

마황과 의이인 혼합추출물이 비알콜성 지방간 모델에서 지질 축적 및 포도당 흡수에 미치는 효과 및 기전 연구

유가람^{1,2} · 진혜린¹ · 임동우^{1,2} · 박원환¹

¹동국대학교 한의과대학 진단학교실, ²동국대학교 한의과대학 한의학연구소

A Study on the Effects and Mechanisms of the Combination Extract of Ephedrae Herba and Coicis Semen on Lipid Accumulation and Glucose Absorption in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

Ga-Ram Yu^{1,2}, Hye-Lin Jin¹, Dong-Woo Lim^{1,2}, Won-Hwan Park¹

¹Department of Diagnostics, College of Korean Medicine, Dongguk University, ²Institute of Korean Medicine, Dongguk University

Received: March 12, 2024

Revised: April 30, 2024

Accepted: May 11, 2024

Correspondence to: Dong-Woo Lim
Department of Diagnostics, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongguk-Ro 32, Goyang 10326, Korea
Tel: +82-31-961-5833
Fax: +82-31-961-5835
E-mail: greatwoodong@dongguk.edu

Correspondence to: Won-Hwan Park
Department of Diagnostics, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongguk-Ro 32, Goyang 10326, Korea
Tel: +82-31-961-5833
Fax: +82-31-961-5835
E-mail: diapwh@dongguk.ac.kr

Copyright © 2024 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: Ephedrae herba (EH) and Coicis semen (CS) has been frequently prescribed for the treatment of obesity. However, effects of combinational extracts of these two herbs on non-alcoholic fatty liver disease are unknown. The aim of the present study was to investigate the effects of EH and CS on lipid accumulation and glucose absorption in free fatty acids (FFAs) or palmitic acid (PA)-treated HepG2 cells.

Methods: Five samples of EH and CS were extracted by combination ratios (S1=0:100, S2=25:75, S3=50:50, S4=75:25, S5=100:0). Oil Red O staining was used to measure lipid accumulation in FFAs-induced steatosis cells. Intracellular triglycerides and total cholesterol levels were measured in FFAs-induced steatotic HepG2 cells. In PA-treated cells, intracellular 2-NBDG was detected using a fluorescence microplate reader and flow cytometry. Phosphorylation of key metabolism-related factors of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase, expression of key lipid synthesis-related factors carnitine palmitoyltransferase 1 alpha (CPT1 α), sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and CCAAT enhancer binding protein alpha (C/EBP α) were confirmed by western blot.

Results: Treatment of EH-CS combination in the FFAs-induced steatotic HepG2 cells significantly reduced lipid accumulation. As the relative ratio of Ephedrae herba increased, the lipid-lowering effects of the combination were increased. However, S1 and S5 of Ephedrae herba and Coicis semen did not significantly reduce triglycerides and total cholesterol induced by FFAs. However, the combination of Ephedrae herba and Coicis semen restored glucose absorption in PA-induced HepG2 cells. Major makers of SREBP1, PPAR γ , C/EBP α , and CPT1 α expression tended to decrease with EH ratio.

Conclusions: The EH-CS combination has advantages over sole EH and CS extracts in improving lipid and glucose metabolism in liver steatosis models.

Key Words: Ephedrae herba, Coicis semen, Lipid accumulation, Glucose uptake, Liver steatosis, Herbal combination

서론

비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

은 흔한 간 질환으로 병리학적 측면에서 알코올성 지방간과 유사하지만, 알코올과 관련이 없이 간 조직 내 중성지방(triglyceride)이 과도하게 축적된 경우를 말하며¹⁾, 단순

지방간증(hepatic steatosis)부터 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis)에 이르기까지 광범위한 의미의 개념으로 사용되고 있다²⁴). 중성지방의 축적은 미토콘드리아, 소포체 등의 세포내 소기관에서 대사 과정을 거치며 산화적 스트레스를 유발하고, 만성적으로 간세포 괴사, 염증 등을 동반하는 지방간염으로 발전할 수 있으며^{5,7}), 장기적으로 간 섬유화(hepatic fibrosis) 및 간암(liver cancer)로 이어질 수 있다⁸). NAFLD는 비만, 당뇨병, 고지혈증, 고혈압 등 대사증후군과 밀접한 연관성이 보고되고 있다⁹).

간 조직 내 에너지 상태를 유지하기 위한 주요 기전은 AMP-activated protein kinase (AMPK)와 sterol regulatory element-binding proteins (SREBP)로 포도당 수송, 신생 및 지방분해를 포함한 지질 대사의 중요한 조절자이다^{10,11}). AMPK의 활성화는 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 활성화를 통해 carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1)을 활성화하여 미토콘드리아로 지방산 흡수 및 산화를 촉진한다^{12,13}). SREBP의 활성화는 유리지방산(free fatty acid, FFAs) 합성을 촉진하고, 간 조직 내에서 에스터화로 인해 중성지방으로 전환 및 축적되어 NAFLD를 유발한다^{14,15}). Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)는 지방 세포 분화, 지방 생성 및 지질 대사 조절에 필수적인 역할로 인하여 NAFLD의 치료전략으로 많은 관심이 기울어져 있다^{16,17}).

마황(Ephedrae herba, EH)은 동양문화권 뿐만이 아니라 전 세계에서 교감신경 흥분물질로 수천 년간 사용되어왔다¹⁸). 한의학에서는 감기, 관절통, 천식, 발열 등의 전통적인 적응증 및 비만 치료제로 활용하고 있으며¹⁹), 비만 치료를 위한 처방에서 높은 빈도로 빈번히 사용되는 약재이다²⁰). 마황은 ephedrine, norephedrine, pseudoephedrine, norpseudoephedrine 등의 알칼로이드를 포함하고 있으며, ephedrine은 지방세포에서 SREBP1, PPAR γ 및 enhancer binding protein alpha (C/EBP α)와 같은 지방 생성 전사인자를 조절하여 지방 축적을 감소시키는 것으로 알려져 있고²¹), 교감신경을 자극하여 식욕을 저하시키고, 콜레스테롤 흡수 저해, 갈색 지방조직에서 열 발생을 촉진하여 에너지 소비 활성화 등의 작용으로 체지방과 혈중 지질을 감소시키는 것으로 알려져 있다²²). 그러나 마황의 일일 기준이상으로 과다 복용 시 교감신경 자극으로 심계항진, 고혈압, 두통, 과잉 행동, 불안, 위장 과민증 및 불면증 등과 같은 부작용으로 인하여 다른 한약재와 병용하여 부작용을 줄이는 것이 중요하다²³).

한의학에서 의이인(Coicis semen, CS)도 비만과 당뇨병 치료에 높은 빈도로 사용이 되고 있는데²⁴), 혈중 지질 감소, 항산화 효과, 혈당 조절 등의 효과가 보고되었다²⁵). Stigmasterol, sitosterol, coixol 등 비만에 효과적인 활성성분을 함유하고 있으며²⁶), 분화된 3T3-L1 세포를 이용한 연구에서 마황 추출물과 coixol의 처리는 glucocorticoid receptor에 전사 결합 활성 억제제를 통하여 세포 내 지질 축적을 감소시키고²⁷), 고지방식이를 통해 비알콜성 지방간이 유도된 쥐를 이용한 연구에서 stigmasterol 및 sitosterol은 간 내 지방 생성을 감소시켜 비만과 관련된 염증을 억제하는 효과가 보고되었다^{28,29}).

한의학에서는 약초의 상호작용이라는 개념을 처방에 활용해 왔다³⁰). 한약재 조합은 추출 과정에서 상호작용하여 추출물의 약리학적 특성과 안전성에 영향을 미칠 수 있으며³¹), 질병이나 증후군을 치료하기 위한 중요한 전략으로 간주되어 왔다. 본 연구자들은 이전 연구에서 마황과 의이인 성분과 타겟의 상관관계를 네트워크 약리학으로 분석하였고^{27,32}), 추출물을 지방전구세포에 처리하여 지방세포 분화와 지질 생합성에 미치는 효능과 기전을 확인하였다²⁷). 하지만 추출물의 비율에 따른 효능과 기전의 차이가 나타나는 이유에 대한 설명이 부족하였으며 대사 질환의 주요한 병태인 지방간에서 효능이 확인되지 않았다. 이에, 본 연구는 비만 치료에 높은 빈도로 사용되고 있는 마황과 의이인 단일 혹은 복합추출물의 특성을 분석하고 FFAs 혹은 palmitic acid (PA)로 유도된 지방간 모델에 미치는 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 마황 의이인 조합 추출물의 준비

본 연구에 사용된 마황과 의이인 추출물은 허브마을(충청북도, 한국)으로부터 구매하여 사용하였다. 마황과 의이인은 5가지 비율의 조합 S1-S5 (0:100, 25:75, 50:50, 75:25, 100:0)으로 추출하여 연구에 사용하였다. 마황 및 의이인 100 g을 95 °C의 1 L의 물에서 1시간 동안 열수추출 하였다. 상등액을 8 μ m-pore-size whatman filter paper를 사용하여 여과하고, 감압농축기(Buchi, Switzerland)에서 농축한 다음 동결건조기를 통해 건조하여 회수하였다. 분말화된 추출물은 건조물의 수율을 측정한 후 -20 °C에 보관하면서 본 실험에 사용하였다. 세포 실험 시 Dulbecco's

phosphate buffered saline (DPBS)에 녹인 후 0.22 μm syringe 필터로 여과하여 사용하였다.

또한 각 혼합 추출물(S1-S5)과 함께 단독 추출물의 혼합물(I-S2, I-S3, I-S4)을 동일한 농도로 녹인 각 추출물의 pH를 측정하고 이들 샘플의 high-performance liquid chromatography (HPLC) profile 분석을 실시하였다.

2. HPLC-DAD-UV 분석

5가지 혼합 추출물과 3가지의 단독 추출물의 혼합물은 5 mg/ml의 농도로 증류수에 희석 후 여과하여 Agilent Eclipse XDB-C18 chromatographic column (150 \times 4.6 mm, 5 μm pore size)을 이용한 HPLC system (Agilent 1260 infinity HPLC, Agilent, CA, USA)을 사용하여 분석을 수행하였다. HPLC 이동상은 A, B 용액계의 농도 gradient를 적용하여 분석하였다. 이동상 A 용액은 pure water (HPLC grade)에 0.05% formic acid를 첨가한 수용액이었고, B 용액은 100% acetonitrile을 사용하였으며 모든 용매는 사용 전 필터로 여과 후 사용하였다. 칼럼의 유속은 1.0 ml/min이었으며 분석 시간은 0분에서 5분까지 이동상 A를 95%, 5분에서 25분까지 50%, 25분에서 45분까지 0%, 45분에서 50분까지 95%, 50분에서 55분까지 95%로 용리하였고, 시료 주입은 2 μl 를 주입하고, 칼럼의 온도는 25 $^{\circ}\text{C}$ 설정하고, UV detector는 275 nm 파장으로 설정하였다.

3. 세포주의 계대 및 배양

인간 간암 세포주(human hepatocellular carcinoma cell line)인 HepG2 세포는 한국세포주 은행(Korea cell line bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. HepG2 세포는 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

4. 세포 독성 측정

세포 독성 평가는 Ez-Cytox kit (Daeil Lab, Seoul, Korea)을 사용하여 제조사가 권장하는 방법에 따라 측정하였다. HepG2 세포를 96 well cell culture plate에 FBS를 함유한 DMEM 배지를 이용하여 최종농도가 4×10^4 cells/well가 되도록 분주하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 배양하고, 추출물을 25, 50, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 이후, EZ-Cytox 시약 10

μl 를 넣고 1시간 동안 배양한 다음 microplate spectrophotometer (VersaMax, Molecular Devices, CA, USA) 장비로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 확인하였다.

5. Oil Red O 염색

HepG2 세포에서 추출물의 지질 축적 억제 효과를 분석하기 위해 Oil Red O reagent (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)을 이용한 염색법을 사용하였다. HepG2 세포를 최종농도 4×10^5 cells/well로 6 well cell culture plate에 분주하여 24시간 배양하고, 배지를 1% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 serum-free DMEM 배지로 갈아준 후 추출물을 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 1 mM FFAs (0.66 mM oleic acid+0.33 mM PA)과 함께 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 세포를 DPBS로 세척한 후 5% formalin 용액으로 30분간 고정하고, DPBS로 3회 세척하고, 60% isopropanol로 세척한 후 건조하였다. 미리 준비한 Oil Red O 염색 시약으로 세포 내 지질을 15분간 염색하고 세척 및 건조시킨 후, 현미경을 통해 관찰하여 이미지를 획득하였고, 100% isopropanol을 사용하여 지질에 염색된 염료를 용해한 후 520 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 확인하였다.

6. 중성지방 및 총콜레스테롤 측정

HepG2 세포에서 추출물이 세포 내 콜레스테롤에 미치는 효과를 분석하기 위해 아산제약 triglyceride 및 total cholesterol kit를 구입하여 사용하였다. 세포를 최종농도 4×10^5 cells/well로 6 well cell culture plate에 분주하여 24시간 배양하고, 배지를 1% BSA를 함유한 serum-free DMEM 배지에 결합한 1 mM FFAs에 24시간 동안 배양하고, 추출물은 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 48시간 동안 처리하였다. Folch 방법에 따라 2:1 비율의 chloroform, methanol 300 μl 를 각 well에 첨가하여 수확하고, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 분리하고, 클로로포름 층을 새로운 tube에 옮긴 후 실온에서 건조하였다. 건조된 지질 추출물을 50 μl isopropanol에 재용해시킨 후, triglyceride/total cholesterol assay kit로 제조사가 권장하는 표준 실험법에 따라 측정하였다.

7. Western blot

HepG2 세포에서 EH-CS에 의한 지질대사와 관련된 단

백질의 발현 수준을 비교하기 위해 western blot을 실시하였다. 세포를 100 mm cell culture plate에 분주하여 24시간 배양하고, 1% BSA을 함유한 serum-free DMEM 배지로 교환한 후에 추출물을 50 µg/ml 농도로 1 mM FFAs와 함께 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 처리가 완료된 세포를 DPBS로 세척하고 protease and phosphatase inhibitor cocktail (GenDEPOT, Barker, TX, USA)을 첨가한 RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 단백질을 용출시킨 후에 BCA kit (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 단백질 정량을 수행하였다. 동량의 단백질(30 µg)을 10% SDS-PAGE gel을 이용하여 크기 별로 분리한 후 polyvinylidene difluoride membrane에 전이하였다. 이후 Tween 20을 0.1% 함유한 tris-buffered saline (TBS-T)로 3회 세척하고, 5% BSA에 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체를 1:500~1,000의 비율로 3% BSA에 희석하여 membrane에 처리하여 4 °C에서 밤새 반응시킨 후 TBS-T를 이용하여 10분간 3회 세척을 하였다. 2차 항체는 1:2,000~4,000의 비율로 1% BSA에 희석하여 사용하였고, 2시간동안 반응시키고 3회 세척하였다. ECL buffer (Super Signal West Pico, Thermo Fisher Scientific)을 처리하고 Fusion Solo (Vilber Lourmat, Collegien, France) 이용하여 단백질 발현을 확인하였다. 1차 항체 P-AMPK, AMPK, P-ACC, CPT1 α , SREBP1, PPAR γ , C/EBP α 는 Cell Signaling Technology (Berkeley, CA, USA) 제품을 사용하였고, β -actin 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 사용하였다.

8. 당 흡수능 측정 실험

HepG2 세포에서 2-NBDG 시약을 이용하여 직접적인 세포 내로의 포도당 흡수를 측정하였다. 세포를 96 well black plate (Greiner, Austria)에 FBS를 함유한 DMEM 배지를 이용하여 최종농도가 1×10^4 cells/well가 되도록 분주하여 24시간 배양하고, 배지를 PA 250 µM을 함유한 serum-free DMEM 배지로 갈아준 후 24시간 배양한 후 5가지 추출물을 50 µg/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 DPBS를 이용하여 2회 세척하고 2-NBDG (100 µg/ml)가 포함된 glucose-free DMEM 배지로 교체 후 37 °C에서 30분간 인큐베이터에서 배양하고, DPBS로 세척한 후 fluorescence microplate reader (Spectra Gemini, Molecular Devices, CA, USA)를 이용하

여 Ex/Em=485/545 nm 파장에서 형광 광도를 측정하여 결과를 확인하였다.

9. 형광 유세포 분석

2-NBDG 시약을 처리한 HepG2 세포를 유세포 분석기를 이용하여 포도당 흡수 정도가 높은 세포의 비율을 측정하였다. 세포를 cell culture plate에 FBS를 함유한 DMEM 배지에서 최종 농도가 1×10^4 cells/well가 되도록 분주하여 24시간 배양하고, 배지를 PA 250 µM을 함유한 serum-free DMEM 배지로 갈아준 후 24시간 배양한 후 5가지 추출물을 50 µg/ml 농도로 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 DPBS를 이용하여 2회 세척하고 2-NBDG (100 µg/ml)가 포함된 glucose-free DMEM 배지로 교체 후 37 °C에서 30분간 인큐베이터에서 배양하고, DPBS로 세척하여 2-NBDG 흡수 반응을 중단하였다. 세포를 trypsin으로 탈락시킨 뒤 유세포 분석을 위해 4 °C에서 유지하였다. 각 측정에 대해 CytoFLEX Flow cytometer (BeckmanCoulter, IN, USA) 유세포 분석기를 사용하여 10,000개의 단일 세포 이벤트에서 데이터를 수집하였다.

10. 통계처리

실험의 모든 데이터는 평균값과 표준편차 값의 차이 (mean \pm deviation)로 나타내었고, GraphPad Prism version 5.0 (La Jolla, CA, USA)를 이용하여 각 군별 결과의 유의성을 one-way analysis of variance에 의해 판단하였으며 P 값이 0.05 미만일 경우를 기준으로 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과

1. 마황과 의이인 비율에 따른 추출물 수율과 특성 비교

마황과 의이인 비율에 따른 5가지 열수 추출물의 수율은 S4, S3, S5, S2, S1 순으로 높게 나타났다(Fig. 1A). S1의 수율은 4.5%, S5의 수율은 8.9%인데 반해 S4의 수율은 11.1%로 마황 단독 추출물(S5)에 비해 수율이 높게 측정되었다.

또한 각 비율의 혼합 추출물과 개별 추출물의 혼합 샘플의 pH를 측정 및 비교하였을 때, 의이인의 단독 추출물의 pH는 6.32로 가장 높았고, 마황의 비율이 높아짐에 따

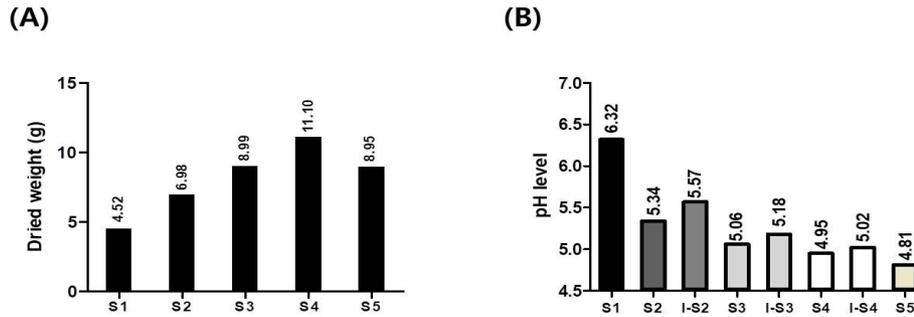


Fig. 1. Characteristics of EH-CS extracts by different combination ratios. (A) The extraction yields of combination extracts of different EH-CS ratios. (B) pH measurements of water-eluted EH-CS extracts. I-S2, I-S3, I-S4 indicates that the samples were prepared by mixing sole EH extract and CS extract after their extraction process with same EH-CS ratios for comparison. EH: Ephedrae herba, CS: Coicis semen, I-S: mixed sample of individual extracts.

라 pH가 의존적으로 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. 1B). 한편, 마황과 의이인 개별 추출물의 혼합 샘플(I-S2, I-S3, I-S4)에서는 같은 마황-의이인 비율의 혼합 추출물에 비해 pH 결과가 높게 나타난 결과를 확인하였다(Fig. 1B).

2. 마황과 의이인 혼합 추출물과 개별 추출물의 혼합 샘플의 HPLC 프로파일 분석

마황과 의이인 혼합 추출물(S1-S5)과 개별 추출물의 혼합(I-S2, I-S3, I-S4)의 동일 조건 HPLC 분석 결과는 Fig. 2A와 같이 나타났다. 소수의 의이인 유래 물질 peak (RT: 4.038, 20.039)와 다수의 마황 유래 물질 peak (RT 12~20 min 사이에 검출)를 확인할 수 있었다.

이 때, 마황 유래 물질의 peak area는 마황의 비율 증가(S1에서 S5로 갈수록)에 따라 증가하였으나, 그 증가 폭은 줄어들어 S4와 S5에서 특히 큰 차이가 나지 않았다(Fig. 2). 또한 동일한 마황-의이인 비율별 추출물에서, 혼합 추출물과 개별 추출물의 혼합 샘플끼리(S2와 I-S2, S3와 I-S3, S4와 I-S4) peak area를 세밀하게 비교하였을 때, 혼합 추출물에 비해, 개별 추출물의 혼합 샘플에서 peak area가 낮게 나타나는 일정한 현상을 확인할 수 있었다(Fig. 2). Fig. 2에서 대표적으로 제시한 물질 peak 6종 이외에도 구분이 가능한 다른 peak area의 분석 시에도 유사한 결과를 확인하였다.

3. 마황과 의이인 추출물이 HepG2 세포생존율에 미치는 영향

세포 독성 시험 결과, 의이인의 비율이 높은 추출물에

서 상대적으로 세포 독성이 낮은 것을 확인하였고, S5 샘플(마황 100%)의 100 µg/ml 농도 처리는 세포생존율을 82%로 급격하게 감소시켰다. 반면에 S1 처리는 1000 µg/ml의 고농도에서도 88%의 높은 세포생존율을 보였다. 따라서 본 세포실험에서 수행할 시료의 농도를 모든 추출물에서 세포독성이 나타나지 않는 50 µg/ml 농도로 설정하여 연구를 진행하였다(Fig. 3A).

4. 마황과 의이인 복합 추출물이 지방간 모델의 세포 지질 축적에 미치는 영향

FFAs를 처리한 세포는 처리하지 않은 세포에 비해 약 30% 증가한 지질 축적을 확인하였다(Fig. 3B, C). 마황의 비율이 높아질수록 세포 내 지질 축적이 감소되었고, 50 µg/ml 농도의 S5 처리는 지질 축적을 23% 감소시켰다. 결과적으로 의이인 단독 추출물인 S1을 제외하고 지질의 유의미한 감소를 확인하였다.

5. 마황과 의이인 추출물이 triglyceride 및 total cholesterol에 미치는 영향

FFAs를 처리한 세포는 세포 내 triglyceride 및 total cholesterol 축적이 유의미하게 증가하였다. 한편 S3, S4를 처리한 그룹에서 대조군에 비해 triglyceride의 유의한 감소를 보였고(Fig. 4A), total cholesterol은 S1 처리에서 가장 낮았으나, 대조군에 비해 유의미한 감소는 관찰되지 않았다(Fig. 4B).

6. 마황과 의이인 추출물이 포도당 흡수에 미치는 영향

형광 마이크로플레이트 형광 값 분석 및 형광 유세포 분석을 이용한 연구결과에서 PA로 유도된 세포는 처리되지 않은 대조군 세포에 비해 각 18% 및 19%의 당 흡수의 감소를 나타내었다. 먼저 형광 강도를 이용한 분석에서 S2, S3, S4 처리에서 유의미한 당흡수능의 증가 효능을 관찰하였고, S2 처리군은 PA 유도군과 비교하여 약 33% 유의미하게 증가하였다(Fig. 5A). 형광 유세포 분석에서는 일정 기준의 형광 강도를 넘은 세포의 비율을 카운트하였는데, S1 처리군을 제외한 모든 처리군에서 당 흡수 세포

비율의 유의미한 증가를 보였는데, S3 처리군은 PA 유도군과 비교하여 약 45%로 가장 높은 증가를 보였으며 S2 처리군은 약 34% 증가시키는 것을 확인하였다(Fig. 5B).

7. 마황과 의이인 추출물의 지질 대사와 관련한 신호에 미치는 영향

마황과 의이인이 지질 대사와 관련된 단백질 발현을 조절하는지 확인하기 위해 대사 관련 핵심인자인 AMPK와 ACC의 인산화와 지방 합성과 관련된 CPT1 α , SREBP1, PPAR γ 및 C/EBP α 발현을 western blot으로 분석하였다.

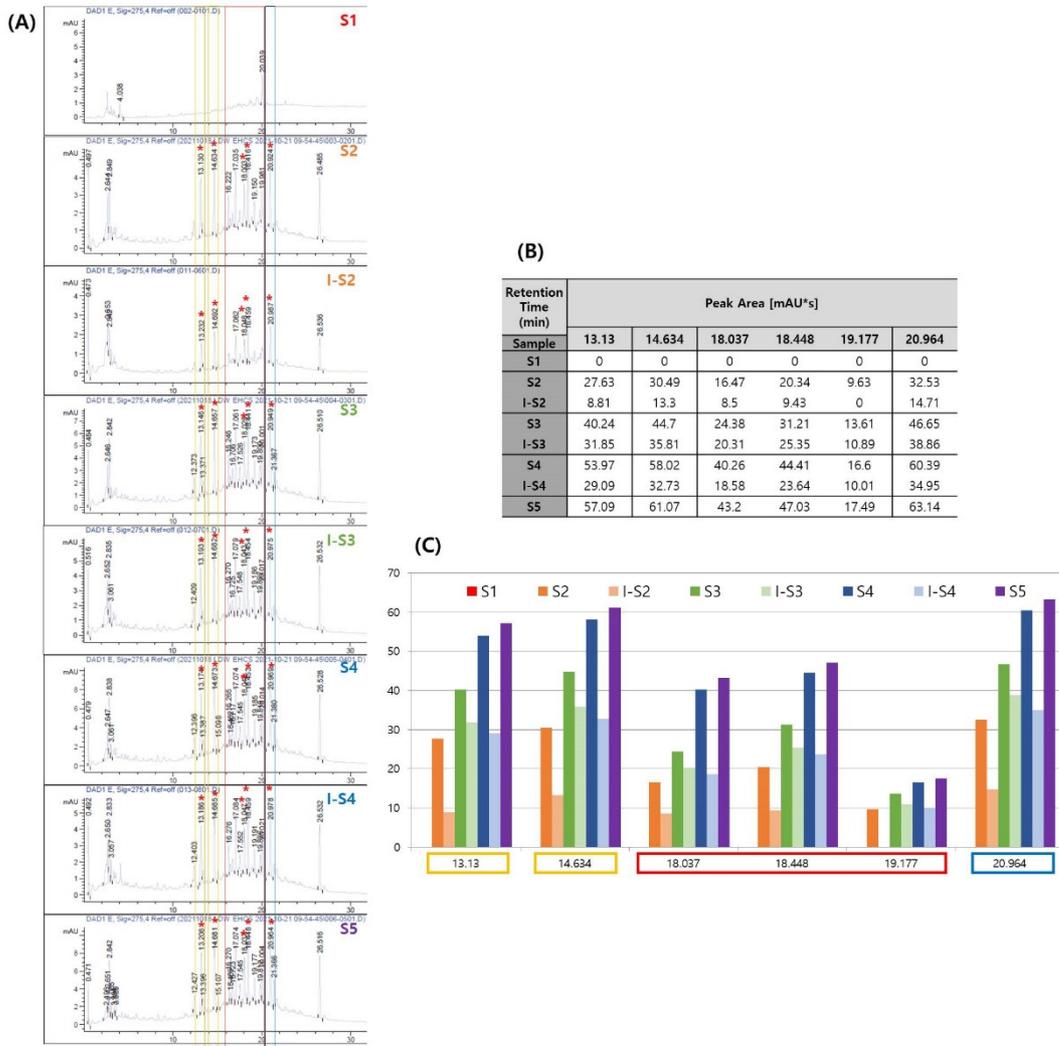


Fig. 2. HPLC profile and peak analysis of EH-CS extracts. (A) HPLC analysis of all EH-CS extracts by different ratios. (B) Results of some peak areas of EH-derived compound peaks. (C) Bar chart of peak area results for comparison. I-S2, I-S3, I-S4 indicates that the samples were prepared by mixing sole EH extract and CS extract after their extraction process with same EH-CS ratios for comparison. HPLC: high-performance liquid chromatography, EH: Ephedrae herba, CS: Coicis semen, I-S: mixed sample of individual extracts.

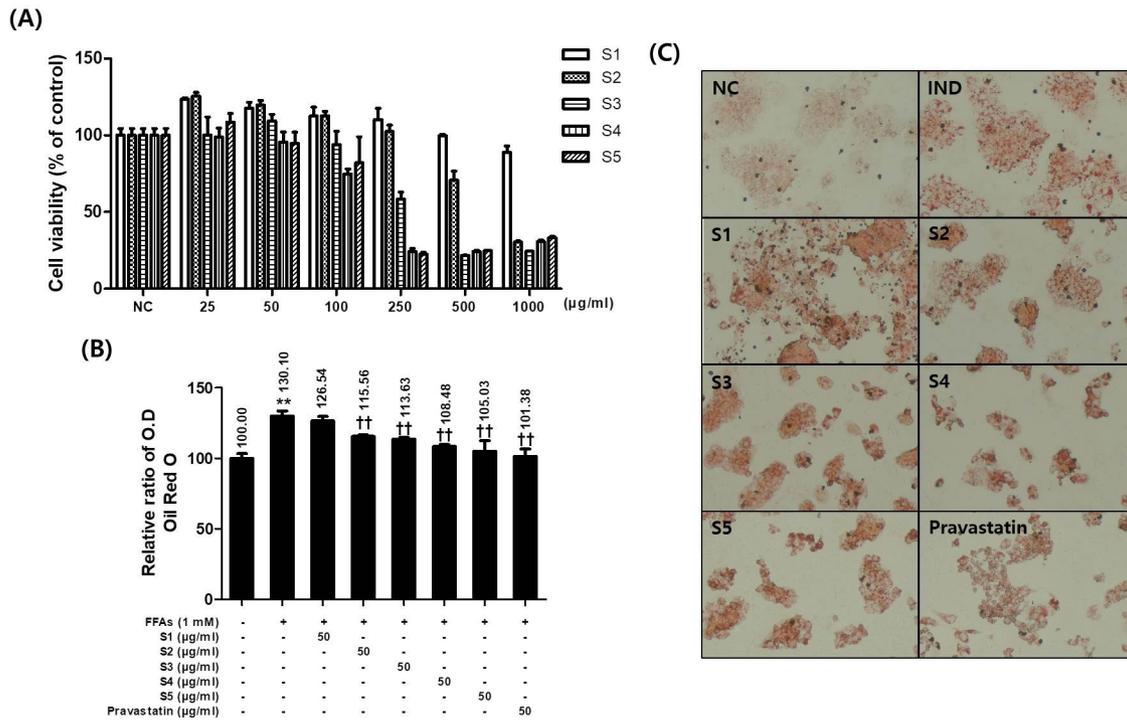


Fig. 3. Effects of EH-CS combination on HepG2 cells. (A) Effect of EH-CS combinations on HepG2 cell viability. HepG2 cells were incubated with different concentration of 5 ratios of EH-CS extracts (0–1,000 µg/ml) for 24 h. (B) Effect of EH-CS combinations on lipid accumulation in FFAs-treated HepG2 cells determined with Oil Red O staining. HepG2 cells were co-treated with FFAs (1 mM) and EH-CS extracts for 48 h. Results are the means±SDs of three independent experiments. (C) Microscopic images of ORO-stained HepG2 cells by treatment EH-CS extracts (x200). EH: Ephedrae herba, CS: Coicis semen, FFAs: free fatty acids, SD: standard deviation, ORO: Oil-Red O, NC: negative control, IND: FFAs-induced control. **P<0.01 vs. FFAs-untreated controls and ††P<0.01 vs. FFAs-treated control.

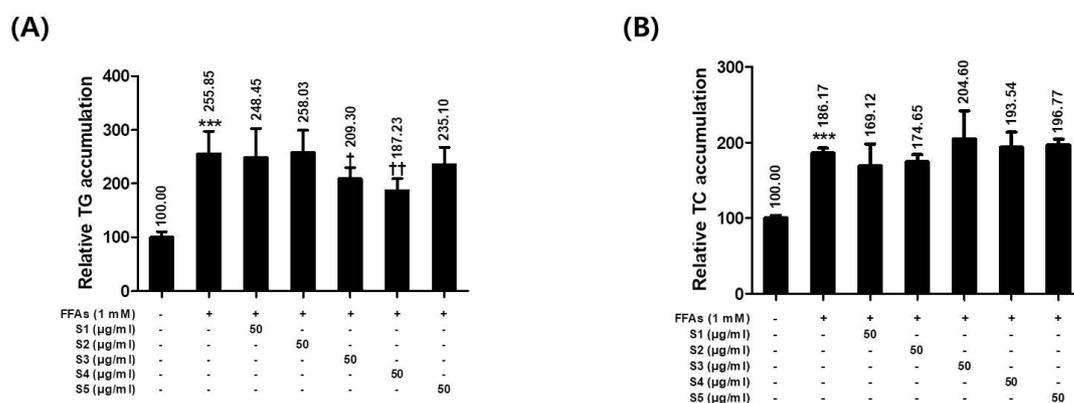


Fig. 4. Effects of EH-CS combinations on intracellular TG and TC contents. (A) Relative TG contents, (B) relative TC contents in HepG2 cells. Intracellular TG and TC contents were measured as described in Materials and Methods. HepG2 cells were co-treated with FFAs (1 mM) and EH-CS extracts for 48 h. Results are the means±SDs of three independent experiments. EH: Ephedrae herba, CS: Coicis semen, TG: triglycerides, TC: total cholesterol, FFAs: free fatty acids, SD: standard deviation. ***P<0.001 vs. FFAs-untreated controls and †P<0.05, ††P<0.01 vs FFAs-treated control.

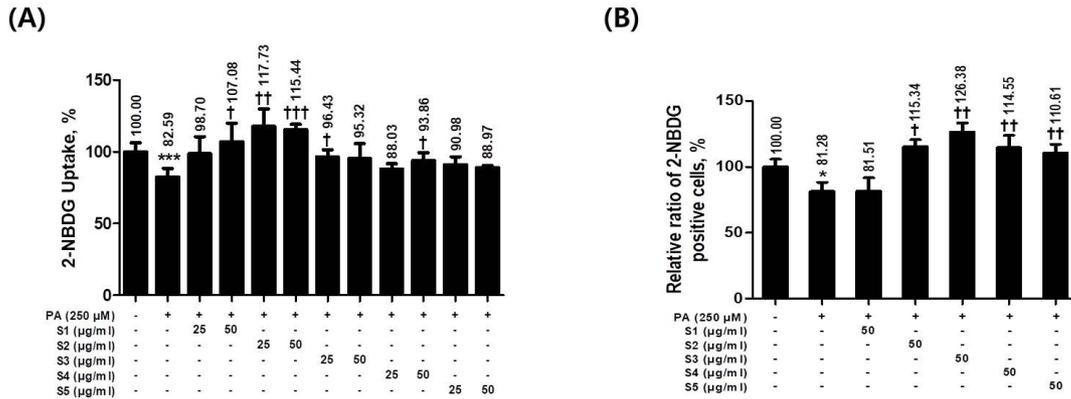


Fig. 5. Effects of EH-CS combinations on intracellular glucose uptake in PA-induced HepG2 cells. (A) Glucose uptake assay using 2-NBDG fluorescence, (B) flow cytometric analysis of 2-NBDG positive cells. HepG2 cells were co-treated with PA (250 μM) and EH-CS extracts for 24 h. Results are the means±SDs of three independent experiments. EH: Ephedrae herba, CS: Coicis semen, PA: palmitic acid, SD: standard deviation. ***P<0.001 vs. PA-untreated controls and †P<0.05, ††P<0.01 vs. PA-treated control.

FFAs를 처리한 그룹에서 P-AMPK의 발현이 감소하였으며, S2 처리군에서 P-AMPK와 함께 P-ACC의 발현이 증가하였다. 반면, S3와 S4 처리군에서 S2 처리군보다 높은 P-ACC의 발현을 확인하였다. 마황의 비율이 높은 처리군에서 CPT1α의 발현이 증가하는 것을 관찰하였으며, 지질 생합성과 관련된 SREBP1, PPARγ 및 C/EBPα에서도 마황의 비율이 높은 샘플의 처리군에서 더욱 높은 발현 감소를 확인하였다(Fig. 6).

고찰

본 연구에서는 한의학 비만 처방에 높은 빈도로 사용되어 온 두 약재를 5가지 비율별 조합으로 추출하여, HepG2 세포를 이용한 NAFLD모델에서 지질 축적과 포도당 흡수에 미치는 영향을 평가하였으며, 추출물의 분석을 통해 마황과 의이인의 복합추출물 활용으로 인한 이점이 있는지 확인하고자 하였다. 이미 앞서 수행된 마황 의이인 조합과 감비환 처방의 연구 결과들과 종합하여 분석할 때, 본 *in vitro* 연구 결과는 마황-의이인 조합이 갖는 당 흡수능 및 지질 축적에 대한 역방향의 연구 결과로 그 중요도와 임상적 재현성이 기대된다.

NAFLD는 비만, 고지질혈증, 제2형 당뇨병을 비롯한 여러 인슐린 저항성 질환과 밀접하게 관련이 있다³³⁾. 세포 내 과다한 중성지방 수준은 산화적 스트레스를 일으켜 인슐린 신호 전달을 억제하여 인슐린 저항성을 유도한다

³⁴⁾. PA를 처리한 HepG2 세포에서 낮아진 포도당 흡수능은 의이인이 포함된 S2, S3 처리에서 유의하게 회복되는 것을 확인하였다. 인슐린 저항성과 관련하여 추가적인 분자적 기전 및 효능연구가 필요하나, 마황과 의이인을 함께 사용함으로써 인슐린 저항성을 개선할 수 있을 것으로 보인다.

지방간이 유도된 HepG2 세포에서 AMPK, ACC, CPT1α, SREBP1, PPARγ 및 C/EBPα 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하여 복합 추출물과 단독 추출물의 성능을 비교하였다. S2에서 AMPK와 ACC의 인산화가 증가한 결과를 확인하여, 이전의 지방전구세포를 사용한 연구 결과(S3, S5에서 유의미한 AMPK 인산화)와는 차이가 있음을 확인하였다. 한편 마황의 비율이 높아질수록 PPARγ, SREBP1 및 C/EBPα의 단백질 발현이 감소하였다. 이 결과는 앞선 연구의 *real-time quantitative PCR*을 통한 지방생합성 마커의 유전자 발현 연구결과(SREBF1, PPARγ gene 발현이 S5에서 가장 억제)와 동일하였다³²⁾. 마황 단독 추출물(S5)에 비해 상대적으로 부족함에도 불구하고, 마황-의이인 혼합 추출물은 여러 지질 생합성 마커의 억제에서 뛰어난 효능을 나타내었다. 특히 에너지 대사의 핵심 조절 인자인 인산화 AMPK의 정도는 S3에서 S5와 비슷한 정도로 활성화된 것을 확인할 수 있었다. 이로써 수많은 AMPK의 하위 시그널의 조절을 통해 마황-의이인 1:1 조합 추출물(S3)이 다른 샘플에 비해 상대적으로 뛰어난 가능성이 있다.

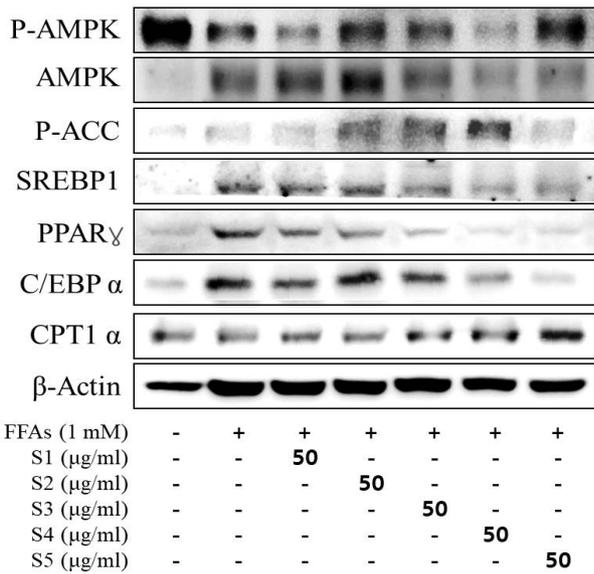


Fig. 6. Effects of EH-CS combinations on adipogenesis-related proteins in FFAs-treated HepG2 cells. The phosphorylation levels of AMPK and ACC and SREBP1, PPAR γ , C/EBP α and CPT1 α protein expression levels in FFAs-treated HepG2 cells were immunoblotted and analyzed. HepG2 cells were treated with FFAs (1 mM) for 24 h and followed by treatment of EH-CS extracts for 48 h before protein extraction. EH: Ephedrae herba, CS: Coicis semen, FFAs: free fatty acids, AMPK: AMP-activated protein kinase, ACC: acetyl-CoA carboxylase, SREBP1: sterol regulatory element-binding protein 1, PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma, C/EBP α : CCAAT enhancer binding protein alpha, CPT1 α : carnitine palmitoyltransferase 1 alpha.

한편 세포 내 triglyceride는 S4 처리에서 가장 큰 감소를 보였는데, 이는 지질생합성 마커들이 S5에서 가장 뚜렷한 감소를 보인 결과와 그에 앞선 Oil Red O 염색결과상 마황의 비율에 의존적으로 중성지방이 감소한 결과와 완전히 일치하지는 않았다. 이는 이전 연구의 결과와 유사한데, 이전 연구에서는 마황 고비율의 샘플이 지방전구 세포의 독성범위 이내의 농도에서 염증성 사이토카인의 분비를 증가시키는 것과 연관을 지어 해석하였다³². 당 흡수능을 확인하기 위한 두 다른 실험 방식에서 도출된, 동일 샘플의 농도별 효능의 불일치에 대해서는 flow cytometry 분석의 positive event cell의 낮은 cutoff 기준 등 실험의 세부 조건과 아직 밝혀지지 않은 의이인의 기전이 영향을 미쳤을 수 있다.

마황-의이인 비율별 추출물을 이용한 연구에서, 위에서 언급하여 비교한 바와 같이 시험 모델의 세포 종류(지방간 모델, 분화 지방 세포)에 따라서 또는 약리 활성의 종

류(지질 생합성 또는 당흡수능)에 따라서 결과가 상이하게 나타났다. 이는 마황-의이인 추출물의 제형 연구에서, 두 약제 간 비율 선택에 더욱 신중해야 하는 것을 의미한다. 특히, 지질 생합성 억제와 체중 감소만을 목적으로 처방에서 마황의 처방 내 비율을 증가시키는 것이 환자의 다른 대사 기전에 미치는 영향도 고려되어야 할 것으로 생각된다. 특히 두 약제의 배합이 동일 효능의 단순 합이 아니라 다른 효과와 기전 상의 단계적 결합으로 해석될 가능성이 있다. 이러한 활성을 확인하기 위해서 *in vivo*에서 비율별 추출물의 투여 후 다양한 기전의 마커와 효능을 확인하는 연구가 필요하다.

마황에 포함된 ephedrine은 과다 복용 시 간에 손상을 초래할 수 있다고 알려져 있고^{35,36}, 간 조직 내 면역세포를 활성화하여 interleukin-8, macrophage colony-stimulating factor와 같은 염증성 사이토카인을 증가시킨다는 보고가 있다³⁷. 임상사례에 관한 연구문헌에서는 마황을 장기간 사용하거나, 다른 약물과 함께 사용하는 경우에 독성과 관련성이 증가한다는 보고가 있다³⁸. 실제로 의이인의 비율보다 마황의 비율이 높은 추출물에서 HepG2 세포의 낮은 세포생존율을 보였다. 반대로, 의이인과 혼합된 추출물은 같은 농도에서 마황 단독 추출물과 비슷한 효능을 내면서도 낮은 세포독성을 나타내므로, 50 μg/ml 이상의 높은 농도의 추출물 처리 시 더욱 뛰어난 효능을 나타낼 수 있을 것으로 예상된다.

천연물을 이용한 연구에서 추출 시 용매, 온도, pH 등의 조건에 따라 추출물의 수율 및 성분은 다르게 나타날 수 있다³⁹. 마황과 의이인을 동시에 구성약재로 가지는 여러 항비만 처방의 구성에서 의이인의 비율이 높음이 보고되기도 하였다³². 마황과 의이인의 비율별 추출물의 수율과 pH, HPLC peak area에 대한 결과를 종합 고려해 볼 때, 마황과 의이인의 복합추출방식은 마황의 성분 용출을 용이하게 하고, 이를 통해 저함량의 마황이 포함된 처방에서 부작용 없이 충분한 효능을 나타내는 것으로 추정해 보았다.

본 연구는 항비만 효능으로 임상적 근거를 가진 마황과 의이인 조합을 *in vitro* 지방간 모델 실험과 천연물 분석 기법을 통해 연구하였다. 이상과 같이 마황-의이인의 조합 추출물은 지방간 모델에서 마황 단독 추출물에 비해 세포 독성은 낮고 효능이 유사하거나 뛰어난 효과를 보이므로 추가적인 연구를 통하여 마황과 의이인 조합이 대사

질환에서 효율적인 처방 활용이 가능할 것으로 생각된다.

결론

비만 처방에 높은 빈도로 사용되는 마황과 의이인 조합 추출물이 비알콜성 지방간에 미치는 영향을 평가하였다. 본 연구결과에 따르면 마황과 의이인 조합 추출물은 마황 단독 추출물에 비해 수율이 높고, 마황의 강력한 지질 축적 억제 효과를 유지하고 당 흡수능을 더욱 증가시키며 세포독성을 낮추어 활용성을 높일 수 있는 것으로 보인다. 마황과 의이인 조합 추출물이 단독 추출물에 비해 뛰어난 효능과 안전성을 나타낼 수 있으므로 이에 대한 추가 연구가 필요하다.

감사의 글

이 논문은 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2021R1A6A3A01086718).

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

1. Zhang L, Yao Z, Ji G. Herbal extracts and natural products in alleviating non-alcoholic fatty liver disease via activating autophagy. *Front Pharmacol.* 2018 ; 9: 1459.
2. Zhang P, Wang W, Mao M, Gao R, Shi W, Li D, et al. Similarities and differences: a comparative review of the molecular mechanisms and effectors of NAFLD and AFLD. *Front Physiol.* 2021 ; 12 : 710285.
3. Lee GH, Peng C, Park SA, Hoang TH, Lee HY, Kim J, et al. Citrus peel extract ameliorates high-fat diet-induced NAFLD via activation of ampk signaling. *Nutrients.* 2020 ; 12(3) : 673.
4. Ren SM, Zhang QZ, Chen ML, Jiang M, Zhou Y, Xu XJ, et al. Anti-NAFLD effect of defatted walnut powder extract in high fat diet-induced C57BL/6 mice by

- modulating the gut microbiota. *J Ethnopharmacol.* 2021 ; 270 : 113814.
5. Ma LL, Yuan YY, Zhao M, Zhou XR, Jehangir T, Wang FY, et al. Mori cortex extract ameliorates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and insulin resistance in high-fat-diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Chin J Nat Med.* 2018 ; 16(6) : 411-7.
6. Barghchi H, Milkarizi N, Belyani S, Norouzi Ostad A, Askari VR, Rajabzadeh F, et al. Pomegranate (*Punica granatum L.*) peel extract ameliorates metabolic syndrome risk factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized double-blind clinical trial. *Nutr J.* 2023 ; 22(1) : 40.
7. Park DB. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2010 ; 15(2) : 77-84.
8. Ziamajidi N, Khaghani S, Hassanzadeh G, Vardasbi S, Ahmadian S, Nowrouzi A, et al. Amelioration by chicory seed extract of diabetes- and oleic acid-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) via modulation of PPAR α and SREBP-1. *Food Chem Toxicol.* 2013 ; 58 : 198-209.
9. Cao Y, Fang X, Sun M, Zhang Y, Shan M, Lan X, et al. Preventive and therapeutic effects of natural products and herbal extracts on nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Phytother Res.* 2023 ; 37(9) : 3867-97.
10. Yang Y, Wu Y, Zou J, Wang YH, Xu MX, Huang W, et al. Naringenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease by enhancing energy expenditure and regulating autophagy via AMPK. *Front Pharmacol.* 2021 ; 12 : 687095.
11. Smith BK, Marcinko K, Desjardins EM, Lally JS, Ford RJ, Steinberg GR. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016 ; 311(4) : E730-40.
12. Lee YI, Lee HJ, Pyo SJ, Park YH, Lee MM, Sohn HY, et al. Protective effect of *rubus crataegifolius* extracts against obesity and non-alcoholic fatty liver disease via promotion of AMPK/ACC/CPT-1 pathway in HFD-induced C57BL/6J obese mice. *J Life Sci.* 2023 ; 33(12) : 967-77.
13. Ma K, Sheng W, Gao R, Feng J, Huang W, Cui L, et

- al. Ethanolic extract of root from *arctium lappa* L ameliorates obesity and hepatic steatosis in rats by regulating the AMPK/ACC/CPT-1 pathway. *J Food Biochem.* 2022 ; 46(12) : e14455.
14. Chen Q, Liu M, Yu H, Li J, Wang S, Zhang Y, et al. *Scutellaria baicalensis* regulates ffa metabolism to ameliorate NAFLD through the AMPK-mediated SREBP signaling pathway. *J Nat Med.* 2018 ; 72(3) : 655-66.
 15. Saleh Al-Maamari JN, Rahmadi M, Panggono SM, Prameswari DA, Pratiwi ED, Ardianto C, et al. The effects of quercetin on the expression of SREBP-1c mRNA in high-fat diet-induced NAFLD in mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2021 ; 32(4) : 637-44.
 16. Feng X, Yu W, Li X, Zhou F, Zhang W, Shen Q, et al. Apigenin, a modulator of PPAR γ , attenuates HFD-induced NAFLD by regulating hepatocyte lipid metabolism and oxidative stress via Nrf2 activation. *Biochem Pharmacol.* 2017 ; 136 : 136-49.
 17. Tutunchi H, Ostadrahimi A, Saghafi-Asl M, Maleki V. The effects of oleoylethanolamide, an endogenous PPAR- α agonist, on risk factors for NAFLD: a systematic review. *Obes Rev.* 2019 ; 20(7) : 1057-69.
 18. Zheng Q, Mu X, Pan S, Luan R, Zhao P. Ephedrae herba: a comprehensive review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *J Ethnopharmacol.* 2023 ; 307 : 116153.
 19. Kim HJ, Park JM, Kim JA, Ko BP. Effect of herbal Ephedra sinica and Evodia rutaecarpa on body composition and resting metabolic rate: a randomized, double-blind clinical trial in Korean premenopausal women. *J Acupunct Meridian Stud.* 2008 ; 1(2) : 128-38.
 20. Kim SJ, Seo YH, Lee HS, Chang HK, Cho JH, Kim KW, et al. Research trends of herbal medicines for obesity: mainly since 2015 to 2019. *J Korean Med Rehabil.* 2020 ; 30(4) : 89-103.
 21. Munafò A, Frara S, Perico N, Di Mauro R, Cortinovis M, Burgaletto C, et al. In search of an ideal drug for safer treatment of obesity: the false promise of pseudoephedrine. *Rev Endocr Metab Disord.* 2021 ; 22(4) : 1013-25.
 22. Soni MG, Carabin IG, Griffiths JC, Burdock GA. Safety of ephedra: lessons learned. *Toxicol Lett.* 2004 ; 150(1) : 97-110.
 23. Lee E, Yoon SH, Kim H, Kim YD, Leem J, Park J. Ephedrae herba in combination with herbal medicine (Zhizichi decoction and Phellodendri Cortex) for weight reduction: a case series. *Integr Med Res.* 2020 ; 9(2) : 100408.
 24. Song YK, Cha YY, Ko SG. Analysis of the obesity-related research for each constituent herb of Euiiin-tang. *J Korean Med Obes Res.* 2014 ; 14(2) : 72-9.
 25. Zhao L, Rao S, Zhu X, Liu S, Tao Q, Yang X, et al. Coicis Semen formula treating monosodium glutamate-induced obesity in mice by alleviating hypothalamic injury. *Food Agric Immunol.* 2020 ; 31(1) : 84-99.
 26. Trinh TA, Park SC, Oh J, Kim CE, Kang KS, Yoo HS, et al. Preventive effect and safety of a follicle stimulating hormone inhibitory formulation containing a mixture of Coicis Semen and Artemisia capillaris for precocious puberty: a preliminary experimental study using female rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017 ; 2017 : 2906014.
 27. Yu GR, Kim JE, Lim DW, Park WH. The combination of Ephedrae herba and coixol from Coicis semen attenuate adiposity via glucocorticoid receptor regulation. *Sci Rep.* 2023 ; 13(1) : 20324.
 28. Feng S, Dai Z, Liu AB, Huang J, Narsipur N, Guo G, et al. Intake of stigmasterol and β -sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018 ; 1863(10) : 1274-84.
 29. Feng S, Gan L, Yang CS, Liu AB, Lu W, Shao P, et al. Effects of stigmasterol and β -sitosterol on non-alcoholic fatty liver disease in a mouse model: a lipidomic analysis. *J Agric Food Chem.* 2018 ; 66(13) : 3417-25.
 30. Lee J, Jeon J, Choi C. Systematic network analysis of herb formula in traditional East Asian medicine discloses synergistic operation of medicinal herb pairs with statistical significance. *CellMed.* 2015 ; 5(2) : e11.
 31. Ahn BM. Medicinal herbs and toxic hepatitis. *J Korean Med Assoc.* 2005 ; 48(4) : 318-24.
 32. Lim DW, Yu GR, Kim JE, Park WH. Network pharmacology predicts combinational effect of novel herbal pair consist of Ephedrae herba and Coicis semen on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *PLoS One.* 2023 ; 18(3)

- : e0282875.
33. Fujii H, Kawada N, Japan Study Group of Nafld Jsg-Nafld. The role of insulin resistance and diabetes in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2020 ; 21(11) : 3863.
 34. Zhou X, Wang LL, Tang WJ, Tang B. Astragaloside IV inhibits protein tyrosine phosphatase 1B and improves insulin resistance in insulin-resistant HepG2 cells and triglyceride accumulation in oleic acid (OA)-treated HepG2 cells. *J Ethnopharmacol.* 2021 ; 268 : 113556.
 35. Zheng E, Navarro V. Liver injury due to herbal and dietary supplements: a review of individual ingredients. *Clin Liver Dis (Hoboken).* 2016 ; 7(4) : 80-3.
 36. Willson C. Sympathomimetic amine compounds and hepatotoxicity: not all are alike-key distinctions noted in a short review. *Toxicol Rep.* 2018 ; 6 : 26-33.
 37. Jang IS, Yang CS, Lee SD, Han CH. A review on herbal medicinal products associated with toxic events in Korea: mistake and true. *Korean J Orient Int Med.* 2007 ; 28 : 67-75.
 38. Al Saeed W, Al Dhamen M, Ahmad R, Ahmad N, Naqvi AA. Clinical uses and toxicity of Ephedra sinica: an evidence-based comprehensive retrospective review (2004-2017). *Pharmacogn J.* 2019 ; 11(2) : 439-44.
 39. Jing P, Giusti MM. Effects of extraction conditions on improving the yield and quality of an anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays L.*) color extract. *J Food Sci.* 2007 ; 72(7) : C363-8.