의 acetyl-CoA carboxylase (ACC) 억제 효능

AMPK가 활성화되면 지질합성에 관여하는 유전자인 ACC가 인산화 및 불활성화된다¹⁷⁾. ACC는 AMPK 하위신호전달 단백질인 ACC의 발현량을 평가하여, 부자의 AMPK 활성 경로를 보다 명확히 하고자 하였다. ACC 및 pACC의 단백질 발현량을 측정된 결과, 부자 1.0 mg/ml에서 ACC의 인산화가 증가되는 것으로 나타났으며(Fig. 5), AMPK의 인산화 결과와도 일치하는 내용이었다. 따라서 부자가 골격근 내에서 AMPK 활성화에 작용함을 보다 명확히 인식할 수 있었다.

한의학에서 氣란 인체를 구성하고 생명을 유지하는 기본적인 요소로 推動, 溫煦, 氣化作用을 나타내며¹⁰⁾, 氣의 溫煦 작용이 약해지면, 陽虛로 발전되어 寒證과 機能低下 상태가 나타나게 된다¹⁸⁾. 한의학에서는 비만의 유형을 陽虛, 脾虛, 食積, 肝鬱, 痰飲, 瘀血의 6가지로 나누어 변증하는데¹⁹⁾, 그 중 식적, 담음, 어혈 등의 병리적 산물도 근본적으로는 기허 및 양허의 병리 상태에서 기인할 수 있으며²⁰⁾, 비만의 유형률이 상승하는 중장년층일수록 기능 부전에 따른 기허의 병리가 심화되므로, 비만 치료에 있어 기허, 양허의 병리는 중요하게 강조되어야 한다. 대사를 증가, 즉 에너지

소비 증가 작용을 통한 항비만 효능은 미토콘드리아의 작용과도 연관되며, 이는 미토콘드리아의 에너지 생산과 열발생 작용으로 나타난다³⁾. 아직 생체에너지 및 미토콘드리아의 작용과 관련된 항비만 약물은 개발되지 않은 상태이므로, 한약 특히 보기, 보양 한약에서 그 가능성을 찾을 수 있을 것이라 기대된다.

한의학에서 부자는 熱性을 가진 대표 약재로 補火助陽, 回陽退陰, 溫中止痛의 효능을 나타내는 대표적인 보양제이다²¹⁾. 변증에 따라 부자를 비만 치료를 위한 한약 처방에서 배합하여 사용하고 있지만, 부자의 항비만 효능에 대한 관련 연구는 부족한 상황이다. 3T3-L1 지방세포 배양모델에서 부자는 지방분화 조절에 유의한 효능을 나타내지 못했는데, 지방세포모델에서의 단순 분화조절 평가 실험은 에너지 조절을 통한 항비만 효능을 평가 모델로는 적합하지 않다고 생각한다²²⁾. 또한 동물 및 인체에서 항비만 작용 관련 연구는 찾기 어려웠으며, 부자의 열 발생 효능과 관련하여 비만형 동물 모델이 아닌 일반식 사료를 공급한 실험쥐에 2주간 부자를 투여했을 때, 부자가 골격근내 UCP 3의 발현량을 증가시킨 것을 확인할 수 있었다²³⁾. 부자의 주요 성분은 aconitine, mesaconitine 등인데²⁴⁾, 본 연구에서는 독성 성분을 완화시키기 위한 전통 수처 방법으로 가공된 포부자를 사용하였다. 부자의 주요 성분과 항비만, 항당뇨 및 에너지 조절 관련 효능은 특별히 연구된 바가 없었다.

한편, 부자는 본 실험과 동일한 골격근세포 모델을 사용한 저자의 선행연구에서 당대사를 증가시키고, ATP 생산을 증가시키는 것으로 나타났다¹²⁾. 본 연구에서는 에너지 조절 및 미토콘드리아 생합성과 관련된 PGC-1 α 및 NRF1, TFAM의 발현량을 증가시키고 이를 통해 미토콘드리아 양을 증가시켰다. 또한 생체 에너지 조절의 또 다른 센서이며, PGC-1 α 를 직접적으로 증가시키는 작용을 하는 AMPK의 활성을 증가시킴을 알 수 있었다. 이는 선행 연구 결과와 약물의 작용 경로가 일치하는 바이며, 이상을 통해 부자가 미토콘드리아 생합성에 관여하며 에너지 대사를 조절에 작용할 것으로 추측된다. 따라서 비만형 동물 모델을 이용한 추후 연구를 통해 부자의 항비만 효능, 에너지 대사 조절 및 미토콘드리아 기능 조절 효능을 보다 구체적으로 평가할 필요가 있다. 또한 부자뿐만 아니라 여러 한약에서 생체 에너지 조절을 통한 항비만 효능 평가 연구를 계속적으로 진행

하여 기존의 항비만 약과 차별되는 한약의 효능을 과학적으로 규명 및 발견할 필요가 있다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건 의료기술연구개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : HI15C0127).

References

1. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight, fact sheet [Internet]. Geneva: WHO; [cited 2016 Oct 3]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en>.
2. Statistics Korea. Korean national health and nutrition survey data [Internet]. Daejeon: Statistics Korea; [cited 2016 Nov 1]. http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=2705.
3. Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 ; 9(6) : 465-82.
4. Daneschvar HL, Aronson MD, Smetana GW. FDA-approved anti-obesity drugs in the United States. *Am J Med*. 2016 ; 129(8) : 879.e1-6.
5. Krssak M, Petersen KF, Dresner A, DiPietro L, Vogel S, Rothman D, et al. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1H NMR spectroscopy study. *Diabetologia*. 1999 ; 42 : 113-6.
6. Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, Manco M, Morroni M, Cinti S, et al. Insulin resistance in morbid obesity reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes*. 2002 ; 51 : 144-51.
7. Liang H, Ward WF. Pgc-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Eudc*. 2006 ; 30 : 145-51.
8. Koh HJ, Brandauer J, Goodyear LJ. LKB1 and AMPK and the regulation of skeletal muscle metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 ; 11(3) : 227.
9. DC Wallace. Mitochondria as chi. *Genetics*. 2008 ; 179(2) : 727-35.
10. Bae BC. Basic Korean medicine. Seoul : Seongbosa. 1997 : 385-416.
11. Song MY. The effects of Astragali radix extracts on mitochondrial function in C2C12 myotubes. *J Korean Med Obes Res*. 2014 ; 14 : 55-62.
12. Song MY. The effects of Cinnamomum cassia Blume, Aconitum carmichaeli Debx, and Pueraria lobata Benth on glucose and

- energy metabolism in C2C12 myotubes. *J Korean Med Obes Res.* 2015 ; 15 : 131-6.
13. Song MY, Kang SY, Oh TW, Kumar RV, Jung HW, Park YK. The roots of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi enhanced glucose and lipid metabolism in C2C12 myotubes via mitochondrial regulation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015 ; 2015 : 643654.
 14. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005 ; 1(6) : 361-70.
 15. Richard C. Scarpulla. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta.* 2011 ; 1813(7) : 1269-78.
 16. Reipert S, Berry J, Hughes MF, Hickman JA, Allen TD. Changes of mitochondrial mass in the hemopoietic stem cell line FDCP-mix after treatment with etoposide: a correlative study by multiparameter flow cytometry and confocal and electron microscopy. *Exp Cell Res.* 1995 ; 221 : 281-8.
 17. Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferfe P, Foufelle F. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1998 ; 273 : 14767-71.
 18. Choi SH. The pathology of Korean medicine. Seoul : Iljoongsa. 1997 : 310-8.
 19. Moon JS, Kang BG, Ryu EK, Choi SM. A study of syndrome of index differentiation in obesity. *J Korean Med Obes Res.* 2007 ; 7(1) : 55-69.
 20. Kim SJ, Shin SW, Kim HJ. Obesity from the view point of metabolic rate. *J Korean Med Obes Res.* 2003 ; 3(1) : 95-105.
 21. Textbook compilation committee of national university of Korean medicine. *Herbology.* Seoul : Yeonglimsa. 1991 : 121-3, 333-4.
 22. Roh C, Jung U. Screening of crude plant extracts with anti-obesity activity. *Int J Mol Sci.* 2012 ; 13(2) : 1710-9.
 23. Kang BK, Kim EK, Kim IS, Hwang TO, Lee SW, Lee SK, et al. Effects of buja·padu·daehwang·seokgo extract on UCPs expression in mice. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2007 ; 21(6) : 1407-10.
 24. Wang Z, Wen J, Xing J, He Y. Quantitative determination of diterpenoid alkaloids in four species of *Aconitum* by HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 2006 ; 40(4) : 1031-4.