

## Antioxidant and Anti-obesity Effects of Herbal Complex Extract

Jae-Won Shim<sup>1†</sup>, Seung-Ju Lee<sup>2†</sup>, Hye Kyung Kim<sup>2</sup>, Yun-Sik Choi<sup>2</sup> and Young-Ah Jang<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Shim Jae-Won Oriental Medical Clinic, Busan 48095, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Kyungpook University, Busan 48434, Korea

<sup>3</sup>Convergence Research Center for Smart Healthcare of KS R&DB Foundation, Busan 48434, Korea

Received April 1, 2022 / Revised June 18, 2022 / Accepted July 8, 2022

The purpose of this study was to evaluate the effect of antioxidant and anti-adipogenic activities in ethanol extracts from herb mixture (*Ephedra sinica*, *Atractylodes lance*, *Gypsum fibrosum*, and *Theobroma cacao*). DPPH, ABTS<sup>+</sup> radical and xanthine oxidase scavenging activities were measured for antioxidant activity. Extracts of the herb mixture had 75.0, 100.8, and 79.5% scavenging activities at 1,000 µg/ml concentration, respectively. We investigated the inhibition of adipogenesis and adipocyte differentiation with an extract of an herb mixture in 3T3-L1 preadipocytes. An extract from the herb mixture at concentrations between 0 and 50 µg/ml did not affect 3T3-L1 cell viability. Treatment with herb mixture extracts of 25, 50, and 75 µg/ml in 3T3-L1 preadipocytes inhibited lipid accumulation in a dose-dependent manner. As a result of a Western blot experiment, it was shown that the herb mixture inhibited the differentiation transcription factors, PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ , by 44.2 and 77.6%, respectively, at a concentration of 75 µg/ml in MDI-induced differentiated 3T3-L1 cells. As a result of RT-PCR, the gene expression of C/EBP $\alpha$ , SREBP-1c, and PPAR $\gamma$  was significantly inhibited by 43.4%, 59.6%, and 55.3%, respectively, at the concentration of 75 µg/ml of the herb mixture compared with the MDI-treated group. In addition, the expression of fatty acid synthase (FAS), a fatty acid synthesis regulator, was suppressed. These results can be applied to develop a functional food for anti-obesity with a herb mixture.

**Key words :** Anti-obesity, antioxidant, herb mixture, radical, 3T3-L1

### 서 론

비만은 에너지의 섭취량이 소비량을 초과하면서 에너지 과잉으로 체내에 지방이 과도하게 축적되는 현상을 말하며, 환경, 유전적 요인, 생활습관 및 식습관 등의 원인들에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다[1]. 비만은 고혈압, 고지혈증, 관절염, 동맥경화 및 제2형 당뇨병을 포함한 다양한 질병과의 관련이 있는 것으로 알려지면서 위험성이 대두되고 있다[2]. 이러한 비만 치료를 위하여 사용되는 치료법에는 식사요법, 행동요법과 같은 비약물요법과 식욕 억제제, 영양소 흡수 저해제와 같은 약물요법이 사용되고 있다. 현재 약물요법으로 사용되는 의약품들의 경우 혈압상승, 두통, 불면증, 변비 및 무력감 등과 같은

다양한 부작용이 나타나 안전성이 확보된 치료제 개발이 필요한 실정이다[34, 35]. 따라서 안전성이 확보된 천연물을 사용한 비만 치료 소재개발에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다[36, 37].

지방세포의 adipogenesis (분화)는 지방전구세포가 분화하여 성숙한 지방세포가 되는 과정으로 중성지방이 adipogenesis를 통해 세포 내에 축적되면서 비만이 유발된다고 알려져 있다[3]. Adipogenesis와 관련된 작용기전을 확인하기 위해서 일반적으로 mouse의 배아세포인 3T3-L1 지방전구세포를 실험에 사용하고 분화를 유도하기 위하여 dexamethasone, insulin 및 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 등을 필요로 한다[4, 5]. 지방세포 분화 과정에 발현되는 대표적인 전사인자에는 CCAAT/enhancer binding proteins  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 및 sterol regulatory element binding proteins-1c (SREBP-1c) 등으로 알려져 있으며 SREBP-1c는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현의 전사인자 역할을 하며, acetyl-CoA carboxylase (ACC) 및 fatty acid synthase (FAS) 등의 유전자 발현을 유도하여 지방산 대사 조절을 담당한다[7, 8]. PPAR $\gamma$  발현의 경우 dexamethasone과 cAMP에 의해 유도된 C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$ 의 발현에 의해 조절되고, C/EBP $\alpha$

<sup>†</sup>Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-51-663-5688, Fax : +82-51-663-4089

E-mail : yaviol@ks.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 PPAR $\gamma$ 의 발현이 증가함에 따라 증가된다[6]. 따라서 비만을 유발하는 원인 중 하나인 지방세포의 분화과정에 관련된 전사인자들의 활성을 억제함으로써 비만 예방 및 치료 효과를 나타낼 수 있다.

마황(*Ephedra sinica*)은 마황과(*Ephedraceae*)에 속하는 다년생 초본으로 주성분에는 L-ephedrine, norephedrine, (+)-pseudoephedrine 등의 alkaloid로 구성되어 있다[9, 10]. 한방에서 두통, 해열, 진해 및 항염증 등에 사용되어 왔으며 마황 추출물의 약리작용에는 항산화, 항바이러스, 항비만 작용 등이 보고되어 있다[11-14]. 창출(*Atractylodes lancea*)은 가는 잎삼주(*Atractylodes lancea*)의 건조된 근경을 의미하며 다년생 초본이고, 길이는 30~80 cm이다[16]. 창출을 구성하는 성분에는 atractylon, atractylenolide, acetaldehyde, atractanin A 및 diacetylactylenolide 등이 있으며 한의학에서 급만성위장질환, 부종, 구토 및 대장염증 등에 사용되며 약리작용에는 항염증, 항산화, 항비만 및 항당뇨 작용들이 연구되어져 왔다[17-19]. 석고(*Gypsum Fibrosum*)는 황산염류에 속한 광물이며 함수황산칼슘( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )을 함유하고 있으며 관련된 약리작용에는 항산화, 항염증, 당뇨병성신증, 만성신부전 및 항비만 작용들이 알려져 있다[20-22]. 카카오(*Theobroma cacao*)는 벽오동나무과(*Sterculiaceae*)의 다년생 식물인 카카오 나무의 열매이고, 카카오 님스(cacao nibs)는 카카오의 종자를 발효하고 건조하여 얻은 카카오 빈을 로스팅한 후 껍질을 제거하여 얻는다[23, 24]. 카카오 추출물에는 catechins, epicatechins을 포함하는 flavan-3-ols류와 quercetin, isoquercitrin류가 다량 함유되어 있고 카카오는 항산화 및 항균 효과와 심혈관 질환과 관련된 사망 위험을 줄이는 효과를 가지고 있다[25-27].

상기 제시된 생약들은 약리학적 효능이 우수한 것으로 밝혀져 있으나 한약을 제조하여 복용할 때 복합물의 형태의 사용이 활용도가 높음을 고려하여 복합물로 제조하였을 때에 지방세포 분화 유도와 지방생합성에 어떠한 영향을 미치는지 연구하고자 하였다. 본 연구에서는 한방복합물이 전지방세포주인 3T3-L1에 대한 분화 억제능과 adipogenesis와 관련된 단백질 및 유전자 발현 양상을 확인하여 항비만 소재로서 활용 가능성을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

항산화능을 확인하기 위하여 사용된 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)와 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)-diammonium salt (ABTS<sup>+</sup>), Xanthine, Xanthine oxidase와 세포 독성을 확인하기 위한 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA)에서

구입하여 사용하였다. Bovine serum albumin, insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-methyl xanthine (IBMX), oil red O reagent는 Sigma (St. Louis, MO, USA), 단백질 발현에 사용된 anti-PPAR $\gamma$ , anti-C/EBP $\alpha$ , anti-GAPDH는 Cell signaling (MA, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 분석기기는 ELISA reader (Power Wave XS, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하였다.

### 한방복합물 제조

본 실험에서 한방복합물에 사용한 마황, 창출, 석고, 카카오닙스는 한약재시장에서 구매하여 실험에 사용하였다. 한방복합물의 추출물 제조과정은 마황, 창출, 석고, 카카오닙스를 4:3:2:7.2의 비율로 혼합한 후 중량 1,620 g에 30 l의 water를 가하여 108°C에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물은 여과하여 농축하고 동결건조를 진행한 후 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### DPPH radical 소거능

시료의 DPPH radical 소거능은 Blois의 방법[28]에 의해 전자공여능(EDA; electron donating ability)으로 측정하였다. 농도별로 제조한 시료용액 100  $\mu\text{l}$ 에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액을 50  $\mu\text{l}$  넣고 교반한 후 차광하여 30분 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능의 효과는 시료용액을 첨가한 군과 시료용액을 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### ABTS radical 소거능

한방복합물의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능은 ABTS<sup>+</sup> radical cation decolorization assay [29]을 이용하여 측정하였다. 7.4 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)와 2.6 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합한 후 차광하여 실온에서 24시간 동안 반응하였다. 그 후 ABTS<sup>+</sup> 용액은 734 nm에서 흡광도가 0.706 $\pm$ 0.001이 되도록 에탄올에 희석하여 사용하였다. ABTS<sup>+</sup> radical 소거능은 DPPH radical 소거능과 동일한 방식으로 계산하였다.

### Xanthine oxidase 저해활성

시료의 xanthine oxidase 저해활성 평가는 Stirpe의 방법[30]에 따라 측정하였다. 각 농도별로 제조된 시료용액 0.1 ml에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 ml를 혼합하고 2 mM의 xanthin을 녹인 기질액 0.2 ml를 가한다. 0.2 U/ml xanthine oxidase 0.1 ml를 가하여 15분간 37°C에서 반응시킨 다음 1 N HCl 1 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 저해는 시료 첨가군과 무첨가군의 uric acid의 양을 백분율로 나타내었다.

### 3T3-L1세포 배양 및 분화

세포 배양과 분화실험에 사용된 세포주는(mouse embryonic fibroblast cell line)인 3T3-L1지방전구세포로 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, WelGene Biopharmaceuticals, Daegu, Korea) 배지에 10% FBS를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 분화 유도를 위해 24 well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 분주한 후 100% confluency 상태가 되면 2일간 더 배양시킨 다음 MDI (0.5 mM IBMX, 1 µM dexamethasone, 1 µg/ml insulin)를 포함하는 배지로 교체하여 2일간 지방세포 분화를 유도하였다. 배양 후 48시간마다 1 µg/ml insulin이 함유된 분화배지로 교환하여 배양시켰다. 지방세포 분화를 유도하는 동안 추출물을 각 농도별로 배양액에 처리하였고, 분화가 완성되는 8일째 지방세포 분화 정도를 관찰하였다.

### 세포 생존율 측정

3T3-L1 세포에서 한방복합물에 의한 세포독성을 평가하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 3T3-L1 세포를 96 well plate에 5×10<sup>3</sup> cells/well 농도로 분주하여 24시간 배양하였다. 그 후, 시료의 최종농도가 25, 50, 75, 150, 300 µg/ml 되도록 처리한 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 세포 생존율을 측정하기 위하여 PBS에 용해시킨 5 mg/ml MTT 시약을 첨가하여 37°C에서 2시간 배양한 다음 상층액을 제거한 후 DMSO를 100 µl 첨가하여 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Oil Red O 염색

한방복합물이 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제시키는지 확인하기 위하여 Oil Red O 시약을 이용하여 염색을 실시하였다. 지방전구세포를 8일 동안 분화시킨 후에 배지를 제거하여 10% formaldehyde 용액으로 상온에서 30분 동안 세포를 고정한 다음 용액을 제거하였다. PBS로 2회, 70% 에탄올로 2회 세척한 후 Oil Red O 용액을 처리하여 염색하였다. 염색된 세포는 현미경으로 관찰 후 사진을 촬영하였고, 촬영이 끝난 세포는 isopropyl alcohol에 4% NP-40가 첨가된 용액을 이용하여 용해시킨 후 ELISA reader (PowerWave XS, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)로 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Western Blot

한방복합물이 adipogenic transcription factors의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot analysis를 실시하였다. 분화가 완료된 세포를 harvest 한 후, RIPA buffer를 well 당 100 µl를 첨가하여 1시간 동안 냉장하여 세포

를 용해시키고 그 후 원심분리 하여(12,000 rpm, 4°C, 10 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 Bradford assay로 정량하였으며, 10 µl의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 전기 영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 transfer하였다. Transfer가 끝나면 5% skim milk에 1~2시간 동안 방치하여 background를 제거 시켰다. 1×TBST로 3회 washing 후 1차 antibody (1:1,000)를 24시간 붙인 후 1×TBST로 3회 washing 후 2차 antibody (1:1,000)를 2시간 반응한 후 ECL kit (Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 film에 옮겨 측정된 후 Image Quant LAS-4000 (GE life sciences, Taiwan)으로 band density를 확인하였다.

### Total RNA 추출 및 Reverse transcription-PCR

Total RNA는 High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland)을 이용하여 제조사의 실험방법에 준하여 추출한 후, 1 µg/µl의 농도로 정량하였다. 정량화된 total RNA는 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)로 역전사를 일으켜 cDNA를 합성하였다. CEBP-α, SREBP-1c, PPAR-γ의 mRNA 발현을 확인하기 위하여 Fast start Essential DNA Green Master kit (Roche)을 이용하여 Reverse transcription-PCR을 진행하였고, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. PCR의 조건은 94°C에서 60초 동안 30 cycle을 증폭시키고 60°C에서 60초, 72°C에서 65초 동안 진행하였다. 증폭 과정에서 만들어진 DNA를 0.5 µg/ml의 ethidium bromide를 첨가한 1.5% metaphor agarose gel에서 전기영동을 진행하여 cooled CCD camera system EZ-Capture II 시스템과 CA analyzer ver. 3.00 software를 사용하여 mRNA의 발현 정도를 확인하였다.

### Real-time PCR

분화가 완료된 3T3-L1 전지방세포의 상층액을 제거하고 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)으로 2회 세척한 후, TRI-Solution을 가하여 세포벽을 깨고 Chloroform을 첨가하여 수용액층과 유기용매층을 분리하여 phenol 성분을 제거하였다. Isopropanol로 RNA 침전을 시킨 다음 75% 에탄올로 세척하고 RNA pellet만 남겨 air-dry한 후 RNase free D.W를 넣어서 pellet을 녹여 최종적으로 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Nano drop (microdigital, Seongnam, Korea)을 이용하여 정량하고, RT master mix를 이용해 역전사 반응하여 cDNA를 합성하였다. 지방세포 분화에 관련된 인자인 CEBP-α, SREBP-1c, PPAR-γ, FAS의 mRNA 발현은 TB Green® Premix Ex Taq II를 이용하여 증폭시켜 확인하였다. PCR 조건은 94°C에서 30초(denaturation), 55°C에서 30초(annealing), 72°C에서 30초(exten-

sion)를 40회 반복하였다.

**통계처리**

실험결과에 대한 통계처리는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software package (Version 22.0; IBM, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)를 이용하여 유의성을 확인한 후, t-test를 이용한 다중비교를 실시하여 유의수준  $p < 0.05$ 에서 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**한방복합물의 항산화능**

DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 radical로, 항산화 물질에 의해 환원되면 자색이 노란색으로 탈색되는 성질을 이용한 방법이다[31]. 한방복합물의 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과를 Fig. 1A에 나타내었다. 한방복합물 10, 100 및 1,000 µg/ml 농도의 DPPH radical 소거 활성을 보았을 때 농도가 증가할수록 소거 활성이 증가하는 것을 확인하였고, 1,000 µg/ml 농도에서 75.0%의 소거 활성을 보였다. ABTS<sup>+</sup>는 cation radical를 갖는 화합물로서, ABTS와 potassium persulfate 간의 반응으로 생성된다. 추출물의 항산화 활성에 의하여 ABTS<sup>+</sup>가 소거되면서 특유의 색인 청록색이 탈색되고, 이것을 흡광도 값으로 나타내어 소거활성을 측정할 수 있다[32]. ABTS radical 소거 활성 결과는 Fig. 1B에 나타내었다. 추출물의 농도가 증가할수록 ABTS 소거능도 증가함을 확인하였고, 추출물 1,000 µg/ml 농도에서 100.8%로 양성대조군인 Vitamin C와 유사한 소거 활성을 나타내었다. Xanthine oxidase는 생체 내에서 purine 대사에 관여하는 효소로서, xanthine 또는 hypoxanthine에서 urate를 형성하고, 혈장 내에 urate가 증가하게 되면 통풍과 신장질환을 일으키는 효소로 알려져 있다[33]. Xanthine oxidase 저해활성 측정은 Fig.

1C에 결과를 나타내었다. 한방복합물의 xanthine oxidase 저해능은 1,000 µg/ml에서 79.5%로 나타났고, 추출물의 농도가 증가함에 따라 저해활성도 증가함을 확인하였다. 창출이 함유된 한방복합물인 창출금련당의 경우 DPPH radical 소거능이 72.5%로 나타나 본 실험의 한방복합물이 효능이 더 우수한 것을 확인하였다[17]. 마황, 창출, 석고, 카카오닙스를 활용한 한방복합물의 항산화능을 DPPH, ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 및 xanthine oxidase 저해활성으로 확인한 결과 세가지 실험 모두 1,000 µg/ml 농도에서 75% 이상의 높은 radical 소거능을 보여 한방복합물의 항산화능이 우수한 것으로 확인되었다.

**한방복합물의 세포 생존율 측정 및 지방세포 분화 억제 효능**

3T3-L1 세포에 대해 한방복합물의 농도에 따른 세포 생존율을 확인하고, 세포 내 지질 축적에 미치는 영향을 확인하기 위해 Oil red O로 염색을 진행하였다. 한방복합물의 세포독성은 0-300 µg/ml 범위에서 독성확인을 진행하였고 75 µg/ml에서 90% 이상의 세포생존율을 나타내어 이후의 실험은 한방복합물 25, 50 및 75 µg/ml 농도로 진행하였다(Fig. 2A). 한방복합물 25, 50 및 75 µg/ml을 3T3-L1 cell에 처리하여 세포내 지방 생성에 미치는 영향을 확인한 결과 지방세포로 분화시키지 않은 MDI 무처리군에서는 한방복합물에 의한 지방 축적이 확인되지 않았고, MDI를 처리하여 지방세포 분화를 유도한 세포군에서는 지방의 축적이 관찰되었다(Fig. 2B). MDI를 처리하여 유도된 지방세포 분화 세포군에 한방복합물 25, 50 및 75 µg/ml를 농도별로 처리하였을 때, 각 군에서 농도의존적으로 지방 축적이 감소됨을 확인하였고, 한방복합물 75 µg/ml 처리군에서 약 61.2%의 억제율을 보였다. 이를 통해 한방복합물이 세포 생존율에는 영향을 주지 않는 범위의 농도에서 3T3-L1 세포에 대한 지질 축적 억제 효과를 확인하였다. 선행 연구에서 고지방식이로 비만을 유도한 마우스 모델에 마황 추출물을 투여하였을 때 간조직 내의 지질입자의 크기 감소와 지질 분포도가 감소하였다고 보고되었고

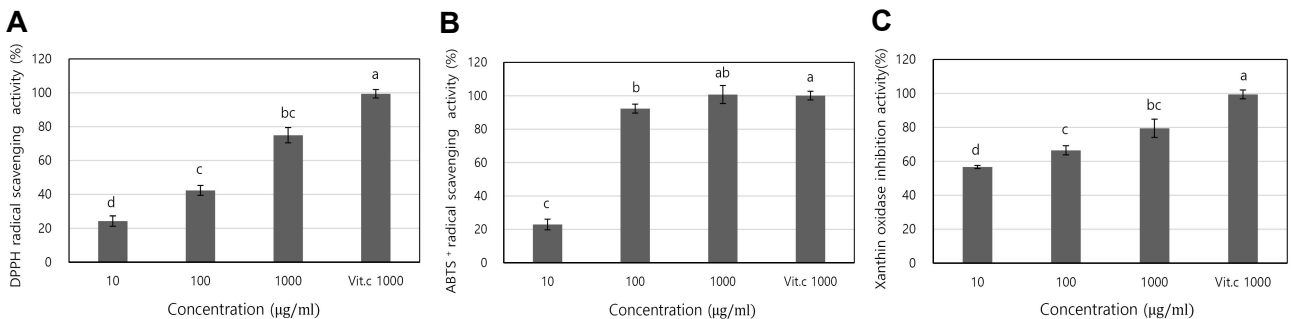


Fig. 1. Antioxidant abilities of herb mixture and Vit C. (A: DPPH radical scavenging activity, B: ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity, C: Xanthine oxidase inhibition activity. Values are mean ± SD of triplicate measurements. Values with different letters<sup>a,b,c,d</sup> are significantly different each other by ANOVA and Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

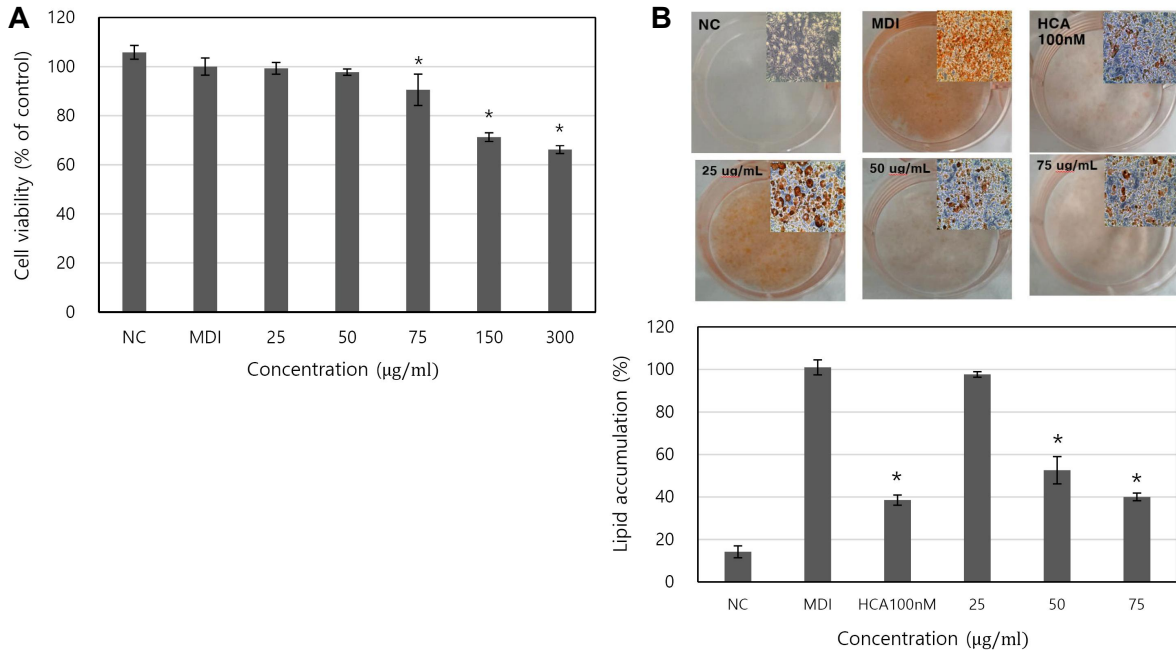


Fig. 2. 3T3-L1 preadipocytes viability rate was measured by MTT assay (A). Cells were treated with various concentrations of herb mixture (0-300 µg/ml) for 24 hr through MTT assay. NC: untreated cells. MDI: 0.5 mM IBMX, 1 µM dexamethasone, 1 µg/ml insulin. Lipid accumulation was measured by Oil Red O staining (B). The intracellular lipid droplets in the adipocyte cells were decreased in dose-dependent manner. Representative images of the cells were captured. The photographs were taken at a magnification of ×200. The concentrations of triglycerides (TG) were measured by ELISA assay. The concentrations of triglycerides in the adipocyte cells were decreased in dose-dependent manner. The statistical analysis of the data was carried out by use of ANOVA test. \**p*<0.05, compared to NC (untreated groups).

[13], 고지방식이로 유도한 당뇨병 동물 모델에서 창출을 포함한 혼합추출물을 투여할 시 혈당 감소 및 간, 췌장 조직에서 lipid droplets이 유의적으로 감소함을 확인하였다[19]. 따라서 각 생약이 가지고 있는 항비만 효과가 혼합물로 제조하였을 때도 비만 예방의 가능성을 나타낼을 시사하였으며 향후 동물시험군에서도 확인할 필요성이 있다.

**한방복합물이 지방세포 분화 및 지방생합성 관련 단백질 발현에 미치는 영향**

지방세포의 분화는 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 과정으로 이 과정으로 생성된 지방세포에서 지방의 합성이 증가하면서 지방조직이 증가하여 비만을 유발한다[3]. 지방 전구 세포에서 지방세포로의 분화에 관여하는 전사인자에는 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ)와 CCAAT/enhancer binding proteins α (C/EBPα) 등이 있으며, 선행 연구 결과에 따르면 이 전사인자들의 발현을 억제하는 경우 지방세포 분화를 억제하여 체지방 축적을 억제한다고 알려져 있다[39]. 한방복합물이 지방생합성과 관련된 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 지방세포의 분화 전사인자인 PPARγ, C/EBPα의 단백질 발현량을 Western blot 실험방법으로 측정하였다.

분화를 유도한 MDI처리군의 경우 음성대조군에 비하여 PPARγ, C/EBPα의 발현이 각각 약 3배 및 2배로 증가되었으며 MDI 처리와 함께 한방복합물을 처리한 군에서 C/EBPα의 단백질 발현량은 50 µg/ml 농도의 72.9%로 유의하게 감소하였고, PPARγ의 경우 50 µg/ml 처리군에서 71.3%, 75 µg/ml 처리군에서 44.2%로 유의하게 감소하며 농도의존적으로 단백질 발현량이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 따라서 한방복합물이 지방세포 분화의 전사인자인 PPARγ, C/EBPα의 단백질 발현을 억제하여 지방세포 분화를 억제할 것으로 확인하였다.

**한방복합물의 지방세포 분화 및 지방생합성 관련 mRNA 발현에 미치는 영향**

지방세포 분화 과정의 전사인자인 C/EBPα, PPARγ의 발현은SREBP-1c에 의하여 조절되며, 발현된 C/EBPα와 PPARγ는 상호 작용하여 지방세포 분화를 일으켜 중성지방의 생성과 축적을 유도한다. 또한 활성화된 SREBP-1c, PPARγ는 지방산 합성을 위한 유전자인 FAS의 발현을 유도한다[7, 8]. 한방복합물이 지방세포 분화와 관련된 mRNA 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 RT-PCR을 진행하였으며, house keeping gene으로는 GAPDH을 사용하였다. Reverse transcription-PCR 결과에서 SREBP-1c, PPAR

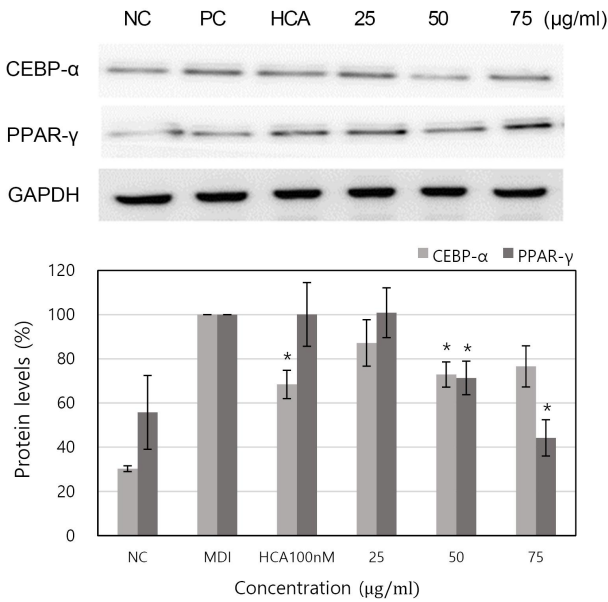


Fig. 3. Protein expression effects of herb mixture (25-75 µg/ml) on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells confirmed Western blotting. Differentiation of confluent 3T3-L1 cells was initiated in DMEM containing differentiating culture mixture[MDI: 0.5 mM IBMX, 1 µM dexamethasone, 1 µg/ml insulin]. Western blotting was performed using 20 µg of each sample. The loading control was assessed using GAPDH antibody. The relative intensities, protein expression compared with the GAPDH expression were determined using quantity One Software. Each value is expressed as the mean±SD of three independent experiments. The statistical analysis of the data was carried out by use of ANOVA test. \**p*<0.05, compared to NC (untreated groups).

γ, C/EBPα의 mRNA 발현량은 MDI 처리군이 음성대조군에 비하여 각각 약 2.5, 5 그리고 2.5배 증가하였다. MDI로 분화를 유도한 군에 한방복합물 처리한 경우 C/EBPα, SREBP-1c, PPARγ의 유전자 발현이 농도의존적으로 감소하는 경향이 나타났고, MDI 처리군을 100%로 보았을 때 한방복합물 75 µg/ml 농도에서 C/EBPα, SREBP-1c, PPARγ의 유전자 발현은 각각 43.4%, 59.6% 및 55.3%로 유의하게 억제되었다(Fig. 4). Real-time PCR결과는 지방세포 전사인자인 C/EBPα, PPARγ, SREBP-1c 및 지방산 합성 관련 유전자인 FAS의 mRNA 발현량은 한방복합물 75 µg/ml 농도에서 각 0.3, 0.7, 0.8, 0.6 level을 나타내 MDI 처리군에 비하여 감소하였고, C/EBPα는 양성대조군인 HCA 100 nM 처리군보다 75 µg/ml 농도에서 2배 이상 효능이 감소함을 확인하였다(Fig. 5). 이 결과들은 PPARγ가 C/EBPα와 상호작용하여 지방세포의 분화 및 지방세포 축적에 중요한 핵 수용체로 사용되며, 이 상호작용을 통하여 FAS의 전사를 조절한다는 연구 결과와 일치하는 것으로 확인되었다[40]. 따라서 한방복합물은 지방세포 전사

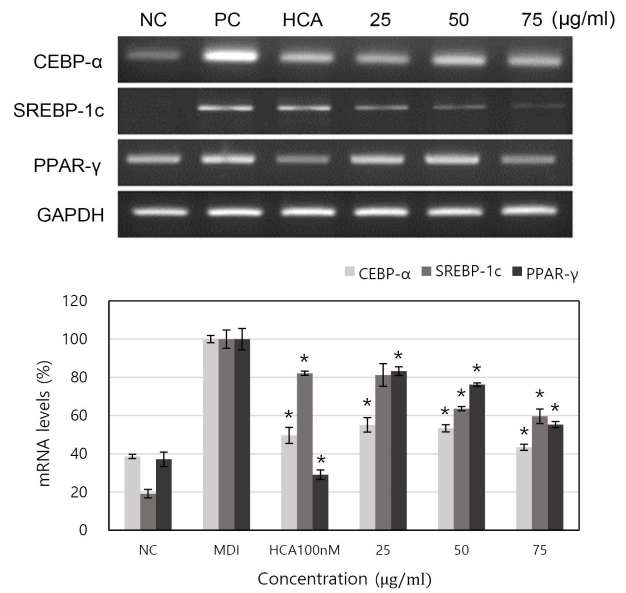


Fig. 4. mRNA expression effects of herb mixture (25-75 µg/ml) on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells confirmed RT-PCR. Total RNA was extracted and cDNA was prepared. Equivalent amounts of cDNA were amplified using primers specific for CEBPα, SREBP-1 and PPARγ. The relative intensities mRNA expression compared with the GAPDH expression were determined using quantity One Software. Each value is expressed as the mean ± SD of three independent experiments. The statistical analysis of the data was carried out by use of ANOVA test. \**p*<0.05, compared to NC (untreated groups).

인자인 C/EBPα, PPARγ, SREBP-1c의 발현을 억제하여 지방 합성 효소인 FAS의 발현을 억제시킴으로서 지방세포의 분화를 억제하여 체지방감소에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 마황, 창출, 석고 및 카카오넵스를 사용하여 복합물을 제조한 후 추출물의 항산화능을 DPPH radical, ABTS<sup>+</sup> radical 및 xanthine oxidase 저해활성 측정을 통해 항산화능이 있음을 확인하였다. 한방복합물을 지방전구세포인 3T3-L1 세포에서 세포생존율과 Oil Red O를 이용한 지방세포 분화 억제 실험을 진행하여 세포 내 지방 축적이 감소함을 확인하였고, Western blot과 RT-PCR을 통하여 지방세포 분화 과정의 전사인자인 C/EBPα, PPARγ, SREBP-1c 및 FAS의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 이 결과들을 통하여 한방복합물이 지방세포 분화 과정 중 전사인자의 발현을 억제하여 체지방 축적 억제 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 한방복합물에 사용된 시료 중 카카오넵스는 독성이 거의 없으며 체질에 따른 부작용이 적다고 알려져 있어 복합물에서 나머지 시료 대비 높은 비율로 혼합되었으나 향후 다양한 혼합비율에 따른 효능분석이 추가적으로 연구되어야 할 부분이다. 본 연구

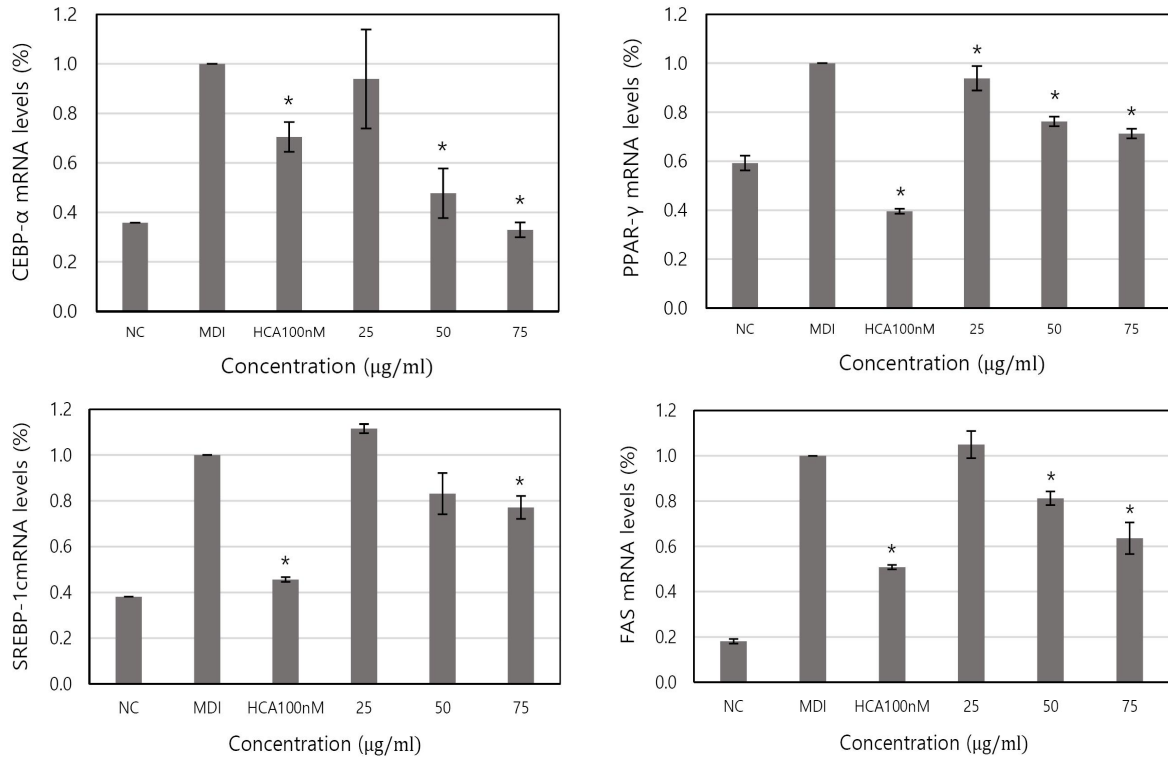


Fig. 5. mRNA expression effects of herb mixture (25-75 μg/ml) on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells confirmed real-time-PCR. Total RNA was extracted and cDNA was prepared. Equivalent amounts of cDNA were amplified using primers specific for CEBP-α, PPARγ, SREBP-1c, and FAS. The relative intensities mRNA expression compared with the GAPDH expression were determined using quantity One Software. Each value is expressed as the mean ± SD of three independent experiments. The statistical analysis of the data was carried out by use of ANOVA test. \**p*<0.05, compared to NC (untreated groups).

결과를 바탕으로 한방복합물이 항비만 소재로서 활용 가능성이 높을 것으로 사료되며 향후 추출물의 실험 동물 내에서의 지방 억제 효능에 대한 연구를 통해 보다 과학적인 기초연구의 자료로 사용하길 기대해본다.

### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

### References

1. Na, S. Y. and Myung, S. J. 2012. Obesity and colorectal cancer. *Kor. J. Gastroenterol.* **59**, 16-26.
2. Ahn, J. Y., Lee, H. J., Kim, S. N. and Ha, T. Y. 2010. Curcumin-induced suppression of adipogenic differentiation is accompanied by activation of Wnt/beta-catenin signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, 1510-1516.
3. Attie, A. D. and Scherer, P. E. 2009. Adipocyte metabolism and obesity. *J. Lipid Res.* **50**, 395-399.
4. Green, H. and Meuth, M. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-133.
5. Jessen, B. A. and Stevens, G. J. 2002. Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene* **299**, 95-100.
6. Park, J. Y. and Kim, J. B. 2002. Molecular insights into fat cell differentiation and functional roles of adipocytokines. *Endocrinol. Metab.* **17**, 1-9.
7. Horton, J. D., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**, 1125-1131.
8. Kim, J. B. and Spiegelman, B. M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* **10**, 1096-1107.
9. Abourashed, E. A., El-Alfy A. T., Khan, I. A. and Walker, L. 2003. Ephedra in perspective – a current review. *Phytother. Res.* **17**, 703-712.
10. Jang, I. S., Yang, C. S. and Hwang, E. H. 2007. The need for clinical practice guidelines in usage of mahuang in weight loss. *J. Kor. Med. Obes Res.* **7**, 23-29.
11. Song, S. M., Song, Y. K., Lim, H. H., Kwon, K. R. and Lim, T. J. 2007. Effects of Ephedrae Herba on the activity of antioxidant. *J. Pharmacopuncture* **10**, 57-65.
12. Lee, D. S. and Lee, D. S. 2014. Antiviral activity of methanol extract from *Ephedra sinica* Stapf. *Kor. J. Food*

- Preserv.* **21**, 735-739.
13. Oh, M. J., Lee, C. H., Kim, H. J., Kim, H. R., Kim, M. S., Lee, D. Y., Oh, C. H., Kim, M. S. and Kim, J. S. 2016. The comparative studies on anti-obesity effects of Ephedrae Herba and Cyperi rhizoma in high fat diet fed mice. *Herb. Formula Sci.* **24**, 108-123.
  14. Kee, Y. B., Kim, D. H., Yang, M. S., Kang, D. H., Kim, S. J. and Choi, J. B. 2014. Effect of mixed extract of *Ephedrae Sinica* and *Fibrosus Gypsum* on differentiation of preadipocytes and obesity of rats. *J. Kor. Med. Rehabil.* **24**, 11-27.
  15. Han, H. K. and Choi, E. Y. 2020. Effects of *Atractylodes lancea* on plasma glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetic rats. *Kor. J. Food Nutr.* **33**, 544-550.
  16. Kim, S. M. and Kim, K. J. 2011. The effects of ethanol extract from *Atractylodes Chinensis* Rhizome on the mast cell-mediated inflammatory responses. *J. Kor. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **24**, 45-63.
  17. Won, H. R., Park, H. S., Kim, E. H. and Kim, Y. M. 2018. The anti-oxidant and anti-inflammatory activities of changchulgeumryeontang extract. *J. Kor. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **31**, 1-12.
  18. Han, H. K. and Choi, E. Y. 2020. Effects of *Atractylodes lancea* on antioxidant enzyme activities in the liver cytosol of diabetic rats. *Culinary Science & Hospitality Research* **26**, 109-117.
  19. Jung, S. M., Seol, Y. H., Chun, K. Y., Park, M. H., Liu, Y., Kang, S. Y., Park, Y. K. and Jung, H. W. 2020. Anti-obesity and antidiabetic effects of polyherbal extract with *Atractylodes* Rhizoma, *Anemarrhenae* Rhizoma, *Cinnamomi* Cortex, and *Moutan* Radicles Cortex in high fat diet-induced obesity mice. *J. Kor. Med. Obes Res.* **20**, 69-77.
  20. Lee, H., Han, Y. B., Ko, W. M., Kim, J. Y., Lee, D. S. and Woo, E. R. 2020. The comparison between various solvents extracts of mahaenggamsuk-tang on the anti-oxidative, anti-inflammatory and neuro-protective effects. *Kor. J. Pharmacogn.* **51**, 163-170.
  21. Hong, G. H., Lee, K. H., Jeong, G. H., Kim, Y. S. and Lee, H. J. 2008. The effects of Gypsum on streptozotocin-induced diabetic nephropathic rats. *Kor. J. Orient. Int. Med.* **29**, 1025-1036.
  22. Byun, S. H. 2008. The effects of *Gypsum Fibrosum* on renal functional and histopathological disorder in chronic renal failure rat model. *Kor. J. Orient. Int. Med.* **29**, 871-886.
  23. Stark, T., Bareuther, S. and Hofmann, T. 2005. Sensory-guided decomposition of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) and structure determination of taste-active polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5407-5418.
  24. Kim, N. M., Choi, J. H., Jeon, H. K., Ryu, H. S. and Choi, H. Y. 2019. Antioxidant activity and quality characteristics of cookies prepared with cacao nibs powder. *Kor. J. Food Cook Sci.* **35**, 581-590.
  25. Ferran, S. R., Olga, J., Isidre, C., Cristina, A. L., Maria, I. P. and Lamuela Raventos, R. M. 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom.* **38**, 35-42.
  26. Lotito, S. B. and Frei, B. 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 1727-1746.
  27. Djousse, L., Hopkins, P. N., North, K. E., Pankow, J. S., Arnett, D. K. and Ellison, R. C. 2011. Chocolate consumption is inversely associated with prevalent coronary heart disease: the national heart, lung, and blood institute family heart study. *Clin. Nutr.* **30**, 182-187.
  28. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
  29. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
  30. Stirpe, F., Della Corte, E. and Lorenzoni, E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* **244**, 3855-3863.
  31. Choe, M., Kim, D. J., Lee, H. J., You, J. K., Seo, D. J., Lee, J. H. and Chung, M. J. 2008. A study on the glucose-regulating enzymes and antioxidant activities of water extracts from medicinal herbs. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 542-547.
  32. Kim, J. E., Joo, S. I., Seo, J. H. and Lee, S. P. 2009. Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 989-995.
  33. Hatano, T., Yasuhara, T., Fukuda, T., Noro, T. and Okuda, T. 1989. Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoaryl coumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 3005-3009.
  34. Park, Y. W. 2003. Clinical guidelines of treatment of obesity in adults. *J. Kor. Med. Assoc.* **46**, 345-356.
  35. Hansen, D. L., Toubro, S., Stock, M. J., Macdonald, I. A. and Astrup, A. 1998. Thermogenic effects of sibutramine in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 1180-1186.
  36. Jeong, H. Y., Jeong, I. K., Kim, N. J., Yun, H. J., Park, J. H., Kim, B. W. and Kwon, H. J. 2019. Inhibitory effects of *Illicium verum* Hooker fil. dichloromethane fractions on adipocyte differentiation. *J. Life Sci.* **29**, 447-454.
  37. Sogo, E., Zhou, S., Haeiwa, H., Takeda, R., Okazaki, K., Sekita, M., Yamamoto, T., Yamano, M. and Sakamoto, K. 2021. Amber extract reduces lipid content in mature 3T3-L1 adipocytes by activating the lipolysis pathway. *Molecules* **26**, 4630.
  38. Manickam, E., Sinclair, A. J. and Cameron-Smith, D. 2010. Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids Health Dis.* **9**, 57.
  39. Park, S. J., Lee, I. S., Lee, S. P. and Yu, M. H. 2013. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by



supercritical fluid extracts and marc from *Cinnamomum verum*. *J. Life Sci.* **23**, 510-517.

40. Ko, J. H., Kwon, H. S., Yoon, J. M., Yoo, J. S., Jang,

H. S., Kim, J. Y., Yeon, S. W. and Kang, J. H. 2015. Effects of *Polygonatum sibiricum* rhizome ethanol extract in high-fat diet-fed mice. *Pharm. Biol.* **53**, 563-570.

## 초록 : 한방복합추출물의 항산화 및 항비만 효과

심재원<sup>1\*</sup> · 이승주<sup>2†</sup> · 김혜경<sup>2</sup> · 최윤식<sup>2</sup> · 장영아<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>심재원한의원, <sup>2</sup>경성대학교 약학대학, <sup>3</sup>경성대학교 스마트헬스케어융합연구센터)

본 연구에서는 한방복합추출물(마황, 창출, 석고, 카카오넙스)을 제조하여, 추출물에 대한 항산화 활성 및 지방세포형성억제 활성을 확인하고자 하였다. 한방복합물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH, ABTS<sup>+</sup> radical 소거능 및 xanthine oxidase 저해 활성을 측정한 결과 추출물 1,000 µg/ml 농도에서 각각 75.0, 100.8 및 79.5%로 높은 소거능을 나타내었다. 3T3-L1 지방전구세포에서 한방복합물에 의한 지방형성 및 지방세포 분화 억제를 조사한 결과 0~50 µg/ml 농도에서 3T3-L1 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다. 3T3-L1 지방전구세포에서 25, 50 및 75 µg/ml의 한방복합물 처리는 농도 의존적으로 지질 축적을 억제하였다. Western blot 실험 결과 한방복합물은 MDI 유도 분화 3T3-L1 세포에서 분화 전사인자인 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 를 75 µg/ml 농도에서 각 44.2, 76.6% 억제함을 나타내었다. 또한, 지방산 합성 조절 인자인 FAS의 발현도 억제하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 본 연구는 항비만 기능성 소재로서 한방복합추출물의 활용 가능성을 제시해 줄 수 있을 것으로 사료 된다.