

# 부자·파두·대황·석고 추출물의 UCP 발현에 미치는 영향

권강범 · 김은경 · 김인섭 · 황태옥 · 이시우<sup>1</sup> · 이수경<sup>2</sup> · 최진영<sup>3</sup> · 금경수<sup>4,\*</sup>

원광대학교 한의과대학 한방생리학교실, 1: 한의학연구원, 2: 원광대학교 한의과대학 한방재활의학교실,  
3: 원광대학교 한의과대학 군산한방병원, 4: 원광대학교 한의과대학 원전학교실

## Effects of Buja·Padu·Daehwang·Seokgo Extract on UCPs Expression in Mice

Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim, In Seob Kim, Tae Ok Hwang, Si Woo Lee<sup>1</sup>, Su Kyung Lee<sup>2</sup>,  
Jin Young Choi<sup>3</sup>, Kyung Soo Keum<sup>4,\*</sup>

*Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 1: Korea Institute of Oriental Medicine, 2: Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 3: Kunsan Oriental Hospital, Wonkwang University, 4: Department of Classics, College of Oriental Medicine, Wonkwang University*

We designed to investigate the relationship the cold-hot theory of herbology and body temperature in experimental model. we prepared four kinds of oriental medicine, which consisted of two cold herbs, Daehwang and Seokgo, and two hot herbs, Buja and Padu. Decrease of body temperature by cold exposure for 12 hour was not inhibited by four herbs oral administration for two weeks. Thermogenesis in mammals is an essential physiological function to maintain the body temperature. Mitochondrial uncoupling proteins(UCPs), which have a potential to generate heat by uncoupling oxidative phosphorylation, apper to play a crucial role in thermogenesis. Therefore UCP is commonly recognized as a key molecule in metabolic thermogenesis and its dysfunction contributes to the development of obesity. In these experiments, Daehwang water extracts inhibited the UCP1 mRNA expression increase by cold exposure in brown adipose tissue. But other herbs did not significantly influence on UCPs mRNA expression in white adipose tissue and seelus muscle tissue. Based on this experiment, we will try to clarify the effects of Daehwang water extracts on UCP1 expression and function.

Key words : body temperature, Daehwang, Seokgo, Buja, Padu, uncoupling protein

### 서 론

한의학은 수천년간 이어온 전통적인 치료수단으로서 다양한 질환에 대하여 우수한 치료효과를 나타내고 있다. 한의학의 대표적인 치료 수단은 침과 한약으로 구분할 수 있다. 본초학<sup>1)</sup>에 대한 이론 체계는 『신농본초경』<sup>2)</sup>을 시작으로 다양한 서적에서 그 기미, 효능, 주치증 등을 설명하고 있는데 주된 본초학 이론의 근간은 기미론이라 할 수 있다. 기미론은 한약의 성미를 溫·涼·寒·熱의 4가지 성질과, 酸·苦·甘·辛·鹹의 5가지 맛으

로 구분하는 이론으로 처방을 구성하는 단일 한약재를 선택하는 근거가 되고 있다. 이러한 한의학적 이론은 오래전에 형성된 이론으로서 현대의 언어로 재구성할 필요성이 요구되고 있다. 그 방법 중의 하나가 한의학 이론을 실험적인 방법을 이용하여 증명하고 재구성 하는 법이라 할 수 있다.

한약의 4가지 성질은 寒·熱 두가지로 대표할 수 있는데, 한성의 한약은 주로 몸을 차게 해주는 기운으로 체온을 내려주는 성질의 약이며, 열성의 한약은 몸을 따뜻하게 해주는 기운으로 체온을 올려주는 성질의 약으로 인식되고 있으나 이에 대한 실험적 보고는 접할 수 없었다.

Uncoupling proetins(UCP) 단백질은 미토콘드리아에서 ATP를 생성시키기 위해서 필요한 산화(oxidation)반응과 인산화(phosphorylation)반응이 일어나는 coupled reaction을 방해함으

\* 교신저자 : 금경수, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : kskeum@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6847

· 접수 : 2007/11/09 · 채택 : 2007/11/30

로서 체내 체온을 유지시켜주는 단백질로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 현재 UCP 유전자의 isotype은 3종류(UCP1, 2, 3)가 밝혀져 있으며 조직마다 발현 양상이 다양한 것으로 알려져 있다. 갈색지방세포에서 UCP1, UCP3 유전자가 발현하며, 백색지방세포에서 UCP2가 발현하며, 근육세포에서 UCP3가 발현하는 것으로 알려져 있다<sup>4,6)</sup>.

이에 저자는 차가운 성질의 한약재인 대황 · 석고, 뜨거운 성질의 한약재인 파두 · 부자 추출물을 투여한 후 추위 노출(cold exposure)에 대한 체온 변화와 UCP유전자의 발현 양상을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 석고, 부자, 대황, 파두 추출물의 제조

각각의 한약재를 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 본초학 교실에서 검증받은 후 아래와 같은 방법으로 추출물을 제조하였다. 한약재 200 g을 3차 증류수 1.8 L에 넣은 후 80°C에서 3시간 동안 전탕한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 수집하였다. 수집된 상층액을 농축기로 이용하여 농축한 후 석고 10.3 g, 부자 24.3 g, 대황 22.36 g, 파두 18.36 g을 얻어 실험때까지 -70°C에서 보관하였다.

### 2. 실험군의 설정

- 1) Group 1: Control(room temperature) (n=5)
- 2) Group 2: Cold(4°C) exposure for 12 hour (n=5)
- 3) Group 3: 석고 추출물 500 mg/kg의 농도로 2주간 투여 + Cold(4°C) exposure for 12 hour (n=5)
- 4) Group 4: 부자 추출물 500 mg/kg의 농도로 2주간 투여 + Cold(4°C) exposure for 12 hour (n=5)
- 5) Group 5: 대황 추출물 500 mg/kg의 농도로 2주간 투여 + Cold(4°C) exposure for 12 hour (n=5)
- 6) Group 6: 파두 추출물 500 mg/kg의 농도로 2주간 투여 + Cold(4°C) exposure for 12 hour (n=5)

### 3. 체온 측정

4°C에서 12시간 동안 노출시킨 후 직장 온도(rectal temperature)를 측정하였다.

### 4. 조직 적출

실험이 끝난 mice에서 epididymal fat(white adipose tissue, WAT), intra scapular brown adipose tissue(BAT), soleus muscle을 적출한 후 실험때까지 -70°C에 보관하였다.

### 5. 조직에서 RNA 분리

WAT, BAT, muscle로부터 total RNA의 분리는 Trizol reagent(Life Technologies, UK)를 이용하여 제조회사가 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 각각의 조직 100 mg을 작은 조각으로 자른 후 500 µl RNAzol B로 용해시킨후 50 µl chloroform을 첨가하여 얼음속에서 5분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후

13,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. 위 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 섞은 후 얼음에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 13,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리하고 침전물을 80% EtOH로 세척하였다. 세척된 RNA를 건조시킨 후 DEPC가 처리된 20 µl 로 녹이고 분광광도계에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

### 6. 역전사 반응(reverse transcription reaction)

3-5 µg total RNA와 reverse transcriptase(MMLV; GIBCO, BRL)를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 역전사 반응은 total RNA(3-5 µg), oligo d(T)12-18(1 µg), 2 µl dNTP(10 mM), MMLV reverse transcriptase(200 U), DTT(10 mM), RNase inhibitor(1 µl; Promega, USA), 20 µl 완충용액(50 mM Tris-Cl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>)에 함유된 반응액으로 42°C에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 실시간 역전사 효소 증합 반응은 10배 희석한 cDNA에 역전사 효소가 포함된 2X SYBR-Green 완충용액(Roche Diagnostics Ltd, UK)를 반응시켜 LightCycler rapid thermal cycler system(Roche)을 이용하여 수행하였다. 간략하면, reaction mixture을 10분 동안 95°C에서 반응 시킨 후, denaturation(95°C, 10초), annealing(58°C for UCP1, 2, 3 or 60°C for β-actin, 5초), elongation(72°C, 10초)의 조건에서 45cycles을 수행하였다. 발현된 UCP1, 2, 3양은 LightCycler System software(Roche)를 이용하여 β-actin에 대한 상대적인 양으로서 계산하였다. 실험에 사용된 UCP1, 2, 3의 primer 염기 서열은 Table 1에 표기하였다.

Table 1. Sequences and accession numbers for primer, forward and reverse, used in real-time PCR.

Gene	Sequence for Primers	Accession no.
β-actin	Forward: GTGCTATGTTGCTCTAGACT	NM 007393
	Reverse: CACAGGATTCCATACCCAAG	
UCP1	Forward: CCGGCTTAATGACTGGAG	NM 009463
	Reverse: CTTTCTGTGGTGGCTATAACT	
UCP2	Forward: AGACATGCTCTGAACCG	NM 011671
	Reverse: TAGACTACACAGCGAGTTCC	
UCP3	Forward: GGACCCACGCGCTTCTA	NM 009464
	Reverse: AGAGACGCTTTGTTCTGT	

### 7. 통계 처리

실험 결과는 mean±S.E.M으로 표시하였으며 유의성의 검정은 One-Way Anova test(Microcal Origin; version6.0; Microsoft; USA)에 의하였으며 p< 0.05인 것만 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. 직장 온도(rectal temperature)에 대한 효과

4°C에 12시간 동안 노출시킨 후 직장 온도를 측정한 결과 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으나 석고, 부자, 대황, 파두를 투여한 후 cold exposure(CE)를 한 군은 CE만을 시행한 군에 비하여 유의한 차이가 없었다(Fig. 1).

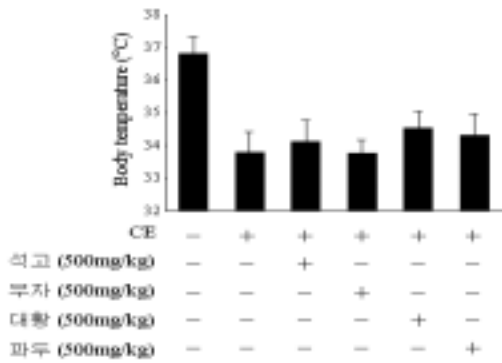


Fig. 1. Effects of herb medicines on body temperature. CE: cold exposure.

2. 갈색지방세포(brown adipose tissue, BAT)에서 UCP1, 3 mRNA 발현에 대한 효과

실험이 끝난 쥐의 BAT에서 UCP1, 3에 대한 발현 정도를 real-time PCR을 이용하여 조사하였다. 그 결과 CE 군에서 UCP1의 발현량이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다. 4가지의 한약재를 투여한 군 중 대황을 투여한 군에서 CE만을 시행한 군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2).

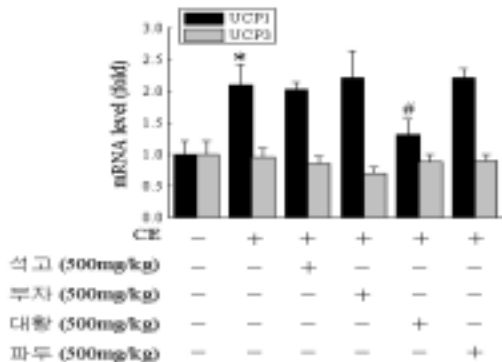


Fig. 2. Effects of herb medicines on UCP1 and UCP3 mRNA expressions of brown adipose tissue. CE: cold exposure.  $\beta$ -actin was used as an internal standard for target genes. Values are mean  $\pm$  S.E.M. \*P<0.05 vs control; #p<0.05 vs CE.

3. 백색지방세포(white adipose tissue, WAT)에서 UCP2 mRNA 발현에 대한 효과

실험이 끝난 쥐의 WAT에서 UCP2에 대한 발현 정도를 real-time PCR을 이용하여 조사하였다. 그 결과 CE 군에서 UCP2의 발현량이 대조군에 비해 유의한 변화는 나타나지 않았으며, 투여한 4가지 한약재 중 부자, 대황 투여군에서 각각 CE만을 시행한 군에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 유의성을 나타내지 않았다(Fig. 3).

4. 근육(soleus muscle)에서 UCP3 mRNA 발현에 대한 효과

실험이 끝난 쥐의 WAT에서 UCP3에 대한 발현 정도를 real-time PCR을 이용하여 조사하였다. 그 결과 CE 군에서 UCP3의 발현량이 대조군에 비해 증가하는 경향이 나타났으나 유의한 변화는 없었으며, 투여한 4가지 한약재 중 부자, 대황 투

여군에서 각각 CE만을 시행한 군에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 유의성을 나타내지 않았다(Fig. 4).

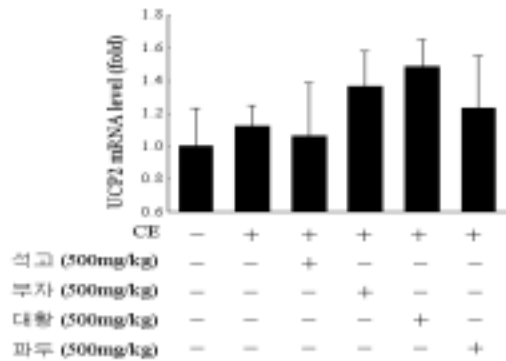


Fig. 3. Effects of herb medicines on UCP2 mRNA expressions of white adipose tissue. CE: cold exposure.  $\beta$ -actin was used as an internal standard for target genes. Values are mean  $\pm$  S.E.M.

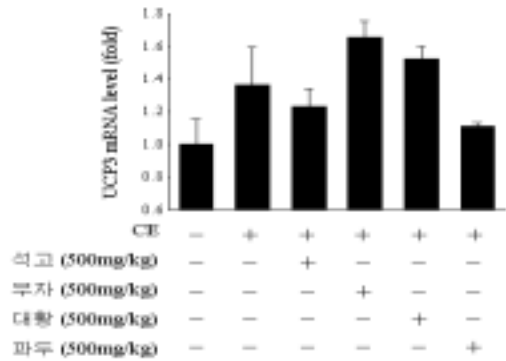


Fig. 4. Effects of herb medicines on UCP3 mRNA expressions of soleus muscle. CE: cold exposure.  $\beta$ -actin was used as an internal standard for target genes. Values are mean  $\pm$  S.E.M.

고찰 및 결론

UCP 단백질은 미토콘드리아에서 ATP를 생성시키기 위해서 필요한 산화(oxidation)반응과 인산화(phosphorylation)반응이 일어나는 coupled reaction을 방해함으로써 체내 체온을 유지시켜주는 단백질로 알려져 있다. 현재 UCP 유전자의 isotype은 3종류(UCP1, 2, 3)가 밝혀져 있으며 조직마다 발현 양상이 다양한 것으로 알려져 있다. 갈색지방세포에서 UCP1, UCP3 유전자가 발현하며, 백색지방세포에서 UCP2가 발현하며, 근육세포에서 UCP3가 발현하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 사용한 한약재는 본초학의 성미 중 한성(寒性) 약물의 대표약인 석고와 대황, 열성(熱性)약물의 대표약인 부자와 파두이다. 추위 노출(cold exposure, CE)군의 직장 온도(rectal temperature)는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 1). 이에 대한 4가지 한약재의 효과를 조사한 결과 유의한 변화는 나타나지 않았다. 이는 본초학 이론 중 한약재의 寒·熱의 개념은 체온을 상승시키거나 또는 체온을 하강시키는 개념과는 상관없음을 시사하는 실험적 결과로 사료된다.

갈색지방세포에서 CE군은 대조군에 비하여 UCP1 mRNA 발현을 유의하게 증가시켰다(Fig. 2). 이는 CE에 대한 보상 기전으로서 UCP1의 발현이 증가한 것으로 생각된다. 그러나 대황 추출물을 투여한 후 CE을 시행한 군의 UCP1의 발현은 CE군에 비하여 유의하게 감소하였다. UCP 유전자는 세포내 ATP 생성을 억제하는 단백질로 알려져 있어 UCP 유전자의 증가는 지방조직에 저장되어 있는 중성지방의 분해를 촉진하는 결과를 야기하므로 항비만 제제 개발의 목표 물질(target molecule)로 알려져 있다. 그러나 아직도 이에 대한 정확한 작용은 밝혀지지 않은 실정이다. 대황 추출물의 UCP1에 대한 감소 효과는 비만을 포함한 대사과정 전반에 대한 실험을 진행한 후 의미를 찾을 수 있을 것으로 사료된다. 백색지방세포에서 각 군간의 UCP2에 대한 발현 차이는 찾을 수 없었다(Fig. 3). 그러나 부자, 대황을 투여한 군의 UCP2 mRNA 발현을 대조군에 대하여 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 3). 또한 결과에 보여주지는 않았지만 실험에서 이용한 백색지방세포는 epididymal fat의 무게 역시 부자, 대황 추출물을 투여한 군에서 유의한 감소를 나타냈다(data not shown). 백색지방세포에서 UCP2 발현의 증가는 중성지방(triacylglycerol)의 분해가 증가하였음을 의미하며 이는 또한 체중의 감소를 의미한다. 앞으로 비만에 대한 부자, 대황 추출물의 효과를 조사해 볼 필요성을 제기한 결과로 생각된다. 근육에서 발현하는 UCP2 mRNA 발현에 대한 각 군간의 유의한 차이성은 발견되지 않았다(Fig. 4). 그러나 부자, 대황 추출물을 투여한 군의 UCP3 mRNA 발현량은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다. 이는 Fig. 3에서 나타난 백색지방세포에서 UCP2 발현량의 증가와 비슷한 결과이다. 근육에서 UCP2 발현량의 증가는 근육의 에너지 소비율이 증가함을 시사하며 에너지 소비의 증가는 왕성한 대사 활동으로 인한 에너지 필요성이 증가한 것으로 이해될 수 있다. 이는 간에서 일어나는 신생당합성의 증가, 지방조직에서 중성지

방의 분해 증가를 야기할 수 있을 것으로 생각된다. 앞으로 이에 대한 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국한의학 연구원 기관고유과제인 한방진단표준 개발의 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. 全國韓醫科大學本草學教室 共著. 本草學. 서울, 영림출판사, 1991.
2. 吳謙, 孫星衍, 孫馮翼. 神農本草經. 북경, 인민위생출판사, 1992.
3. Hitoshi, Y., Yuzo, S., Nozomu, Mori. Difference in induction of uncoupling protein genes in adipose tissues between young and old rats during cold exposure. FEBS Letters 458: 157-161, 1999.
4. Samec, S., Seydoux, J., Dulloo, A.G. Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? FASEB J. 12: 715-724, 1998.
5. Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Sallvayre, R., Penicaud, L., Casteilla, L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. FASEB J. 11: 809-815, 1997.
6. Argyropoulos, G., Brown, A.M., Willi, S.M., Zhu, J., He, Y., Reitman, M., Gevao, S.M., Spruill, I., Garvey, W.T. Effects of mutations in the human uncoupling protein 3 gene on the respiratory quotient and fat oxidation in severe obesity and type 2 diabetes. J. Clin. Invest. 102: 1345-1351, 1998.