大韓本草學會誌 제33권 제2호(2018년 3월)
Kor. J. Herbol. 2018 ; 33(2) : 69-77

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2018.33.2.69.

대시호탕의 새로운 제형이 3T3-L1에서 지방세포 증식과 분화 과정에 미치는 영향

최혜민#, 김세진, 문성옥, 이지범, 이하영, 김종범, 이화동*

한약진흥재단, 한약제제팀

Effects for the New Formulation of Daesiho-tang on adipocyte development and differentiation in 3T3-L1

Hye-Min Choi#, Se-Jin Kim, Sung-Ok Moon, Ji-Beom Lee, Ha-young Lee
Jong-Beom Kim, Hwa-Dong Lee*

Korean Medicine Preparation Team,
National Development Institute of Korean Medicine (NIKOM), Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Daesiho-tang (DSHT) has been widely used in the treatment of cerebral infarct in traditional medicine. However, there was not report on the anti-obesity-related diseases efficacy of DSHT. In this study, we investigated the effects for the new formulation of DSHT, on the adipocyte differentiation cycle in 3T3-L1 cells.

Methods : 3T3-L1 cells were treated with DSHT (50, 100, 200 ㎍/㎖) during differentiation for 6 days. Also, the inhibitory effect of DSHT against 3T3-L1 adipogenesis was evaluated in various stage of adipogenesis such as early (0-2day), intermediate (2-4day), and terminal stage (4-6day). The accumulation of lipid droplets was determined by Oil Red O staining. and, the expressions of genes related to adipogenesis were measured by RT-PCR and Western blot analyses.

Results : DSHT showed inhibitory activity on adipocyte differentiation at 3T3-L1 preadipocytes without affect cell toxicity as assessed by measuring fat accumulation and adipogenesis. In addition, DSHT significantly reduced the expression levels of several adipocyte marker genes including proliferator activated receptor-γ (PPAR-γ) and CCAAT/ enhancer-binding protein-α (C/EBP-α). Also, the anti-adipogenic effect of DSHT was strongly limited in the intermediate (2-4 day), terminal stage (4-6 day) of 3T3-L1 adipogenesis. In addition, the DSHT treatment down- regulated mRNA expression levels of PPAR-γ ,, C/EBP-α in mature 3T3-L1 adipocytes.

Conclusions : These results suggest that, the ability of DSHT has inhibited overall adipogenesis and lipid accumulation in the 3T3-L1 cells. The new formulation of DSHT may be a promising medicine for the treatment of obesity and related metabolic disorders.

Key words : Daesiho-tang, Traditional medicine, Anti-obesity, 3T3-L1 preadipocyte, differentiation cycle

Ⅰ. 서 론

『傷寒論』에 처음으로 수록된 대시호탕(大柴胡湯)은 東醫寶鑑 및 李濟馬의 저서인 四象草本卷, 東醫壽世保元 등 많은 한방문헌에 기록되어 있다[1]. 본 處方은 小柴胡湯과 小承氣湯을 加減하여 이루어진 것으로, "太陽病過經十餘 日 反二三日下之

*Corresponding author : Hwa-Dong Lee. Korean Medicine Preparation Team, NIKOM, Korea.
· Tel : +82-53-810-0332 · E-mail : herb@nikom.or.kr
#First author : Hye-Min Choi. Korean Medicine Preparation Team, NIKOM, Korea.
· Tel : +82-53-810-0358 · E-mail : hyemin@nikom.or.kr
· Received : 18 January 2018 · Revised : 2 March 2018 · Accepted : 15 March 2018

後四五日 柴胡證仍在者 先與小柴胡湯幅不止 心下急 懇懇微煩者 爲未解也 與大柴胡湯 下之則愈"라 하여 처음 收載된 以後 少陽陽明合病證에 主로 活用되어, 주로 寒熱成 질환에 널리 이용된 처방이다[2]. 현대에 와서 大柴胡湯과 관련된 과학적 연구로 진통, 해열 관련 질환 연구[3]와 간보호[4-6], 혈관 및 혈압 관련 질환[7-10]등에 미치는 영향에 대한 연구가 주로 이루어져 왔고, 최근에는 비만 및 비만과 관련한 합병증에 대한 大柴胡湯의 효능을 지질함량에 미치는 효과에 대한 연구로 이루어지고 있다[10-13]. 하지만 대시호탕의 지방세포 분화조절에 관련하여 분자 기전적으로는 연구된 바 없어 본 연구를 실시하였다.

오늘 날 세계 각국에서는 급속한 경제성장으로 서구화된 생활방식에 따라 과잉 에너지 섭취 및 사용의 불균형을 초래하여 비만이 급증하고 있다. 비만은 섭취 에너지양이 소비 에너지양보다 많아서 남은 에너지가 체지방으로 조직에 침착되어 외형상의 문제 뿐 아니라 각종 혈관질환과 지질이상증 등과 같은 심각한 대사 장애 질환 등을 동반하고 있어 문제시 되고 있다[14]. 특히 소아 및 청소년의 비만은 지방세포 비대성인 성인기 비만과는 달리 지방세포 증식성으로 치료가 어렵고 성인 비만으로의 강한 이행 관계를 가지고 있으며, 사춘기의 조기 도래와 연관이 높아 성인기에 시작된 비만보다 적극적인 관리와 예방 및 치료가 필요하며, 그 시점도 중요하다[15-16]. 현대사회에서는 비만의 예방과 치료를 위한 연구가 많이 이루어지고 있고, 이에 항비만 효과가 있는 안전성이 입증된 한약 및 한약제제를 이용한 연구와 제품 개발의 관심도 집중되고 있다. 따라서, 본 연구는 임상적으로 기관지염, 천식, 과민성 장 증후군, 소화성 궤양 등을 치료하는 처방인 대시호탕(大柴胡湯)을 3T3-L1 세포를 이용하여 지방전구세포의 증식억제(초기분화). 지방형성 억제(중기분화), 지방분해(후기분화) 등의 기전을 확인하고, 유의한 결과를 얻었고, 이에 대한 연구 결과를 바탕으로 건강보험용 혼합단미연조엑스제로 제형개발을 함으로써, 이를 보고하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 한약재 및 첨가제

본 연구에 사용된 대시호탕 (DSHT) 및 방풍통성산 (BTS) 처방 구성 약재들은 ㈜휴먼허브 (경북 경산, 한국)에서 구입하였고, 연조엑스제 제형개발에 필요한 첨가제는 화성화공약품상사(주)에서 구입하였다.

2) 세포실험 분석 시약

Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Penicillin-streptomucin, Phosphate buffered saline (PBS)는 Hyclone사 (USA)제품을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약 중 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Dexamethasone (DEX), Oil red O 시약들은 Sigma Aldrich사 (USA), Bovine calf serum (BCS), Insulin 시약은 Thermo Scientific사 (USA), PPAR-γ,, β -actin 1차 항체는 cell signaling technology사 (USA)에서 구입하였고, 2차 항체는 Santa Cruz사 (USA)에서 구입하였다.

3) 성분분석 시약 및 기기

표준물질인 baicalin, baicalein, naringin 및 paeoniflorin은 Sigma-Aldrich (St. Louis. MO, USA), rhein은 Fluka (Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. wogonin는 식품의약품안전처에서 분양 받아 사용하였으며 각 표준물질의 순도는 95% 이상이었다. 시료 전처리 및 HPLC 분석을 위한 methanol, acetonitrile는 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며 phosphoric acid는 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 분석을 위한 HPLC는 Agilent 1260 HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였으며, 분석 data 처리에는 Agilent OpenLAB CDS Chem-Station (A.02. 08)을 이용하였다.

2. 방법

1) 처방 구성 및 추출방법

본 연구에 사용한 DSHT은 혼합제제로써 공정서 (대한민국 한약(생약) 규격집, KHP)에 표기된 대시호탕의 개별 한약재 1 ㎏을 정선하여 대한약전 제제총칙 엑스제의 제법에 따라 절도 및 분말도에 따라 조절로 하고, 약탕기 (대웅약탕기, 서울, 한국)로 정제수 10 배량을 가해 100℃에서 3시간 침출한 다음 Whatman filter paper (No. 4)로 여과하고, 생약의 침출액을 농축 (85℃이하, 감압농축)한 연조엑스를 얻은 것으로 KHP에 따른 수율과 고형물 함량에 대비하여 혼합 용량을 설정하였다 (표 1). 대조군으로 사용한 BTS는 복합제제로써 표 2와 같이 한국의 공정서에 표기된 처방 약재를 각 구성 비율로 배합한 후 약탕기 (대웅약탕기, 서울, 한국)로 10배의 정제수와 100℃에서 3시간동안 추출한 후, Whatman filter paper (No. 4)로 여과하고 감압동결건조기를 사용하여 분말을 얻었다 (수율 BTS : 23.70%).

Table 1. The contents and dosage of Daesihotang (DSHT).

	Herbal Name	Country of Origin	Pharmacopoeia (g)	Yield (%)	Soft extract (g)	Dry matter content (%)
Daesiho-tang Soft extract	*Bupleurum chinense* DC	China	5.00	10.3	1.03	50.0
	Scutellaria baicalensis Georgi	China	3.13	28.0	1.25	70.0
	Paeonia lactiflora Pallas	Kyong Puk, Ui Seong	3.13	17.0	0.82	65.0
	Rheum tanguticum Maximowicz ex Balf	China	2.50	21.3	1.78	30.0
	Poncirus trifoliata Rafinesque	Kyong Puk, Gyeong Ju	1.88	18.0	0.85	40.0
	Pinellia ternata Breitenbach	China	1.25	15.3	0.64	30.1
	Total		16.89		**8.14**	

Table 2. The contents and dosage of Bangpungtong- sungsan (BTS).

Pharmacognistic name (BTS)	Country of Origin	Pharmacopoeia (g)
Glycyrrhiza uralensis Fischer	China	0.67
Playtcodon grandiflorum A. De Candolle	China	0.67
Angelica gigas Nakai	Kyong Puk, Bong Hwa	0.4
Rheum tanguticum Maximowicz	China	0.5
Ephedra sinica Stapf	China	0.4
Sodium sulfate	China	0.5
Mentha arvensis Linne var. piperascens Malinvaud	Kyong Puk, Go Ryeong	0.4
Saposhnikovia divaricata Schiskin	China	0.4
Atractylodes macrocephala Koidzumi	China	0.67
Zingiber officinale Roscoe	Chung Nam, Seo San	0.4
Gypsum Fibrosum	China	1
Forsythia suspensa Vahl	China	0.4
Paeonia lactiflora Pallas	China	0.4
Cnidium officinale Makino	Kyong Puk, Young Yang	0.4
Gardenia jasminoides Ellis	China	0.4
Schizonepeta tenuifolia Briquet	China	0.4
Talcum	China	1.67
Scutellaria baicalensis Georgi	China	0.67

2) 세포독성평가

DSHT의 3T3-L1 세포에 대한 독성정도를 알아보기 위하여 3-[4,5-dimethylthiazolyl]-2,5-diphenyltetra zolium bromide (MTT) assay를 수행하였다. 먼저, 3T3-L1 세포(1X104 cell / 96well)을 Seeding 후, 24시간 뒤 100, 200, 500, 1000, 2000 ㎍/㎖ 농도별로 처리하여 24시간 배양 후, MTT 시약을 첨가하여 2시간 동안 반응하고, 490 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 정도는 시료를 처리하지 않은 대조군(CON)과 약물 처리군의 비율로 계산하였다.

Cell viability (%)
= 100 × (treated sample)/(Non-treated sample (CON))

3) 3T3-L1 세포 배양 및 분화유도

3T3-L1 마우스유래 배아섬유아세포는 미국세포주은행(American Type Culture Collection;ATCC, CL-173TM)에서 구입하여 사용하였으며, 세포는 10% BCS, 1% P/S을 포함한 DMEM 배지로 37 ℃, 5% CO2 배양기 (MCO-15AC, SANYO, Japan)에서 배양하였다. 배양된 세포는 6-well plate에 seeding 후, 120% 이상 confluence 상태가 되면 배양액을 분화유도 배양액 (0.5 mM IBMX, 2 μ*M* DEX, 167 nM insulin (MDI) / 10% FBS)으로 바꾸고 3일간 배양한다. 2일 후 167 nM insulin / 10% FBS 배지로 교환하며 성숙한 지방세포(adipocytes)로 만들었다. 실험군 DSHT 및 대조군 BTS는 농도별로 배지 교체시기마다 함께 처리하여 6일동안 처리하여 분화유도 하였다. 그리고 표 4와 같이 6일간 분화유도하며 초기분화, 중기분화, 말기분화 별로 구분하여 DSHT 및 대조군 BTS을 200 ㎍/㎖의 농도로 167 nM insulin / 10% FBS 배지와 함께 처리하였다.

초기 분화	**0Day**	**2Day**	**2Day**	**4Day**	**4Day**	**6Day**	**1차**
	MDI+ 10% FBS+ DSHT/BTS		Insulin+10% FBS				Oil red O, RNA Sampling
중기 분화	0Day	2Day	2Day	4Day	4Day	6Day	2차
	MDI+ 10% FBS		Insulin+ 10%FBS+ DSHT/BTS		Insulin+ 10% FBS		Oil red O, RNA Sampling
말기 분화	0Day	2Day	2Day	4Day	4Day	6Day	3차
	MDI+ 10% FBS		Insulin+ 10% FBS		Insulin+ 10%FBS+ DSHT/BTS		Oil red O, RNA Sampling

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

5) 중합효소 연쇄반응법 (RT-PCR)에 따른 지방분화 조절 유전자 측정

50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도로 DSHT 및 BTS를 분화유도시기별로 처리하며 배양한 3T3-L1 세포를 TRI-zol (Takara, Japan)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA는 1 ㎍로 정량하여 Oligo-dT, DEPC를 첨가한 완충 반응액 (*Maxime* RT PreMix, intron, USA)을 넣어 45 ℃에서 약 60분간 반응시킨 후 95 ℃에서 5분간 처리하여 cDNA를 합성하였다. 이 template cDNA와 Taq polymerase 등이 포함된 반응 혼합액 (WizPure™FX-PCR 2X Master, Wizbio,

Korea)과 각각의 Primer sequuence인 5'-ATT CTG GCC CAC CAA CTT CGG-3' (Forward), 5'-TGG AAG CCT GAT GCT TTA TCC CCA-3' (Reverse); Peroxisome proliferator activated receptor-γ (PPAR-γ), 5'-GCA ACG CCG CCT TTG GCT TT-3' (Forward), 5'-AGT GCG CGA TCT GGA ACT GC-3' (Reverse); CCAAT-enhancer-binding proteins-α (CEBP-α), 5'-CAA CTC CCA CTC TTC CAC CT-3' (Forward), 5'-CTT GCT CAG TGT CCT TGC TG-3' (Reverse); Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)로 PCR 증폭 후, 1.5% Agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

6) Western Blotting에 따른 지방분화 조절 단백질 측정

50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도로 DSHT 및 BTS를 처리하며 분화 유도하여 3일간 배양한 3T3-L1 세포를 1X PBS로 세척 후, Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail을 포함하는 RIPA buffer (PIERCE, USA)로 균질화 하였다. 균질화된 samples은 적정량의 단백질로 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-PAGE에 분리한 후, PVDF membrane으로 단백질을 전이시켰다. 그 후, 5% Skin milk를 처리하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 하였고, 1차 항체 (PPAR-γ, β-actin)를 4 ℃에서 Overnight 반응 시킨 후, HRP가 중합된 2차 항체를 반응시켰다. Immuno-positive bands는 enhanced chemiluminescent (ECL, Thermo Scientific, USA)에 의해 감광시켜 cheiluminescent detection system을 이용하여 현상하였다.

7) DSHT의 제형개발

연구에 사용된 DSHT은 혼합단미연조엑스제 (DSHT-SE)로 제형개발하였고, 이에 필요한 첨가제는 식품공전 및 의약품 첨가제 평가 가이드라인의 공정서에서 제시하는 품목으로 벤조산나트륨은 보존제로, β-사이클로덱스트린은 포접제, 올리고당 및 수크랄로스는 감미제, 구연산 및 구연산삼나트륨은 산도제, 매실향은 착향제, CMC-Na는 점증제로서 각각의 역할로 기준치를 넘지 않는 구성 비율로 혼합한 후 제조하였다 (표 4).

Table 4. The content and dosage of Daesiho-tang Soft extract (DSHT-SE).

	Name	Content (g)	Ratio (%)	
Excipient	Daesiho-tang Soft extract	8.140	54.27	
	D.W	4.421	29.47	
	Sodium benzoate	0.009	0.06	
	β-Cyclodextrin	1.050	7.00	
	Oligosaccharide	0.900	6.00	
	Sucralose	0.0075	0.05	
	Trisodium Citrate	0.0075	0.05	
	Citric acid	0.015	0.10	
	Plum aroma	0.300	2.00	
	CMC-Na	0.150	1.00	
Total		15.00	100.00	

8) 표준액의 조제

baicalin, baicalein, naringin, paeoni-florin, rhein 및 wogonin 6종의 표준품을 methanol로 녹여 모두 1 ㎎/㎖의 농도로 조제한 후 사용하기 전 희석하여 표준액으로 사용하였다.

9) 검액의 조제

DSHT 혼합단미연조엑스제 (DSHT-SE) 0.1회분을 정제수 10 ㎖ 에 완전히 녹인 다음 동량의 메탄올을 첨가하여 2배 희석 혼합 후 원심 분리한 상층액을 0.2 ㎛ mambrane (Advantec Toyo Co, Japan)으로 여과하여 검액으로 사용하였다.

10) HPLC 분석조건

Agilent 1200 HPLC system을 사용하였고, 컬럼은 YMC-Triart C18 (5 ㎛, 4.6mm I.d.×250 ㎜, YMC Co., Kyoto, Japan)을 사용하였다. 유속은 1.0 ㎖/min으로 하였으며 시료는 10 ㎕를 주입하였다. 이동상은 0.05% phosphoric acid을 포함하는 water (A)와 0.05% phosphoric acid을 포함하는 acetonitrile (B)을 표 5과 같이 흘려주었으며 검출파장은 230 ㎚로 하였다.

Table 5. Solvent gradient condition for HPLC Analysis

Time (min)	Solvent A (%)[a]	Solvent B (%)[b]
0	85	15
45	70	30
50	65	35
55	45	55
60	50	50
65	0	100

a) 0.05% phosphoric acid in water
b) 0.05% phosphoric acid in acetonitrile

3. 통계분석

실험결과의 통계 처리는 SPSS package를 이용하였으며, 실험에 대한 측정값은 mean±SEM로 표시하였고 분석에 대한 유의성은 one-way ANOVA를 실시, 분석결과에 대한 $p < 0.05$, $p < 0.01$의 수준에서 LSD 다중검정법으로 사후검정을 실시하여 각 처리구간의 평균치에 대한 유의성을 분석하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 3T3-L1 지방전구세포에 대한 DSHT의 세포독성

DSHT 처리에 의한 T3- L1 지방전구세포의 세포독성 검사를 위해서 DSHT과 대조군인 BTS을 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 MTT assay를 수행하였다 (Fig 1). 3T3-L1 지방전구세포에 대한 세포독성은 DSHT 및 BTS을 처리하지 않고 배양한 대조군 (CON)의 세포생존율 100%를 기준으로 DSHT에서 250 ㎍/㎖ 농도까지 유의한 세포독성이 나타나지 않았다. 따라서, 본 연구는 안전한 200 ㎍/㎖ 이하의 농도 범위에서 수행하였다.

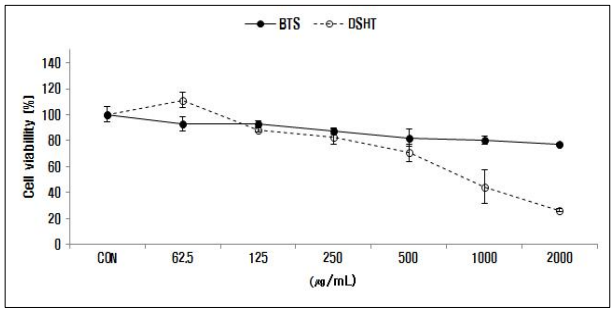

Fig 1. Effect of Daesiho-tang(DSHT) on the viability of 3T3-L1 cells. Cells were treated with indicated concentrations of DSHT for 24 h. The values of independent experiments are expressed as means ± SEM (n=3).

2. DSHT이 지방세포분화에 미치는 영향

3T3-L1 지방전구세포에 DSHT 및 BTS를 처리하며 6일 동안 분화를 유도한 후 Oil red O 염색을 통하여 지방세포 분화 정도를 측정한 결과, 분화를 유도한 지방세포 (MDI)에서는 지방전구세포 (Control)에 비해 유의적인 지방 분화를 나타내었다. 이에 비하여, 지방분화를 유도하며 DSHT을 함께 처리한 세포는 100, 200 ㎍/㎖의 농도에서 농도 의존적으로 23.54±1.36 %, 81.41± 2.20 %의 감소율로 대조군 BTS의 21.27±2.86%, 26.76± 1.86%의 감소율에 비해 유의적인 지방분화 억제경향을 나타내었다 (Fig 2).

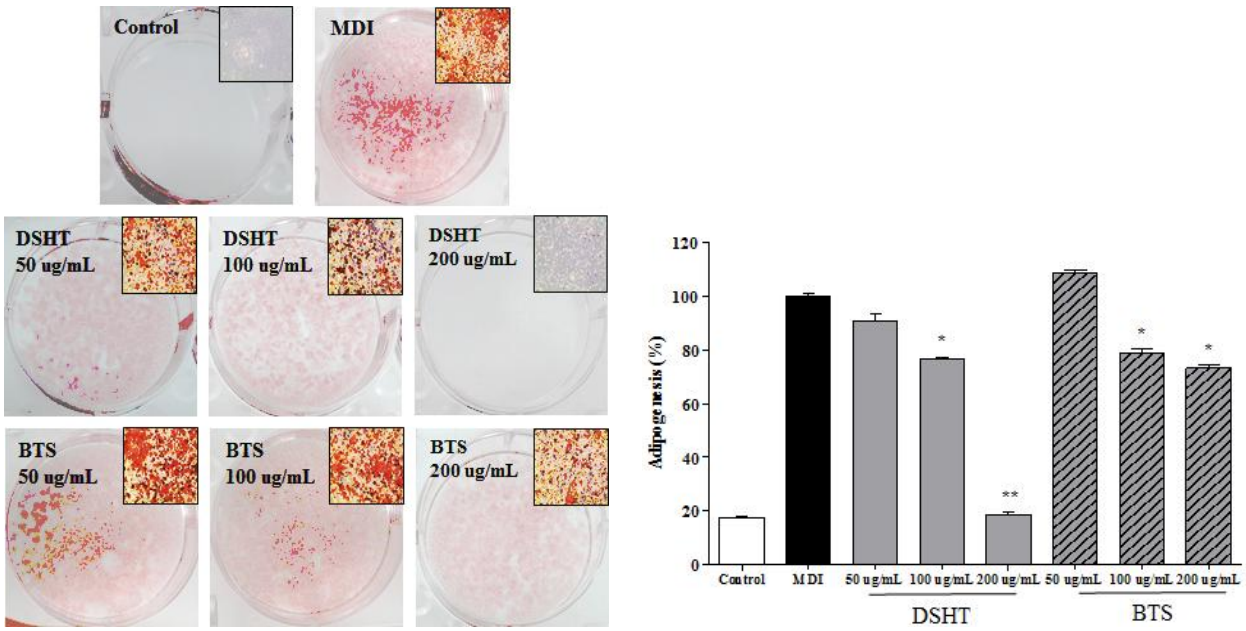

Fig 2. Effect of Daesiho-tang(DSHT) on lipid accumulation during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. The intracellular lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining. The values of independent experiments are expressed as means ± SEM (n=6). *P < 0.05, **P < 0.01 vs MDI. (Control : Preadipocytes, MDI : Adipocytes)

3. DSHT이 지방세포 분화 조절인자에 미치는 영향

DSHT의 항비만 효과에 대한 분화 조절인자에 미치는 영향을 조사하기 위해 DSHT 및 양성대조군 BTS을 처리하여 분화를 유도한 3T3-L1세포에서 지방 생성의 주요 전사인자인 CEBP-α와 PPAR-γ의 유전자 및 단백질 발현을 측정하였다.

그 결과, 지방전구세포 (Control)에 비해 분화를 유도한 지방세포 (MDI)의 경우 CEBP-α와 PPAR-γ의 유전자 및 단백질 발현이 유의적으로 증가 하였으나, DSHT 100, 200 ㎍/㎖을 처리한 군에서의 CEBP-α의 유전자 발현이 대조군 BTS 200 ㎍/㎖의 72.96±0.008%의 감소율에 비해 80.99±0.006%, 66.45±0.0001%로 유의적인 감소를 나타내었으며, PPAR-γ의 유전자 및 단백질 발현에서 BTS 200 ㎍/㎖는 각각 57.31±6.92%, 47.81±8.91%로 DSHT은 50, 100, 200 ㎍/㎖을 처리한 군에서 PPAR-γ의 유전자 발현 60.03±0.73%, 78.66±1.39%, 65.84±0.71%의 감소율과 단백질 발현 3.15±7.07%, 78.71±6.42%, 89.07± 7.58%으로 농도 의존적으로 유의적인 감소 결과를 보였다(Fig 3).

5. 분화 시기별 DSHT 처리에 따른 지방세포 분화에 미치는 영향

3T3-L1 지방세포 분화모델을 이용하여 DSHT 및 BTS의 3T3-L1 분화시기별로 분화 억제능을 확인하고자 하였다. 그 결과, 6일간 분화를 유도한 지방세포 (MDI)에서는 지방전구세포 (Control)에 비해 유의적인 지방 분화를 나타냄에 비하여, 지방분화를 유도하며 DSHT 200 ㎍/㎖을 함께 처리한 세포는 초기분화 (증식억제, 0-2day), 중기분화 (지방형성 억제, 2-4day), 후기분화 (지방분해, 4-6day)별로 29.69± 1.07%, 33.23±0.27%, 37.44±3.08%의 감소율로써 DSHT은 초기, 중기, 후기 모든 분화시기에서 지방분화를 감소함을 나타내었고, 대조군 BTS 200 ㎍/㎖는 후기분화에서만 26.15±0.63%로 유의적인 지방분화 억제경향을 나타내었다 (Fig 4).

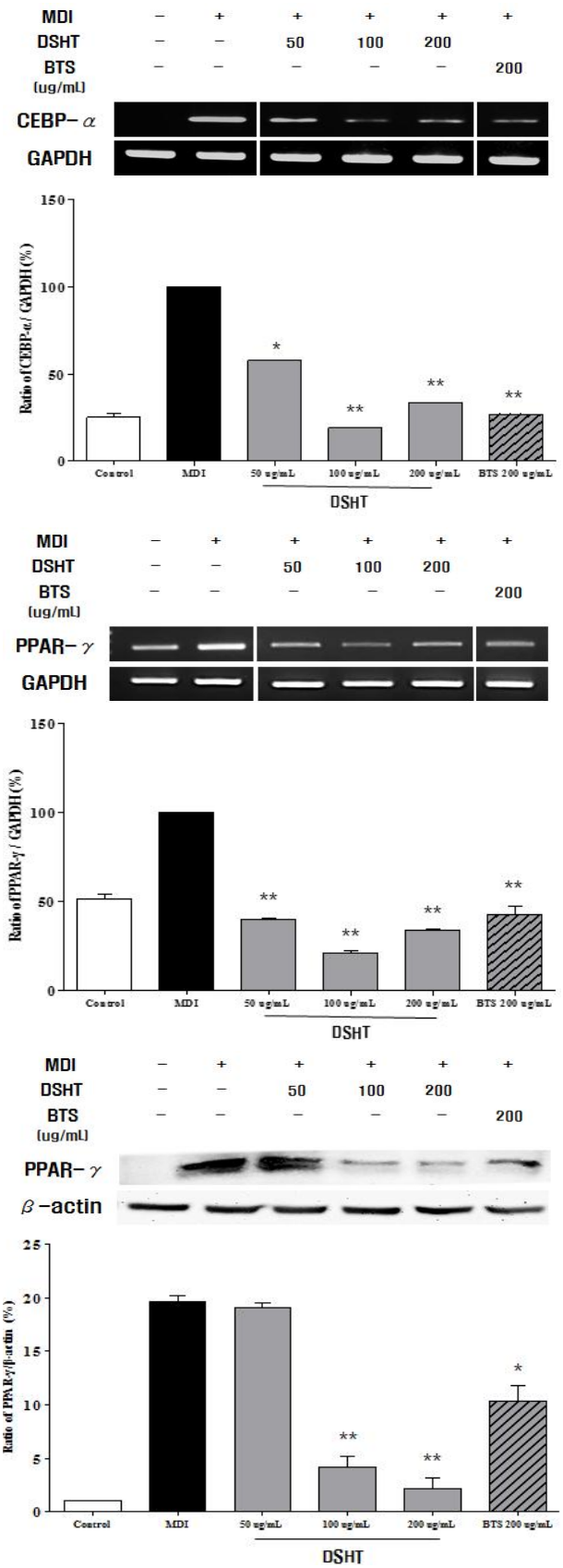

Fig 3. Effect of Daesiho-tang(DSHT) on the expression of C/EBP-α and PPAR-γ mRNA and protein in 3T3-L1 adipocytes.
The cells were treated with DSHT and BTS at different concentrations for During 8 days on differentiation. The values of independent experiments are expressed as means ± SEM (n=3). *P<0.05, **P<0.01 vs MDI. (Control : Preadipocytes, MDI : Adipocytes)

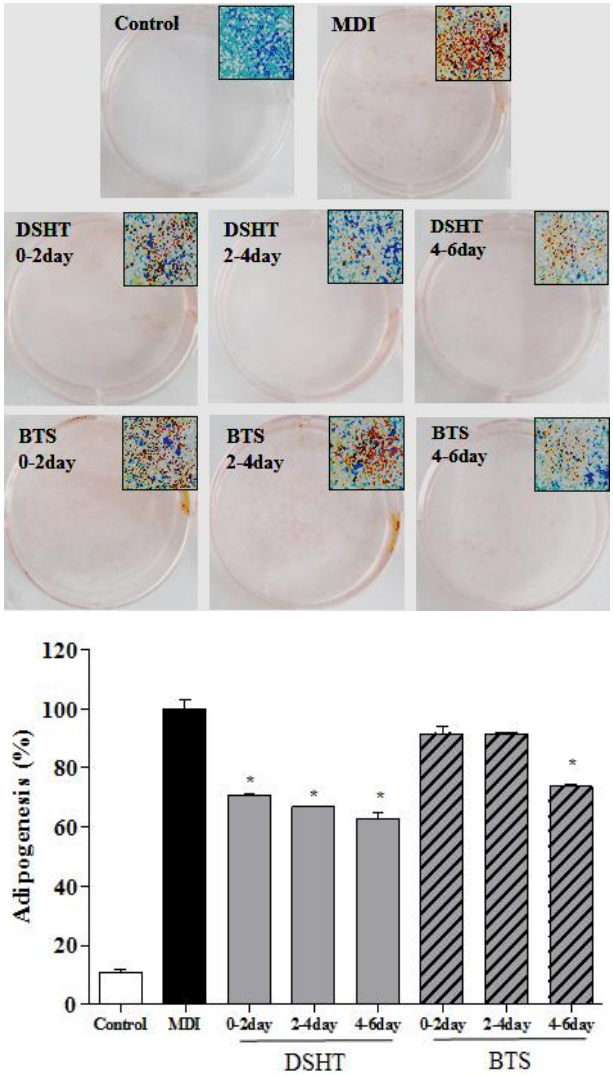

Fig 4. Effect of Daesiho-tang(DSHT) according to the treatment of 3T3-L1 adipogenesis early (0-2 day), middle (2-4 day), and late fat production (4-6 days).
The intracellular lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining. The values of independent experiments are expressed as means ± SEM (n=4). *P<0.05, **P<0.01 vs MDI. (Control : Preadipocytes, MDI : Adipocytes)

6. 분화시기별 DSHT 처리에 따른 지방세포 분화 조절인자에 미치는 영향

DSHT의 분화시기별로 분화 조절인자에 미치는 영향을 조사하기 위해 DSHT 및 양성대조군 BTS을 분화시기별로 지방세포에 처리하여 지방 생성의 주요 전사인자인 CEBP-α와 PPAR-γ의 유전자 발현을 측정하였다. 그 결과, DSHT 200 ㎍/㎖을 함께 처리한 세포는 중기분화 (지방형성 억제, 2-4day), 후기분화 (지방분해, 4-6day)에서 CEBP-α 50.21±14.14%, 73.88± 7.07%의 감소율과 PPAR-γ 43.68±7.07%, 47.45±4.24%의 유의적인 감소 경향을 나타내었으며, 대조군 BTS 200 ㎍/㎖는 후기분화에서만 CEBP-α 21.49±7.07 %, PPAR-γ 23.67±4.24%의 감소 경향을 나타내었다 (Fig 5).

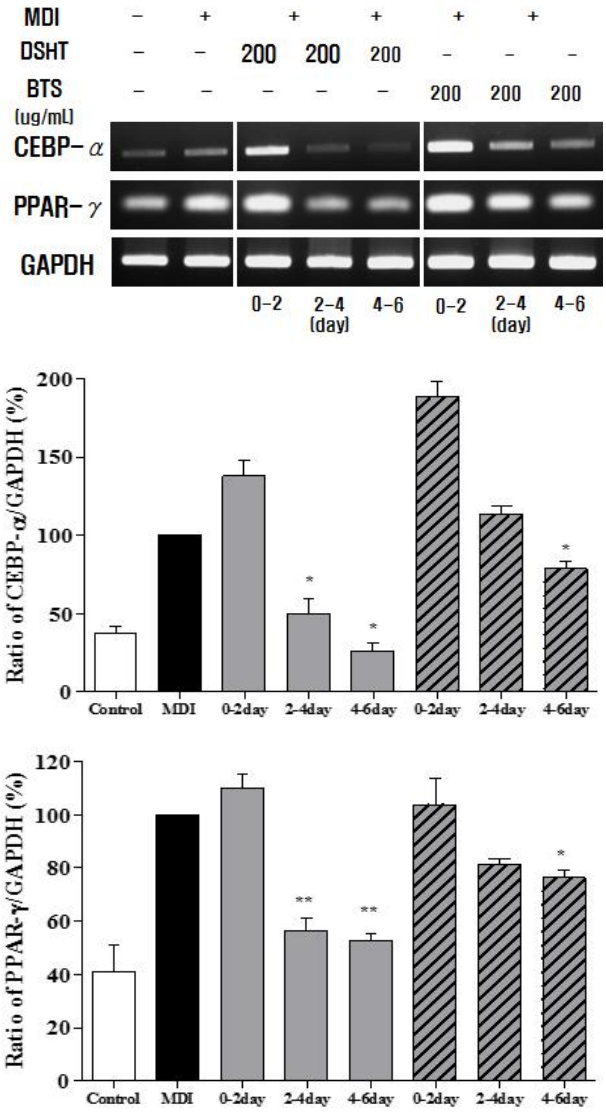

Fig 5. Effect of Daesiho-tang(DSHT) according to the treatment of 3T3-L1 adipogenesis early (0-2 day), middle (2-4 day), and late fat production (4-6 days).
The mRNA expression levels of transcription factors such as C/EBP-α and PPAR-γ was examined by RT-PCR. The values of independent experiments are expressed as means ± SEM (n=3). *P < 0.05, **P < 0.01 vs MDI. (Control : Preadipocytes, MDI : Adipocytes)

7. 개발제형 DSHT-SE의 HPLC 동시분석

개발제형 DSHT-SE의 품질관리를 위해, 구성 한약재 중 황금의 baicalin, baicalein, wogonin, 작약의 paeoniflorin, 지실의 naringin 및 대황의 rhein에 대한 동시분석을 진행하였다. 그 결과, 65분 이내에 모두 분리 되었으며, 이는 230 ㎚에서 검출되었다. 각 성분의 peak의 etention time과 UV 흡수 파장을 비교하여 6종의 지표성분을 확인하였고, 지표성분 paeoniflorin은 12.4분, naringin은 24.4분, baicalin은 34.5분, baicalein은 55.9분, rhein 및 wogonin은 61.4, 61.8분에서 각각 검출되었다 (Fig 6).

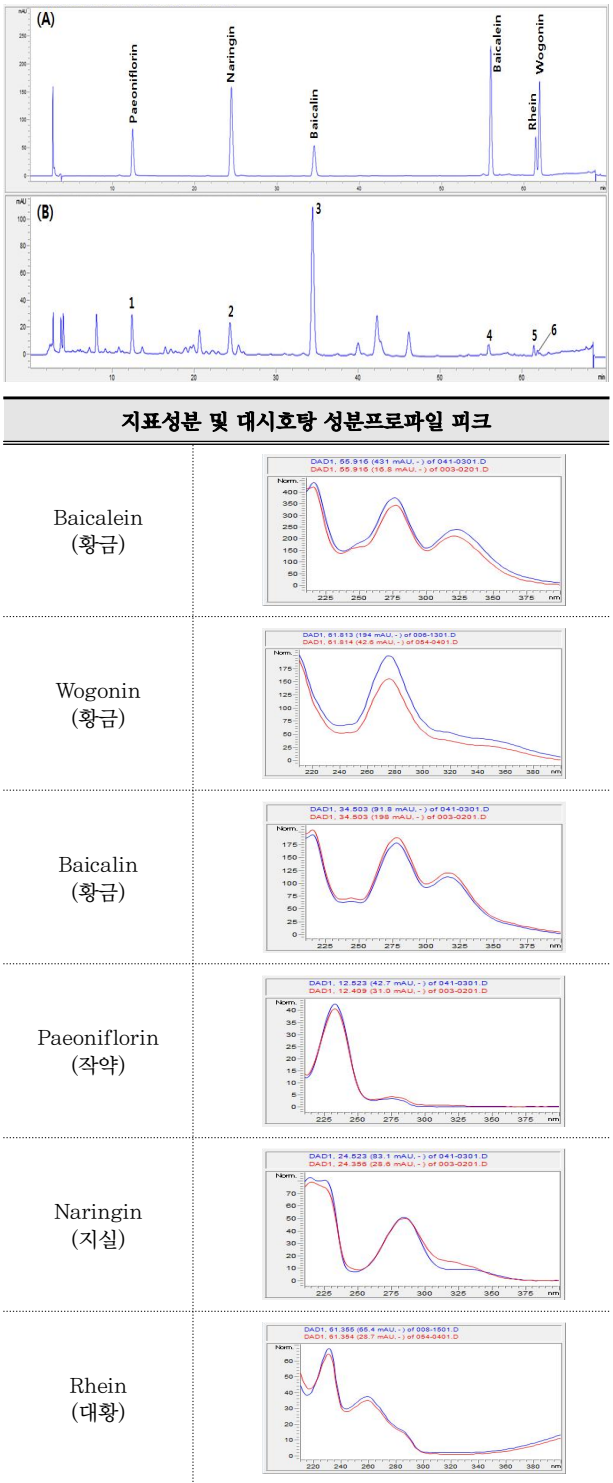

Fig 6. HPLC chromatogram of standard mixture (A) and Daesiho-tang(DSHT) (B) Paeoniflorin (1), Naringin (2), Baicalin (3), Baicalein (4), Rhein (5) and Wogonin (6).

Ⅳ. 고 찰

비만은 인체의 섭취열량이 증가하고, 소모열량이 감소하여 생기는 대사의 불균형으로 과도한 지방 축적이 유발되는데, 이는 지방세포의 크기, 수의 증가에 의해 나타난다. 지방은 인체의 필수적인 구성성분으로, 중요한 열량원이며, 체내 중요

물질의 전구체이기도 하지만, 체지방이 필요 이상으로 축적되면 비만이 되고 이로 인해 당뇨병, 심혈관계질환 등의 질병발생 위험이 높아진다고 알려져 있다[19]. 따라서 지방세포는 단순한 에너지의 저장기관이 아니라 여러 가지 호르몬을 분비하는 내분비기관이기도 하며, 인체 대사에서 대단히 능동적으로 작용하는 장기라는 것이 일반적으로 받아들여지는 사실이다. 섭취한 영양소는 중성지방의 형태로 지방 조직에 축적되며, 비만은 지방세포의 비대 (Hypertrophy)와 과형성(Hyperplasia)으로 초래된다[20]. 이러한 비만을 예방 및 치료를 위해서는 에너지 흡수를 최소화하고 에너지 사용을 증대시키는 것으로, 지방세포 연구는 지방 축적을 감소시키고 지방세포의 수를 줄이는 것이 핵심이다.

지방세포분화(Adipogenesis)는 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 과정을 말하며, 지방세포 분화 초기에 발현되는 전사인자인 CCAAT/enhancer-binding protein (CEBP)과 peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)의 발현 등이 에너지 대사 조절 지표로 fatty acid synthase (FAS), fatty acid binding protein 2(aP2), leptin, adiponectin 등과 같은 지방세포내 특이적 유전자의 발현을 통해 중성지방 구의 수 및 크기를 증가시킨다[17-19].

CEBP-α는 백색지방조직과 갈색지방조직에서 발현되는 지방세포분화 전사인자로써, C/EBPβ와 C/EBPδ는 지방세포 분화과정의 초기단계에 발현이 증가되어 PPARγ 의 발현을 유도하며 PPARγ의 발현증가는 C/EBPα의 지방세포 분화후기의 발현을 유도하며 지방세포 증식과 인슐린 민감도 항진에 관여한다[20-21]. 그리고 PPAR는 peroxisome proliferator를 ligand로 하는 핵 호르몬 수용체(nucler hormone receptor)로 에너지와 지방 대사를 조절하는 주요전사인자이다. PPAR-α는 주로 지방의 이화작용(catabolism)을 촉진하고, PPAR-γ는 지방조직에서 주로 발현되어 지방세포의 분화(adipogenesis)를 촉진하여 크기가 큰 지방세포의 수를 줄이는 역할을 한다. 또한 PPARγ는 지방조직과 근육에서 UCP를 통해 지방산의 산화를 촉진한다. PARγ는 지방세포에서 아디포넥틴의 분비를 증가시켜 AMPK를 활성화시킴으로써 에너지 대사 조절에 관여한다[22-23].

이와 같은 배경으로 본 연구에서는 3T3-L1 지방세포 분화 모델을 이용하여 대시호탕(DSHT)의 adipogenesis 억제효능 기전을 확인하고자 하였다. 실험은 지방세포 분화 억제능 및 지방세포 분화전사인자 CEBP-α와 PPAR-γ의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 유전자 및 단백질 발현량을 확인하였을 뿐만 아니라, 지방세포의 분화시기별로 분화초기, 분화중기, 분화후기로 나누어 대시호탕이 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 그 결과, 대시호탕(DSHT)이 지방세포의 지방축적 및 지방분화를 농도 의존적으로 억제하여 200 ㎍/㎖의 농도에서 가장 유의적으로 억제하는 것을 확인하였고 (Fig 2), 단순한 지방축적 및 분화의 억제뿐 만이 아니라, 분화전사인자인 C/EBP-α, PPAR-γ 또한 대조군인 BTS 200 ㎍/㎖보다 유의적으로 감소하는 것을 나타내었다 (Fig 3). 이와 같은 결과와 더불어 대시호탕(DSHT) 200 ug/mL은 adi-pogenesis의 분화초기와 중기, 후기 과정 중 지방형성 억제(중기분화)와 특히 지방분해(후기분화)에 유의적으로 억제 효능을 나타내었다 (Fig 4,5). 이상의 결과들로, 대시호탕 (DSHT)은 유의적으로 지방형성 및 분해의 항비만 효과를 지닌 소재로서 개발될 수 있는 가능성을 보여주는 결과로 과학적 근거를 제시하고, 대시호탕 혼합단미연조엑스제의 제형으로 개발함으로써 다양하고, 우수한 품질 한약제제 제공에 기여할 것으로 사료되어진다.

Ⅴ. 결 론

본 연구에서는 대시호탕의 anti-adipogenesis효능을 검증하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 또한, 최초로 건강보험용 대시호탕 혼합단미 연조엑스제의 새로운 제형을 개발하였다.

1. DSHT은 3T3-L1 지방전구세포에서 500 ㎍/㎖ 이하의 농도에서는 세포독성이 나타나지 않았다.

2. DSHT은 대조군인 BTS에 비해 지방전구세포 분화가 농도 의존적으로 유의하게 억제됨을 Oil Red O 염색으로 확인하였다.

3. DSHT은 대조군인 BTS에 비해 지방분화전사인자인 CEBP-α 및 PPAR-γ가 농도 의존적으로 유의하게 억제됨을 유전자 및 단백질 발현량으로 확인하였다.

4. DSHT은 대조군인 BTS에 비해 지방 분화 및 지방분화 전사인자인 CEBP-α 및 PPAR-γ가 지방형성 억제(중기분화)와 특히 지방분해(후기분화)에 유의하게 억제됨을 확인하였다.

따라서 대시호탕은 항비만 활성에도 유의한 효능이 있으며, 향후 복용이 편리한 건강보험용 한약제제 제품으로 개발함으로서 우수성 및 품질향상을 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 지정 2017년 한의약산업육성을 위한 기반구축 사업의 '한약제제 현대화 사업(제형개선)'의 재정지원을 받아 수행된 연구입니다.

References

1. Chae IS. Sanghanronyeukjun. Seoul: Gomundang. 2000:86-130.
2. Hur J. Donguibogam. 3rd rev. ed. Seoul: Yeougang. 2005:745-1450.
3. Kim Y, So HS, Kim SJ, Youn MJ, Lee JH, Kim NS, Lee JH, Woo WH, Lee DW, Cho KH, Moon BS, Park R. Antiinflammatory effect of Daesiho, a Korean traditional prescription for cerebral infarct patients.

Phytother Res. 2008;22(6):829-35.
4. Kim CH, Kweon YM, Lee YT, Park SD. The preventive effect of Daeshiho-tang on liver damageinduced by acetaminophen in the rats. Korean J Oriental Med Prescription. 2004; 12(2):139-154.
5. Rha YG, Choi SH, Ahn KS, Moon JJPreventive and Therapeutic Effect of Daeshihotang and Its Components on the Gallstone Formation of Mouse. Korean J Orient Physiol Patho. 1991;6:1-25.
6. Jung H, Kang JC. Effect of Daesihotang-sosonggitang-gagambang on liver injury of rats induced by ccl4 and d-galactosamine. Korean J. Orient. Int Med. 2000;21(2):267-274.
7. Yeo UH, Jo HJ, Kim HH. Effects of DaeSiHo-Tang extract on Hypertension and Arterial Contraction. Korean J Orient Physiol Patho. 2005;19(6):1573-1579.
8. Park CS, Park CK, Han SD, Park SD. A Experimental Study on the Effect of Kami-Daesihotang on Hyper1ipidemia & Hypertension. Korean J. Orient. Int Med. 1998;19(2):159-184.
9. Lee YJ, Ji GU, Eom HS. An Experimental Study on the Effects of Dachaihutang he wulingsan on Hypertension and Hyperlipidemia. Korean J Orient Physiol Patho. 2000;14(2):48-69.
10. Chun JM, Kim DS, Choi G, Sung YY, Park SH, Kim SH, Kim HK. Anti-obesity Effect of Five Formulas Which can be used to Treat Hyper-tension in High Fat Diet Induced Obese Mice. Korean J Orient Physiol Patho. 2013;27(5):637-643.
11. Song HY, Kim EK, Kong JC, Lee JH, Shin BC, Ryu DG, Kwon KB. Inhibitory Effect of Daesiho-tang (Dachaihu-tang) Extracts on High-fat Diet-induced Obesity. J Oriental Rehab Med. 2008;18(3):41-49.
12. Park, SD, Yun BG. ffects of Daesihotang and its component groups on diabetes, free radical and antioxidative defense system in alloxan induced diabetic rats. Korean J Orient Med Prescr. 2001; 9(1):289-317.
13. Han MG, Seo HG, Kim EH. The Effects of Daesihotang on Body weight and Biochemical changes of rats fed high diet. Korean J Chuna manual Med. 2001;2(1):177-186.
14. Korea Centers for Disease Control and Prevention. 2009 Korea national health and nutrition and examination survey. Ministry of Health and Welfare. 2010.
15. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. Nature. 2000;404:635-643.
16. Otto TC, Lane MD. Adipose development : from stem cell to adipocyte. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2005;40:229-242.
17. Lane MD, Tang QQ, Jiang MS. Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999;266:677-683.
18. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. Cell Metab. 2006;4:263-273.
19. Lin FT, Lane MD. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994;91:8757-8761.
20. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Conzales FJ, Spiegelma BM. C/EBPα induces adipogenesis through PPARγ : Aunified pathway. Genes Dev. 2002;16(1):22-26.
21. Camp HS, Ren D, Leff T. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. Trends Mol Med. 2002;8(9):442-447.
22. Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of peroxisome proliferator activated receptor-γ in maintenance of mature 3T3-L1 adipocytes. Diabetes. 2002;51(7):2045-2055.
23. Tanaka T, Itoh H, Doi K, Fukunaga Y, Hosoda K, Shintani M, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Saito T, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nakao K. Down regulation of peroxisome proliferator activated receptor-γ expression by inflamma- tory cytokines and its reversal by thiazolidine- dione. Diabetologia. 1999; 42(6):702-7.