

## 지방간 유도 세포모델에서 황금(黃芩), 목향(木香), 시호(柴胡) 복합 추출물의 이상지질혈증에 대한 효과

도현주<sup>1#</sup>, 김경호<sup>2</sup>, 오태우<sup>2\*</sup>

1 : 대구경북첨단의료산업진흥재단 신약개발지원센터, 2 : 한국한의학연구원 한의기술응용센터

### Anti-hyperlipidemic Effects of Scutellariae Radix, Aucklandiae Radix and Bupleuri Radix (SAB) extract in FL83B cells

Hyun Ju Do<sup>1#</sup>, Kyungho Kim<sup>2</sup>, Tae Woo Oh<sup>2\*</sup>

1 : New Drug Development Center, Daegu-Gyeongbuk Medical Innovation Foundation, Daegu 41061, Republic of Korea.

2 : Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 70 Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu 41062, Republic of Korea.

#### ABSTRACT

**Objectives :** This study was conducted to evaluate the anti-hyperlipidemia effect of Scutellariae Radix, Aucklandiae Radix and Bupleuri Radix(SAB).

**Methods :** FL83B cells were mouse liver hepatocytes, and we used this cell line. FL83B cells were treated with 0.5 mM oleic acid(OA) for 24 h, SAB extract was treated. After OA treatment, intracellular triglyceride (TG) and free fatty acid contents were measured with AdiopoRed™ assay and Free Fatty Acid Quantitation assay kit, respectively. Further, we evaluated several lipogenesis and metabolic markers such as sterol regulatory element-binding transcription factor-1c (SREBP-1c), acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), 3-hydroxy3-methyl-glutaryl CoA reductase (HMGCR), hormone-sensitive lipase (HSL), carnitine palmitoyltransferase (CPT-1), peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ), and cluster of differentiation (CD36) using RT-PCR and Western-blot analysis.

**Results :** OA markedly increased intracellular TG and free fatty acid, which plays a key role in reducing hepatic lipid accumulation, in FL83B cells. These increases were alleviated by SAB extract. The mRNA and protein expression of Fatty acid(FA) oxidation factors (CPT-1, PPAR $\alpha$ ), lipolysis factor(HSL), FA transporter(CD36), cholesterol synthesis factors (HMGCoA) and Lipodeneses (SREBP-1c, FAS, and ACC-1) were significantly increased by treatment of SAB extract in the OA-induced fatty liver cell model.

**Conclusions :** In summary, the treat of SAB extract showed a significant reduction of the influx of fatty acids into hepatocytes, promoted the oxidation of fatty acids, and regulated fat synthesis-related factors, thereby regulating the accumulation of TG and free fatty acids.

**Key words :** Hyperlipidemia, Dyslipidemia, *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Aucklandia lappa* Decne, *Bupleurum falcatum* Linne

\*Corresponding author : Tae Woo Oh, Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), Daegu 41062, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-940-3833 · Fax : +82-53-940-3899 · E-mail : taewoo2080@kiom.re.kr

#First author : Hyun Ju Do, New Drug Development Center, Daegu-Gyeongbuk Medical Innovation Foundation, Daegu 41061, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-790-5245 · Fax : +82-53-790-5219 · E-mail : dododo2@dgmif.re.kr

· Received : 20 August 2020 · Revised : 07 September 2020 · Accepted : 25 September 2020

## I. 서론

현대사회에서 식생활의 변화로 인한 지방 위주의 식생활, 과식, 운동부족, 유전적 요인 등에 의하여 비만, 대사성 질환, 심혈관계 질환의 발생이 높아지고 있다<sup>1-2)</sup>. 이상지질혈증은 그 자체만으로 질환이라고 할 수는 없으나, 가장 큰 문제는 사람이 느끼는 자각증상이 없으며, 방치할 경우 우리 몸에 심각한 해를 끼칠 수 있는 심혈관계 질환, 뇌졸중과 같은 질병을 일으킬 수는 원인이 될 수 있다. 이상지질혈증은 지단백의 대사 이상에 의해 발생하는 질환으로 혈액 중에 지질 또는 지방성분이 과다하게 많이 함유되어 있는 상태를 말하며 이 중 콜레스테롤이 혈액 내에 과다하면 동맥 벽에 침착되어 혈관 내경이 좁아져 혈액이 원활하게 흐르지 못하는 상태인 동맥 경화를 일으킬 수 있다. 이러한 고지혈증을 치료하기 위하여 흔히 처방되고 있는 약물은 HMGCoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) 환원제 억제제인 스타틴(statin) 계열의 약물로서<sup>3)</sup>, 고콜레스테롤혈증이 있는 사람에게 1차 약물로 널리 선택되어 사용되고 있으며, 제제에 따라 고지혈증 치료의 일차 목표인 저밀도 지단백의 혈중 농도를 18~55%까지 낮추는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 하지만 스타틴 제제의 부작용으로 위장관계 증상과 근육통 및 간 독성이 나타나면서<sup>5)</sup> 최근에는 천연물로부터 고지혈증을 포함한 대사성질환을 치료하는 부작용이 없는 약물 개발이 활발하게 연구되고 있다<sup>6)</sup>.

한의학에서는 이상지질혈증이라는 똑같은 병명을 한의학문헌에서 찾을 수는 없지만 人有脂·有膏·有肉 이라는 표현으로 《靈樞·衛氣失常論》<sup>7-8)</sup>에 기술되어 영양과다로 인한 비만에 대하여 인식이 있었음을 알 수 있다. 즉 한의학에서는 이상지질혈증의 개념을 비(脾)의 운화실조(運化失調)와 간(肝)의 소설기능장애(疏泄機能障礙)로 나타나는 것으로 보고 어혈(瘀血), 습탁(濕濁)이 혈맥(血脈)에 발생하는 것과 유사하다고 보았다<sup>9)</sup>. 또한 한의학에서 사용되는 처방은 이미 수백년 이상 임상을 통하여 안전성이 증명된 것이기 때문에, 한방처방에 사용되는 한약재로 치료제를 개발할 경우 효능 뿐만 아니라 부작용에 대하여 장점이 될 수 있다. 최근에는 다양한 한약 추출물의 이상지질혈증 개선 효과를 전통 한의학 및 현대 약리학적인 관점에서 분석한 연구가 진행 중이다<sup>10-12)</sup>.

본 연구에서는 전통적으로 사용되는 한약재의 혼합추출물로 황금 (*Scutellaria baicalensis* Georgi), 목향 (*Aucklandia lappa* Decne), 시호 (*Bupleurum falcatum* Linne)로 구성되어 사용하였다. 황금(黃芩, *Scutellariae Radix*)은 대한약전에 속썩은풀(꽃풀과 Labiatae)의 뿌리로서 그대로 또는 주피를 제거한 것으로 수제되어있으며<sup>13)</sup>, 향균효과<sup>14)</sup>, 염증성 장질환에서의 효능<sup>15)</sup>, 항암효과<sup>16)</sup> 및 항산화효과<sup>17)</sup>, 혈중 지질강화작용<sup>18)</sup>을 보고하였으며, 목향(木香, *Aucklandiae Radix*)은 국화과에 속한 다년생 초본인 운목향의 뿌리이며 성(性)은 온(溫)하고 미(味)는 신(辛)하고 쓴(苦)하다. 현대의 연구에서는 목향(木香)에서 추출된 물질이 혈관을 확장시키고 염증을 억제하며 고지방식이 마우스에서 인슐린 및 염증에 효능이 있다고 알려져 있다<sup>19-20)</sup>. 또한 시호(柴胡, *Bupleuri Radix*)는 산형과(繖形科: Umbelliferae)에 속하며 뿌리를 건조한 것으로, 화해퇴열(和解退熱), 소간해울(疏肝解鬱), 승거양기(升舉陽氣) 등의 효능을 가지고 있어 기울(氣鬱) 등의 증상에 사용한다<sup>21)</sup>.

최근에는 항산화 및 이상지질혈증의 개선에 한의학적 처방을 바탕으로 복합물이 갖는 효능에 대한 연구가 활발하게 이뤄지고 있으며, 본 연구에서는 이상지질혈증에 대하여 한의학적 처방의 다양한 구성약물의 예비실험을 통하여 도출된 후보약물 중 황금, 목향, 시호 세 가지 약재를 배합한 추출물(SAB)이 이상지질혈증에 미치는 영향을 살펴보고자 간세포주에 Oleic acid로 유도하여 이상지질혈증 세포모델을 제작하였으며, 지질대사 개선 효과를 연구하였고, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) SAB 추출물 제조

약재의 구성은 Table 1과 같으며, 3종의 약재는 옴니허브(대구, 한국)를 통하여 구입하였으며, 각각의 약재에 대하여 30 g에 정제수 1.8L를 가하여 열탕추출기에서 3시간 씩 2회 가열하여 얻은 추출물을 여과지(Whatman NO. 1)로 여과한 후 회전식 감압농축기로 감압 농축하여 동결 건조함으로써 SAB 추출물을 제조하였으며 수득율은 50.6%였으며, 건조분말 상태로 냉장보관하면서 실험 직전 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

Table 1. The compositions of SAB

Herbal name	Scientific name	Origin	Dose (g)
황금(黃芩)	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Korea	30
목향(木香)	<i>Aucklandia lappa</i> Decne	Korea	30
시호(柴胡)	<i>Bupleurum falcatum</i> Linne	China	30
Total amount			90

#### 2) 세포배양 및 지방 축적 유도

FL83B cells은 mouse liver hepatocyte으로, ATCC<sup>®</sup>를 통하여 구입하였으며, 세포배양은 이미 보고된 선행연구의 방법에 따라 다음과 같이 시행되었다. FL83B cell은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 Ham's F-12K(Kaighn's) 배지로 배양되었다. Cells은 75 cm<sup>2</sup> flask(Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3 일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻어준 후 flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 37°C에서 5 분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 F-12K 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 culture flask에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 세포에 지방간을 유도하기 위하여 0.5 mM oleic acid(OA)를 24시간동안 처리하여 지질축적을 유도한 다음, SAB 약물을 모든 실험분석을 위해 24시간 동안 처리하였다.

## 2. 방법

### 1) 세포독성평가 (cell cytotoxicity assay)

약물에 의한 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay 방법을 이용하였다<sup>10)</sup>. 배양한 FL83B cell를 96well plate에  $1 \times 10^5$  cell/ml 농도로 200  $\mu$ l씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. FL83B cell에 각각 25, 50, 100  $\mu$ g/ml 농도의 SAB 추출물을 처리한 후 12시간 반응시켰다. 5 mg/ml (DPBS)의 MTT 시약을 media에 5배 희석한 용액 100  $\mu$ l씩 분주 한 후 1시간 incubator에서 반응시켰다. 상층액을 제거 후 살아있는 세포의 양과 비례한 formazon을 DMSO 100  $\mu$ l씩 처리해 용해시켰다. 마이크로 판독기(SpectraMax i3, Molecular devices, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2) 중성지방 Triglyceride (TG) 함량 측정

FL83B cell을 96well plate에  $1 \times 10^5$  cell/ml 농도로 배양한 후 OA 0.5 mM을 처리하여 24시간 배양하여 지방증 (steatosis)을 유도하였다. 유도 후 SAB 추출물을 농도별로 처리하여 AdipoRed™ assay reagent (Lonza, MD, USA)를 이용하여 TG생성량을 측정하였다. 즉, SAB 추출물을 24시간 처리한 뒤, DPBS를 이용하여 washing하였으며, Adipo red reagent를 40배 희석한 후(DPBS) 각 well 당 200  $\mu$ l씩 처리한 후 암실 조건에서 10분간 배양하였다. spectrophotometer (SpectraMax i3, Molecular devices, CA, USA)로 excitation 485nm, emission 572nm에서 측정하였다.

### 3) 세포 내 free fatty acid 함량 측정

Free Fatty Acid Quantitation Kit(Sigma, USA)를 이용하여 측정했다. FL83B cell을 6 well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 normal을 제외한 모든 well에 0.5 mM OA가 포함된 새로운 배양액으로 교체하여 24시간 동안 지방증을 유도하였고, SAB 추출물을 각각

25, 50, 100 ( $\mu$ g/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료가 처리된 FL83B cell은 1% TritonX-100이 포함된 chloroform 200  $\mu$ l를 넣어 균질화 시킨 후 13,000 g에서 10분 동안 원심분리 한 뒤 상등액을 사용하였다. 상등액을 50℃에서 건조하여 chloroform을 완전히 제거한 후 fatty acid assay buffer 200  $\mu$ l를 넣어 남아 있는 건조된 지방을 완전히 녹여 시료로 실험에 사용하였다. 시료 50  $\mu$ l에 ACS reagent 2  $\mu$ l를 넣은 후 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 반응액에 Master Reaction Mix (Fatty Acid Assay Buffer 44  $\mu$ l, Fatty Acid Probe 2  $\mu$ l, Enzyme Mix 2  $\mu$ l, Enhancer 2  $\mu$ l/well) 50  $\mu$ l를 넣어준 후 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 반응액의 흡광도를 570 nm 파장에서 측정하였다. Free fatty acid 함량은 kit에 포함된 palmitic acid 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

### 4) Quantitative RT-PCR

FL83B cell를  $3 \times 10^5$  cells/well로 6-well culture dish에 분주해 24 시간 동안 배양하였다. 이후 각 well에 지방간을 유도하기 위하여 0.5mM OA를 24시간 처리한 후 SAB를 25, 50, 100  $\mu$ g/ml 농도까지 농도별로 처리하였다. SAB가 처리된 media를 제거한 뒤 PBS를 이용하여 세척하고 RNeasy® mini kit(Aiagen, Hilden, Gerbany)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 Spectrophotometer(Nanodrop)을 통하여 정량해, 1  $\mu$ g RNA를 Maxima frist strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR(Thermo scientific, Waltham, USA)를 이용하여 complementary DNA(cDNA)를 합성하였다. PCR bio syGreen blue Mix(PCR Biosystems, Pennsylvania, USA) 10  $\mu$ l와 primer 2  $\mu$ l가 포함된 혼합물 19  $\mu$ l와 cDNA 1  $\mu$ l를 polymerase chain reaction (PCR) 사이클을 40회 수행하였다. 중합 효소 반응에 쓰인 primer의 정보는 Table 2에서 나타내었다.

Table 2. Specific primer sequences for PCR

Target	Primer Sequences	
CD36	Forward	5'-TGAGCCTTCACTGTCTGTTGGA-3'
	Reverse	5'-CTGCTACAGCCAGATTCAGAACTG-3'
HMGco-A	Forward	5'-GAATGCCTTGTTCATTGGAGTTG-3'
	Reverse	5'-AGCCGAAGCAGCACATGATC-3'
CPT-1	Forward	5'-CGATCATCATGACTATGCTGCGCTACT-3'
	Reverse	5'-GCCGTGCTCTGCAAACATC-3'
PPAR $\alpha$	Forward	5'-CCGAATAGTTCGCCGAAAGAA -3'
	Reverse	5'-AACATCGAGTGTGCAATATGTGG-3'
HSL	Forward	5'-CCGAGATGTCACAGTCAATCT-3'
	Reverse	5'-CCAGCCGCAGAAAAAG-3'
SREBP-1c	Forward	5'-GCAGATTATTTCAGCTTTGC-3'
	Reverse	5'-CCCTACCGGTCTTCTATCAA-3'

Target	Primer Sequences	
FAS	Forward	5'-ACCTGGTAGACCACTGCATTGAC-3'
	Reverse	5'-CCTGATGAAACGACACATCTCTCA-3'
ACC-1	Forward	5'-CGCTCAGGTCACCAAAAAGAAT-3'
	Reverse	5'-GGGTCCCGGCCACATAA-3'
GAPDH	Forward	5'-GCTGACAATCTTGAGTGAG-3'
	Reverse	5'-GAAGGGTGGAGCCAAAAG-3'

### 5) Western blot

FL83B cell로부터 지방 생성 관련 단백질의 발현을 Western blot으로 측정하였다. 먼저, FL83B cell에 독성이 없는 농도 범위에서 0.5mM OA를 24시간 처리한 후 SAB를 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도까지 농도별로 처리하였다. 각 세포를  $1 \times \text{PBS}$ 로 3회 세척 후 lysis buffer(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin) 0.1 mL로 lysis시켰다. 이를 12,000 rpm에서 20 분 원심분리함으로써 단백질을 분리하였다. 분리된 각 단백질을 protein assay solution으로 정량한 다음, 30  $\mu\text{g}$  단백질을 5 $\times$  sample buffer와 섞어 8-15% SDS-PAGE를 통해 분리하였다. 분리된 gel상의 단백질을 NC membrane으로 transfer시키고 각 membrane은 5% BSA로 실온에서 1시간 blocking하였다. Membrane에 지방 생성 관련 일차항체를 넣어 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 반응시킨 후 0.05% Tween이 들어간 TBS로 3회 세척하였다. Membrane에 다시 anti-IgG conjugated HRP 항체를 넣은 후 1시간 동안 실온에서 반응시키고 0.05% Tween이 포함된 TBS ( $1 \times \text{TTBS}$ )로 3회 세척하여 ECL용액을 이용하여 ChemiDoc<sup>TM</sup> touch imaging system (BioRad, California, USA)를 이용하여 분석하였다.

### 6) 통계처리

모든 실험 결과는 GraphPadprism 5.0 통계 프로그램 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean  $\pm$  SD)로 계산하였으며 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA로 분석하였으며, 사후검정은 LSD를 통해 검증하였으며,  $p < 0.05$  수준에서 각 실험군 간의 유의성을 평가하였다.

## III. 결 과

### 1. 세포 독성 평가

SAB 추출물에 대한 세포 독성을 알아보기 위하여 FL83B cell에 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리한 후 24시간 배양하여 MTT assay 방법으로 세포독성을 측정된 결과, 각각  $100.38 \pm 6.4\%$ ,  $106.24 \pm 4.1\%$ ,  $108.13 \pm 3.9\%$ ,  $106.95 \pm 3.2$ 으로 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도까지 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1A). 또한 FL83B cell에 지방산을 유도하기 위하여 0.5mM oleic acid(OA)를 24시간동안 처리하여 지질축적을 유도한 다음,

위의 SAB 추출물을 처리하여 세포생존도를 측정한 결과, SAB 추출물을 처리한 세포에서 독성이 없는 것을 확인하였다(Fig. 1B).

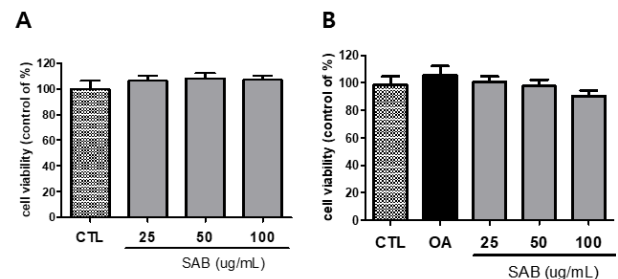


Fig. 1. Cell viability of FL83B cells treated SAB extract, (A) Cytotoxic effects of SAB in FL83B cell. (B) FL83B cells were induced with OA (0.5 mM) effects of SAB.

### 2. 중성지방 생성에 대한 효과

FL83 cell에 0.5mM OA를 처리하여 세포 내 지질 축적을 유도하였으며, SAB 추출물이 세포 내 지질 축적에 감소하였는지 살펴보기 위하여 중성지방 생성량을 확인해 보았다. 그 결과, OA로 유도된 세포에서 TG의 생성이 정상세포에 비해 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, SAB를 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 TG의 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하였을 때 대조군인 Atrovastatin 10  $\mu\text{M}$ 보다 뛰어난 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다(Fig 2).

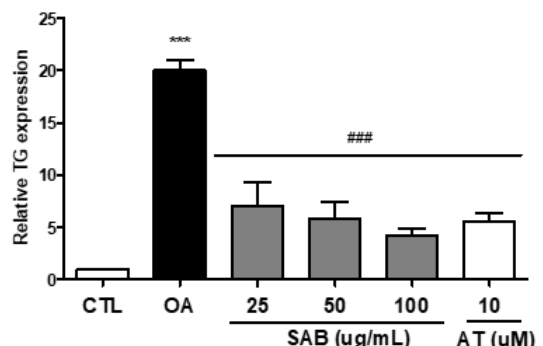


Fig. 2. The Effect of SAB on TG accumulation in FL83B Cells. FL83 cells were treated with OA (0.5 mM) with various concentration of SAB (0,25, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24h. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. \*\*\* $p < 0.001$  vs. CTL ; ### $p < 0.001$  vs. OA group.

### 3. 세포 내 free fatty acid 변화에 대한 효과

FL83 cell에 0.5mM OA를 처리하여 세포 내 지질 축적을 유도하였으며, SAB 추출물이 세포 내 free fatty acid에 영향을 미쳤는지 확인해 보았다. 그 결과, OA로 유도된 세포에서 free fatty acid의 생성이 정상세포에 비해 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, SAB 추출물 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 정상군 대비 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 3).

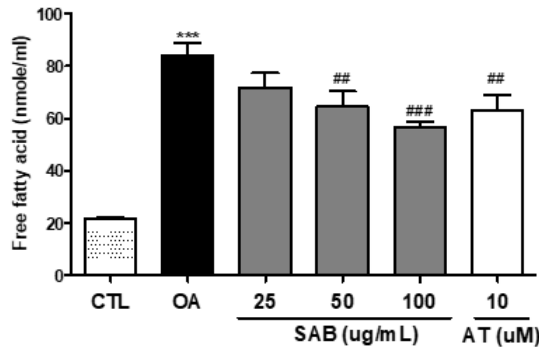


Fig. 3. The Effect of SAB on free fatty acid contents in FL83B Cells. FL83 cells were treated with OA (0.5 mM) with various concentration of SAB (0, 25, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24h. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. \*\*\* $p < 0.001$  vs. CTL ; # $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  vs. OA group.

### 4. 지방 생성 및 대사에 관련된 mRNA 발현 변화에 대한 효과

FL83 cell에 0.5mM OA를 처리하여 세포 내 지질 축적을 유도하였으며, SAB 추출물이 세포 내 지방 생성 및 지질 대사에 영향을 미쳤는지 확인해 보고자 mRNA를 살펴보았다. Fig. 4는 FA oxidation에 관여하는 인자인 CPT-1, PPAR $\alpha$  및 Lipolysis에 관여하는 HSL의 mRNA 발현량 변화를 검토한 결과로, SAB 추출물을 처리시, 대조군 대비 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었으며, FA trans porter인 CD36 및 콜레스테롤 합성에 관여하는 HMGCoA, 간 내 지방 축적요인 중 지방 합성 (lipogenesis)에 관여하는 ACC-1, FAS, SREBP1c의 mRNA 발현량 변화를 검토한 결과, SREBP1c의 경우 oleic acid 처리시 대조군 대비 약 200%로 크게 증가하였고, SAB 추출물 처리시 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 mRNA 발현량이 유의적으로 감소됨을 확인 하였다. 또한 SAB 추출물과 FAS 및 ACC-1의 mRNA 발현 간의 연관성을 검토한 결과, Fig. 4와 같이 oleic acid 처리에 의해 대조군 대비 약 200% 발현되었고, SAB 추출물에서 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 mRNA 발현량이 농도 의존적으로 대폭 감소하였으며, CD36 및 HMGCoA의 mRNA 역시 SAB 추출물에서 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다.

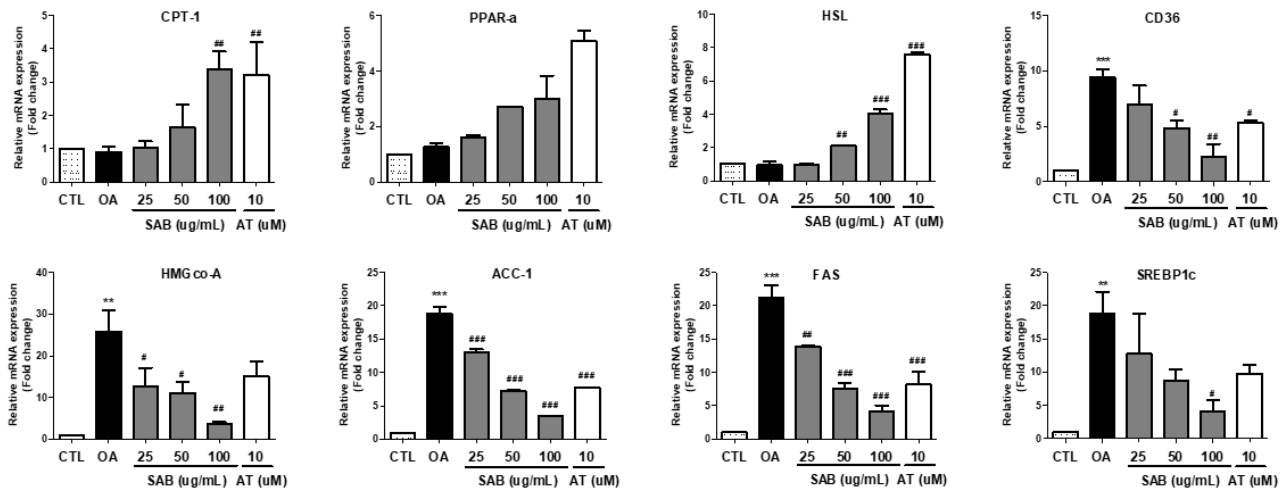


Fig. 4. OA regulates the expression of lipid metabolism-related genes in FL83B hepatocytes. Total RNAs were extracted using Trizol reagent and mRNA was measured using qRT-PCR. The fold changes relative to the control were calculated using the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method for mRNA expression levels of fatty acid oxidation genes: CPT-1 and PPAR $\alpha$ ; Lipolysis genes: HSL; fatty acid transporter genes: CD36; cholesterol synthesis genes: HMGCoA; lipogenic genes: ACC1, FAS and SREBP-1c. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. CTL ; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  vs. OA group.

### 5. 지방 생성 및 대사에 관련된 단백질 발현 변화에 대한 효과

SAB 추출물의 지질 대사 및 지질합성 조절 기전을 확인하기 위하여 FL83 cell에 0.5mM OA를 처리한 지방간 세포모델에서 protein의 발현량을 확인 하였다(Fig. 5). 그 결과, 지방 합성 관련 인자인 ACC-1 및 FAS의 발현의 경우 지방간을 유도 하기 위한 OA 처리군에서는 현저히 증가되었지만, SAB 추출 물을 처리한 군에서는 유의적으로 감소 됨을 확 인 할 수 있었다. 또한 세포내 지방산 유입에 관여하는 CD36의 단백질 발현양

역시 OA에 의해 증가되었으며, SAB 추출물에 의하여 유의적으로 감소함을 알 수 있었다. 한편, FA oxidation에 관여하는 인자인 PPAR $\alpha$  및 PPAR $\alpha$ 의 downstream effector인 CPT-1 경우 SAB 추출물에서 유의적으로 단백질의 발현 양을 증가 함으로써 지방산의 베타 산화를 촉진함으로써 지방간을 억제 함을 확인할 수 있었다.

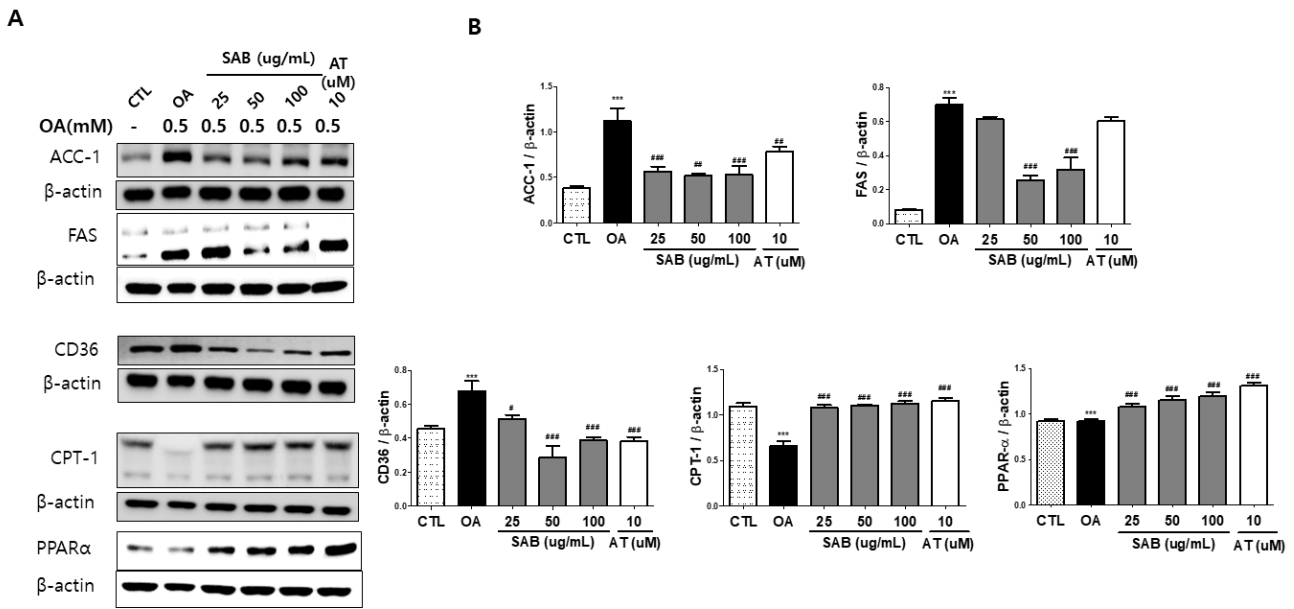


Fig. 5. OA regulates the expression of lipid metabolism-related proteins in FL83B hepatocytes. FL83 cells were treated with OA (0.5 mM) with various concentration of SAB (0, 25, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24h. The intensity of the protein band was normalized against the internal control  $\beta$ -actin. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. \*\*\* $p < 0.001$  vs. CTL ; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  vs. OA group.

### IV. 고찰

콜레스테롤은 생명 유지에 일정량 필요한 중요한 물질로서, 우리 몸의 기본단위인 세포막을 형성하고 호르몬, 비타민 D, 담즙 등을 생성한다. 하지만 최근 생활의 변화로 인하여 혈중 콜레스테롤이 너무 많아지고 있는 실정이며, 30세 이상 성인의 절반인(47.8%) 약 1600만명이 이상지질혈증을 가지고 있으며 남자는 10명중 6명, 여자는 10명중 4명에 해당되며, 특히 여성의 경우 50대 이후 급증하는 추세이다<sup>22)</sup>. 이상지질혈증의 치료목적은 동맥경화증을 막고 최종적으로는 심혈관계 질환인 심근경색증이나 뇌졸중과 같은 질환을 예방하는데 있으며, 치료요법으로는 운동, 식사조절, 체중조절을 들 수가 있다. 이러한 생활습관 개선을 통하여 LDL-콜레스테롤 및 중성지방(TG)을 낮추고 HDL-콜레스테롤을 올리는 것을 목적으로 하지만, 이를 통해서도 콜레스테롤의 수치가 정상화 되지 않는다면 약물치료가 필요하다<sup>23)</sup>. 약물치료에서 가장 중요한 치료 인자는 LDL-콜레스테롤로서 심혈관질환 발생 위험도에 따라 치료 목표치는 다르다. 이상지질혈증에서 가장 흔히 사용되는 치료제는 우리 몸속에서 콜레스테롤을 합성하는 효소에 작용하여 콜레스테롤 합성을 저해하는 HMGCoA 환원효소 억제제인 스타틴 계열의 약제로서 LDL-콜레스테롤을 낮추는 효과와 더불어 중성지방(TG)을 낮추는 효과도 가지고 있다. 하지만 이러한 스타틴 계열의 약제를 사용함에도 불구하고 치료 목표치에 도달하지 못하면 추가적인 조절을 위하여 소장에서 콜레스테롤의 재흡수를 억제하는 에제티미를 비롯하여 파이브레이트, 니코틴산, 오메가3 지방산을 사용하기도 한다. 이처럼 이상지질혈증에 대한 치료는 평생 지속해야함으로 스타틴에 대한 부작용이 우려되고 있는데, 가장 흔한 부작용은 간 수치 상승과 근육병증, 무력감을 들 수가 있다<sup>24)</sup>. 최근, 이상

지질혈증의 치료제에 대하여 관심이 증가하면서 부작용이 적은 다양한 천연물로부터 그 생리 효능에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 한약재를 비롯한 차, 채소류 등 식물소재 천연물에서 비만 및 고지혈증에 대한 치료효능 및 적은 부작용이 보고되어지고 있다<sup>25-26)</sup>.

한의학에서 이상지질혈증은 그와 똑같은 병명은 없으나, 기(氣), 血(血)이 잘 흐르지 못하여 혈관내에 병리적 산물이 담탁(痰濁)하게 된 것으로 보고있으며, 서구화된 식단의 변화로 열량이 높고 자극적인 육류 위주의 식사로 인해 고량후미(膏粱厚味)의 과잉섭취로 간비신(肝脾腎)의 기능실조로 인해 인체 내 습(濕)과 열(熱)이 결합된 병사(病邪) 및 소설(疏泄) 조달(條達) 기능의 부족으로 습담(濕痰)의 중탁(重濁)한 예탁기(穢濁之氣)가 정류(停留)되어 발생하는 것으로 생각한다. 이에 따라 최근 복합처방 및 단방으로 이상지질혈증을 개선하는 연구가 다양하게 이루어지고 있으며 인진위령탕<sup>27)</sup>, 삼황사삼탕<sup>28)</sup>, 방풍통성산<sup>29)</sup>, 황련해독탕<sup>30)</sup> 등 한약으로 이상지질혈증의 개선에 유의한 효과를 확인할 수 있음을 밝혔다. 본 연구에서는 이러한 한의학적 처방을 바탕으로 단미재를 스크리닝하여 그 중 효능이 있는 황금(黃芩), 목향(木香), 시호(柴胡) 3가지 약재를 배합하여 SAB라 칭하였고, 이 추출물에 대해 현대 과학적으로 증명해 보고자 하였다.

본 연구에서는 SAB 추출물에 대하여 이상지질혈증에 대한 치료효능을 확인해보고자, FL83B cell에 Oleic acid(OA)를 처리하여 유도한 지방간 세포 모델에서, SAB 추출물이 세포 내 중성지방(TG) 함량에 미치는 변화 및 지질 합성 관련 조절 인자들에 대하여 관찰하였다. SAB 추출물에 대한 세포 독성을 25, 50 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 살펴본 바, 각각  $106.24 \pm 4.1\%$ ,  $108.13 \pm 3.9\%$ ,  $106.95 \pm 3.2\%$ 으로 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도까지 독성이 나타나지 않았으며(Fig. 1A), 독성이 없는 범위 내에서 실험을 진행하였다.

간 세포에 저장된 중성 지방(TG)의 대부분은 간에서 다른 조직으로 보내기 위하여 생성되는데, 이 과정들에 문제가 생겨 간에 과잉의 중성지방이 축적되면 지방증을 유발하고 간의 대사 기능을 방해 할수 있다<sup>31)</sup>. 또한 Triglyceride의 분해 형태인 free fatty acid는 혈중 농도가 높아질 경우 고지혈증을 유발하고, 혈관 내 지질의 산화량이 늘어나면 죽상동맥경화증으로 진행될 가능성이 증가된다<sup>32)</sup>. 본 연구에서는 0.5 mM OA를 24시간 처리한 후 유도된 지방간 세포 모델에서 SAB가 TG 및 free fatty acid의 생성량을 농도의존적으로 감소시키는 것을 확인함으로써 (Fig. 2, Fig. 3) 이상지질혈증에 대한 효능을 갖는 것으로 사료된다.

한편, Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c)는 지질 합성 조절 및 세포 항상성 유지에 필수적인 전사인자이며, 간세포 내에서 지질 합성에 관여하는 효소인 acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS) 및 콜레스테롤 합성에 관여하는 3-hydroxy3-methylglutaryl CoA reductase (HMGCR)를 조절한다<sup>33)</sup>. 즉, 간세포 lipogenesis의 핵심적 조절인자인 SREBP-1c 및 타겟 효소인 ACC, FAS 및 HMGCoA를 본 실험에서 확인해 본 결과 SAB 추출물이 OA로 유도된 지방간 세포에서 FAS 및 ACC-1의 mRNA 및 protein 발현을 감소시켰으며, 콜레스테롤 합성에 관여하는 HMGCoA의 mRNA 발현도 감소시켰다. 이러한 결과는 간세포에서 지질 축적을 감소시키기 위한 것으로 그 상위 단계인 SREBP-1c의 mRNA의 발현 역시 억제시키는 것을 확인하였다.

우리는 앞서 결과에서 SAB 추출물이 중성지방(TG)를 감소시키는 것을 확인하였으며 (Fig. 2), 이러한 간세포의 지질 축적 감소에 대한 결과는 지방 분해에 의한 지질대사를 향상 시킬 것이라고 생각되었다. 중성지방(TG)는 adipose triglyceride lipase (ATGL)에 의해 분해되어 diacylglycerol과 지방산 분자를 생성 할 수 있으며, diacylglycerol은 hormone-sensitive lipase (HSL) 인산화에 의해 분해되어 monoacylglycerol과 유리지방산 분자를 생성한다<sup>34)</sup>. 따라서 SAB 추출물이 HSL의 mRNA 발현을 증가시킴으로써 지방 분해를 증가시켜 지방간 세포의 지질 축적을 줄일 수 있는 것을 확인하였다(Fig. 4). 하지만, 유리지방산은 간세포 및 대식세포, 혈관 내피세포의 염증반응을 유도할 수 있는데 많은 연구에서 간의 대식세포가 유리지방산에 의해 활성화되어 더 심한 염증을 일으키게 되고, 간 세포에서는 지질 및 탄수화물 대사 이상을 유발하여 더 많은 염증성 사이토카인을 생성한다는 보고가 있다<sup>35)</sup>. 이러한 유리지방산이  $\beta$ -oxidation에 의해 분해될 수 있다는 보고가 있으며 Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha (PPAR $\alpha$ ) 및 carnitine palmitoyltransferase (CPT)-1이 지방산 분해를 가속화하기 위해 지방산  $\beta$ -oxidation을 향상시킨다<sup>32)</sup>. 본 연구에서도 SAB 추출물은 간세포에서 PPAR $\alpha$ 의 mRNA 및 protein 발현을 상당히 촉진 하였다. 따라서 SAB 추출물이 지방산의 분해를 증가시키는 것을 알 수 있었다. 한편, Fatty acid translocase(FAT/CD36)은 간 세포에서 지방산의 원형질 내 유입을 담당하며, 지방분해로부터의 지방산 흡수는 주로 세포막에서 CD36을 통하여 발생한다<sup>36)</sup>. 지방산의 세포 내 과다 유입은 간 세포내 지방축적의 주요한 요인 중 하나로서, SAB 추출물이 CD36의 mRNA 발현을 억제하여 유리지방산의

세포 내 유입을 감소시킴으로써 지방 축적 개선 효과를 나타낼 수 있었다. 이러한 결과는 SAB 추출물이 향후 동물 모델에서의 효능 평가 및 추가적인 연구를 통해 이상지질혈증의 예방 또는 개선을 위한 치료제 및 건강기능식품용 식품 신소재로 개발될 수 있는 가능성을 시사하였다.

## V. 결 론

본 연구는 Oleic acid(OA)로 유도된 지방간 FL83B hepatocyte cell 모델에서 황금, 목향, 시호 3가지 배합 추출물(SAB)의 간 세포 내 지방대사에 미치는 영향을 일부 규명하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SAB 추출물은 OA로 유도된 지방간 세포모델에서 중성 지방(TG) 및 free fatty acid의 생성량을 유의적으로 감소시켰다.
2. SAB 추출물은 OA로 유도된 지방간 세포모델에서 FA oxidation 인자인 CPT-1, PPAR $\alpha$ , Lipolysis 인자인 HSL의 mRNA 및 protein 발현을 유의적으로 증가시켰다.
3. SAB 추출물은 OA로 유도된 지방간 세포모델에서 지질 합성 및 콜레스테롤 합성에 관여하는 CD36, HMGCoA, SREBP-1c, FAS, ACC-1의 mRNA 및 protein 발현을 유의적으로 감소시켰다.

결론적으로 이상의 본 연구의 결과를 종합해 봤을 때, SAB 추출물은 CD36 mRNA 발현량을 감소시켜 지방산의 간 세포 내 유입을 감소시키고, PPAR $\alpha$  와 CPT-1의 mRNA 발현 및 protein 발현을 증가시켜 지방산의 산화를 촉진하는 동시에 HMGCoA, SREBP-1c, FAS, ACC-1 등의 지방 합성 관련 인자의 mRNA 또는 단백질의 발현 감소 및 HSL의 mRNA 발현을 증가시킴으로써 지방 분해를 증가시켜 간 세포 내 중성지방(TG) 및 free fatty acid의 축적되는 것을 예방 또는 개선 하는 효과가 있다고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 주요사업 임상수요기반치료기술개발사업 (과제고유번호 KSN2013230)의 지원 의해 한국한의학연구원에서 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## References

1. M Benedict, X Zhang. : Non-alcoholic fatty liver disease: an expanded review. World Journal of Hepatology, 2017 ; 9(16) : 715-32.

2. Reccia I, Kumar J, Akladios C, Virdis F, Pai M, Habib N, Spalding D. Nonalcoholic fatty liver disease: a sign of systemic disease. *Metabolism*. 2017 ; 72 : 94–108.
3. Dongguk University Industry–Academia Collaboration Foundation. “Obesity Management Committee” Research Report. Development of comprehensive strategy for obesity management. 2015 : 10–12.
4. Jo JJ, Lee SH. A Comparison of Lovastatin and Simvastatin in Treatment of Hyperlipidemia. *Korean Journal of Clinical Pharmacy*. 2002 ; 12 : 39–50.
5. Kim YK, Jo MJ, Moon YH. Review of Clinical Research about Herbal Medicine Treatment Containing Diuretic Herbs on Non–Alcoholic Fatty Liver Disease – Research on China Academic Journal. *J Int Korean Med*. 2019 ; 40(1) : 38–57.
6. Kim JS, Park MJ, Kim SJ, Shin MR, Lee AR, Park HJ, Roh SS, Seo YB. Studies on Antioxidant and Anti–hyperlipidemic Effects in Induced Hypercholesterolemic Rats of Steamed *Achyranthis Bidentatae Radix*. *Kor J Herbol*. 2018 ; 33(6) : 43–60.
7. Habukuihakwon. *youngchu–kyungkyosuk*. Beijing: Inminwisheng publisher; 1982:161.
8. Bang HJ, Tak US, Hong Y, Kang YH. Korean medicine approach to hyperlipidemia. *Dongseomedicine*. 1995 ; 20(1) : 25–36.
9. Cha JY, Yoo HR, Kim YS, Seol IC, Jo HK. Inhibition of gene associated with Dyslipidemia and Antioxidative Effect of *Artemisia iwayomogi*, *Curcumae Radix* and *Raphani Semen*(ACR) on HepG2 cell model. *J Korean Med*. 2017 ; 38(3) : 43–58.
10. Jeong MJ, Kim SY, Do EJ, Yun JG, Kim DI, Han KS, Kim MR. The effect of herbal mixture on alcohol metabolism in Sprague Dawley rats. *Kor J Herbol*. 2019 ; 34(1) : 67–74.
11. Lee JM, Seo BI, Park JH, Roh SS. Effects of water extracts from *Phyllostachys Folium* on hyperlipidemia and liver damage induced by alcohol. *Kor J Herbology*. 2011 ; 26(3) : 31–36.
12. Yeh YT, Cho YY, Hsieh SC, Chiang AN. Chinese olive extract ameliorates hepatic lipid accumulation in vitro and in vivo by regulating lipid metabolism. *Scientific Report*. 2018 ; 8 : 1057.
13. Korean Food and Drug Administration Notification 2007–89. *The Korean Pharmacopoeia*. 2007 : 993–4.
14. Kim EN, Paek JY, Kim YH, Han MD. Antibacterial Activities of a Aqueous Extract form *Scutellaria baicalensis* against Pathogenic Bacteria. *Journal of Natural Sciences of Soonchunhyang University*. 2008 ; 14(1) : 11–8.
15. Lee SH, Lim BO, Choue RW. Immunoregulatory Effects of Water Extracts of *Scutellariae Radix* in DSS–Induced Inflammatory Bowel Disease Animal Model. *The Korean Journal of Nutrition*. 2004 ; 37(6) : 431–9.
16. Lee YY, You KH, Kim SY, Ahn BZ. Augmentation of the Cytotoxic Effects of Anticancer Drugs by (±)–ar–Turmerone and Extracts of the *Lithosperma* and *Scutellaria* Roots against Human Leukemia Cell Lines. *Yakhak Hoeji*. 1991 ; 35(3) : 203–15.
17. Cho SU, Oh WW. Anti–Oxidative Effects of *Scutellariae Radix*. *Kor J Herbology*. 2005 ; 20(3) : 67–74.
18. Kim KS, Cha MH, Lee SW, Yoon YS. A Study on the Inhibitory Effects of *Scutellariae Radix* on Fat Accumulation. *Korean Journal Of Oriental Medicine*. 2003 ; 9(2) : 45–54.
19. The Textbook Compilation Committee of Herbology of Oriental Medical Schools in Nation. *Herbology*. Seoul, Younglim Publisher. 2011 ; 395–6.
20. Oh JS, MA YH, Choi SB, Kim JH, Kim KK, Jeon SY. Effects of *Inula helenium* on Inflammation and Insulin Resistance in Obesity–induced Insulin Resistance Mouse by High Fat Diet. *J Int Korean Med*. 2014 ; 35(4) : 428–38.
21. Textbook Compilation Committee of college of Korean Medicine. *Herbology*. Seoul : Younglim. 2007 : 186–8.
22. Korea national health and nutrition examination survey. 2014 National health statistics. Seajong : Ministry of Health and Welfare. 2015 : 36–57.
23. Kim SH. Drug treatment of dyslipidemia. *J of the Korean Medical Association*. 2016 ; 59(5) : 366–73.
24. Chang R, Chou MC, Hung LY, Wang ME, Hsu MC, Chiu CH. Study of Valproic Acid–Enhanced Hepatocyte Steatosis. *Biomed Res Int*. 2016 : 9576503.
25. Kim HY, Lim SH, Kwon CJ, Park YH, Lee KJ, Park DS, Kim KH, Kim SM and Park CB. Effect of *Lythrum salicaria* L. ethanol extract on lipid metabolism and anti–obesity in rat fed high fat diet. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2011 ; 19 : 319–24.
26. Lee JH, Cho CW, Han XF, Hwang JY, Kang MJ, Joo HJ, Kim ME, Seo YJ and Kim JI. Amelioration of plasma glucose and cholesterol levels in Db/db mice by a mixture of chinese herbs. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2008 ; 16 : 225–30.
27. Hwang WK, Kim DH. Study on the Effect of Injinwieryungtang(IJWRT) on hyperlipidemia. *J of Korean medicine research institute, Daejeon University*. 2005 ; 14(2) : 71–85.
28. Kim CY. Anti–hyperlipidemic Effect of



- Samhwangsasim-tanggambang in High-cholesterol Diet induced Rat Model. Sangji University, Wonju, Korea, 2016.
29. Jung SH, Lee KT, Ann HS, Lee JY, Choi JW, Kim DG. Hypolipidemic and Antioxidative Effects of Bangpoongtongsungsankamibang on Diet-Induced Obesity Rats. *Kor J Pharmacogn*, 2006 ; 37(3) : 190-5.
  30. Cha JY, Kim DJ, Kim SH, Kim YK, Cho YS. Pharmacological Effect of Hawangyeonhaedoktang on Experimental Triglyceride Accumulated HepG2 Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2003 ; 32(4) : 586-90.
  31. Ducharme NA, Bickel PE. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinol*, 149 2008 ; 149 : 942e949.
  32. Wang Y, Viscarra J, Kim SJ, Sul HS. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015 ; 16(11) : 678e689.
  33. Kang OH, Kim SB, Mun SH, Seo YS, Hwang HC, Lee YM, Lee HS, Kang DG, Kwon DY. Puerarin ameliorates hepatic steatosis by activating the PPARalpha and AMPK signaling pathways in hepatocytes. *Int J Mol Med*, 2015 ; 35 : 803-9.
  34. Liao CC, Ou TT, Huang HP, Wang, CJ. The inhibition of oleic acid induced hepatic lipogenesis and the promotion of lipolysis by caffeic acid via upregulation of AMP-activated kinase. *J Sci Food Agric*, 2014 ; 94 : 1154-62.
  35. Malandrino MI, Fucho R, Weber M, Calderon-Dominguez M, Mir JF, Valcarcel L, Escote X, Gomez-Serrano M, Peral B, Salvado L, Fernandez-Veledo S, Casals N, Vazquez-Carrera M, Villarroya F, Vendrell JJ, Serra D, Herrero L. Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015 ; 308 : E756-eE769.
  36. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol*, 2013 ; 48 : 434-41.