

## 백출, 어성초, 금은화, 황금, 황련과 Metformin의 병용 투여 시 항산화 효과 및 전지방세포 분화 억제 효과

장세주 · 한경선 · 왕경화 · 채희성<sup>1</sup> · 최영희<sup>1</sup> · 진영원<sup>1</sup> · 최한석<sup>2</sup> · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학과교실, <sup>1</sup>동국대학교 약학대학 약학교실, <sup>2</sup>동국대학교 의과대학 내분비내과교실

### Effect of *Atractylodes Rhizoma Alba*, *Houttuyniae Herba*, *Lonicerae Flos*, *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma* Extracts Combined with Metformin on the Antioxidant and Adipocyte Differentiate Inhibition

Seju Chang, Kyungsun Han, Jing-Hua Wang, Hee-Sung Chae<sup>1</sup>, Yong Hee Choi<sup>1</sup>, Young-Won Chin<sup>1</sup>,  
Han-Seok Choi<sup>2</sup>, Hojun Kim

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University, <sup>1</sup>Department of Pharmacy,  
College of Pharmacy, Dongguk University, <sup>2</sup>Department of Endocrinology Medicine, College of Medicine, Dongguk University

Received: May 18, 2015

Revised: May 31, 2015

Accepted: June 1, 2015

Correspondence to: Hojun Kim  
Department of Oriental Rehabilitation  
Medicine, Dongguk University Ilsan  
Oriental Hospital, College of Korean  
Medicine, Dongguk University, 27  
Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang  
410-773, Korea  
Tel: +82-31-961-9111  
Fax: +82-31-961-9009  
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2015 by The Society of Korean  
Medicine for Obesity Research

**Objectives:** This study was to investigate the antioxidative capacity, antiobesity effects of *Atractylodes Rhizoma Alba*, *Houttuyniae Herba*, *Lonicerae Flos*, *Scutellariae Radix*, and *Coptidis Rhizoma* on Raw 264.7 and 3T3-L1 cell lines.

**Methods:** Three different types of herb extracts (*A. Rhizoma Alba*, *H. Herba*, *L. Flos*, *S. Radix*, and *C. Rhizoma*, water 100%, ethanol 30%, ethanol 100%) were used in this study. Total polyphenol compound, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, reactive oxygen species (ROS) activity, NO production and cell proliferation were measured.

**Results:** Total polyphenol compound measurement of *L. Flos*, *A. Rhizogenes*, and *C. Rhizoma* extracts were higher than *A. Rhizoma Alba*, *H. Herba*. DPPH radical scavenging activity, ROS activity and NO production of *S. Radix*, *C. Rhizoma* extracts were lower than *L. Flos*, *A. Rhizoma*, and *H. Herba*.

**Conclusions:** Metformin and *S. Radix*, *C. Rhizoma*, *A. Rhizoma Alba*, and *L. Flos* extracts combination groups showed synergistic effect on adipocyte differentiation inhibition and antioxidative activity.

**Key Words:** Metformin, Herbal medicine, Combination, Antioxidative, Adipocyte differentiation

## 서론

비만은 섭취한 에너지가 신체활동과 성장에 소비한 에너지량보다 많아 체내 지방이 과도하게 축적되는 현상<sup>1)</sup> 고지혈증, 고혈압, 당뇨병 및 동맥경화증 등 각종 질환의 발병률을 증가시키는 요소이며<sup>2)</sup> 비만으로 인한 지방세포의 크기와 양적 증가는 조직에 산화스트레스를 증가시킨다. 이

러한 산화스트레스는 많은 지방세포에 아디포카인(adipokines)을 발현시키고, 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 증가시킨다<sup>3)</sup>.

ROS는 산화스트레스에 의해 생성되며 당뇨병, 신부전, 암 등 여러 가지 다양한 질환의 병인으로 인정되고 있다<sup>4)</sup>. ROS는 산소를 포함하는 화학적 반응성이 높은 분자로서 superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),

hydroxyl radical (OH), peroxynitrite ( $\text{NO}_3^-$ ), hypochlorite ion ( $\text{OCl}^-$ ) 등을 포괄하여 이르는 용어인데<sup>5)</sup> 반응시간이 매우 짧은 반면에 반응력이 커서 염증과 세포 자멸사를 유발시킨다<sup>6)</sup>. 특히 당뇨병 환자에서는 ROS의 생성과 산화의 방어기전 사이의 불균형으로 인해 산화적 손상이 잘 발생되고, 이런 ROS는 인슐린을 생성하고 분비하는  $\beta$ -cell을 파괴시킨다<sup>7)</sup>. 이에 체내 산화스트레스를 조절하는 것은 비만 관리 및 당뇨 치료에 있어 필수적이며 추후 발생할 수 있는 여러 합병증의 예후에도 중요한 영향을 미치게 될 것으로 생각된다. 여러 선행연구에서 비만에 천연 항산화 물질을 처치 후 항산화 효소를 분석한 바 있고<sup>3)</sup>, 경제적인 천연 항산화제 발굴을 위해 과일이나 채소의 부산물을 이용한 항산화 연구를 진행하고 있다<sup>8)</sup>. 그 외에도 참마와 selenium을 병용투여하여 지방대사물과 지질과산화의 작용을 통한 항산화작용 상승효과와<sup>9)</sup> streptozotocin으로 당뇨 유발한 쥐에 텍사와 chromium의 병용투여를 통해 혈당과 조직 내 glycogen 및 지질대사에 미치는 영향에 대한 연구<sup>10)</sup> 등을 통해 한약재와 다른 약물과의 병용투여 시 항산화효과와 혈당 및 지질대사에 미치는 영향에 대한 연구를 하였다.

Metformin은 현재 제2형 당뇨병의 환자의 1차 약물요법으로 사용되고 있으며 저혈당 증상을 유발하지 않으며 혈당을 낮추어 주어 세계적으로 1,200만 명 정도가 복용하는 것으로 알려져 있다<sup>11)</sup>. Metformin은 혈당강하 작용 외에도 혈관 내피세포에서의 염증반응을 억제하는 작용이 있으며<sup>12)</sup> 제2형 당뇨병의 유발인자인 비만과 인슐린 저항성이 염증반응과 밀접한 연관을 갖고 있음에 따라 metformin을 염증반응제어를 위한 연구에도 활용이 가능할 것으로 생각된다. 대표적으로 쥐에게 metformin과 대황을 병용투여하여 항산화효과가 증가한 연구가 있었으며<sup>13)</sup> 이를 통해 metformin과 다른 한약물을 병용투여 시 항산화 효과 및 항염증작용에 대해 규명하며 나아가 비만 치료에 활용할 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 백출, 어성초, 금은화, 황금, 황련을 세 가지 추출방법을 통해 얻은 각각의 추출물을 metformin과 함께 Raw 264.7 세포와 3T3-L1 세포에 처리하여 총 페놀함량 분석, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능, ROS 생성량, NO 생성량, 세포생존율을 측정하였다. 또한 Oil Red O staining을 통해 지방세포의 지방 축적 억제 효과를 관찰하였다. 상기 실험을 통해 각각의 군에서 한

약의 추출법에 따른 효과차이 및 metformin과 병용투여 시 약효 상승효과를 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

Macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분주받아 사용하였다. 세포배양은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS)과 2 mL-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 lg/ml streptomycin이 함유된 배지를 사용하였다.  $\text{CO}_2$  incubator  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  - 95%  $\text{O}_2$  조건하에서 배양하였다. 실험에 사용된 백출, 어성초, 금은화, 황금, 황련 추출물(water 100%, 에탄올 30%, 에탄올 100%)은 동국대학교 약학대학에서 제공받아 사용하였다. 각각의 세포를 정상군(이하 normal, N) 황련 열수추출물(water 100%) 처리군(이하 HLW), 황련 30% 에탄올추출물 처리군(이하 HL30), 황련 100% 에탄올추출물 처리군(이하 HL100), 황금 열수추출물 처리군(이하 HGW), 황금 30% 에탄올추출물 처리군(이하 HG30), 황금 100% 에탄올추출물 처리군(이하 HG100), 백출 열수추출물 처리군(이하 BCW), 백출 30% 에탄올추출물 처리군(이하 BC30), 백출 100% 에탄올추출물 처리군(이하 BC100), 금은화 열수추출물 처리군(이하 GMHW), 금은화 30% 에탄올추출물 처리군(이하 GMH30), 금은화 100% 에탄올추출물 처리군(이하 GMH100), 어성초 열수추출물 처리군(이하 OSCW), 어성초 30% 에탄올추출물 처리군(이하 OSC30), 어성초 100% 에탄올추출물 처리군(이하 OSC100) 등 총 15개의 군으로 만들었다.

### 2. 세포배양

RAW 264.7 cell line과 3T3-L1 cell line은 DMEM에 10% FBS와 2 ml glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin이 함유된 배양액을 사용하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 90% humidity의 조건하에서 배양되었다. 배양된 세포는 2~3일에 한 번씩 배양액을 바꾸어 주면서 배양하여 세포분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline (PBS)으로 세포를 세척한 후 trypsin-ethylenedia-

minetetraacetic acid 용액으로 부착된 세포를 분리한 후 원심분리하여 세포를 모은 다음 세포와 배지를 잘 혼합하여 계대 배양하여 사용하였다.

### 3. Total phenolic compound 함량 측정

각각의 추출물 40  $\mu$ l와 Folin-ciocalteu's reagent 200  $\mu$ l, water 1,160  $\mu$ l를 혼합하여 3분간 incubator에서 반응시키고, 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  600  $\mu$ l를 첨가한다. 2시간 반응시킨 후에 원심분리하여 상층액을 96 well plate에 200  $\mu$ l/well 이 되도록 옮기고, microplate spectrophotometer를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 표준용액으로 검량선을 구하고 계산하였다.

### 4. DPPH 라디칼 소거능 분석

DPPH 라디칼 소거능 측정은 각각의 추출물 40  $\mu$ l에 300  $\mu$ M DPPH/EtOH 용액을 760  $\mu$ l 첨가하고 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, microplate reader에서 515 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다.

### 5. Intercellular ROS activity assay

3T3-L1 세포를 6 well-plate에  $3 \times 10^5$  cells/well로 seeding 하고 18시간이 지난 후, 각각의 추출물을 200  $\mu$ g/ml를 첨가하여 6시간 동안 반응시킨다. 이후 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)로 washing하고 0.25% TE 100  $\mu$ l/well을 첨가한 후, 1,000 rpm으로 5분간 원심분리한다. 상층액을 제거한 후 DPBS 1 ml를 첨가한 후 fluorescence activated cell sorter (FACS) tube로 옮긴다. 1,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거한다. 500  $\mu$ l/tube dihydrohodamine (1:200 PBS dilution; 5~10  $\mu$ M)을 첨가한 후 37°C에서 30분간 incubation하고 DPBS 용액으로 3번 washing한다. 다시 DPBS 1 ml를 첨가하여 37°C에서 10분간 incubation한 후 FACS detection하였다.

### 6. NO assay

24 well-plate에 Raw 264.7 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well로 seeding하고 24시간 후 각각의 추출물을 200  $\mu$ g/ml를 첨가하여 24시간 동안 반응시켰다. Lipopolysaccharide (LPS) 0.1  $\mu$ g/ml를 각각의 well에 처리하고 24시간 동안 37°C

5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양 후 세포배양 상등액 100  $\mu$ l를 채취하여 여기에 그리스 시약 100  $\mu$ l를 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 7. Cell viability assay

96 well-plate에 3T3-L1 세포를  $3 \times 10^3$  cells/well로 seeding하고 24시간 후에 각각의 추출물들을 well당 100  $\mu$ l씩 분주하여 24시간 반응시키고, EZ-Cytox WST reagent 10  $\mu$ l씩 각 well에 가하고 2시간 동안 배양한 후 microplate reader를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 8. Oil red O staining assay

마우스 지방세포인 3T3-L1 cell line을 6 well plate에서  $5 \times 10^5$  cells/well로 seeding한 후 세포가 full confluence가 될 때까지 배양한다. 세포가 full confluence가 될 때까지 배양한 이후에 배지를 1  $\mu$ M dexamethasone, 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 10  $\mu$ g/ml insulin을 포함한 DMEM 배지(differentiation media)로 바꾼 후 48시간 동안 배양한다. 이후 10  $\mu$ g/ml의 insulin을 포함하는 DMEM 배지(maturation media)를 처리한 후 분화를 유도한다. 분화가 유도된 세포는 lipid droplet의 크기와 개수가 증가하며, 이러한 분화 지방 세포를 다양한 농도의 샘플과 양성대조군을 처리한 후 Oil O Red staining을 통해서 지방 축적을 억제하는 효과를 분석한다.

### 9. 통계방법

실험결과는 평균값  $\pm$  표준편차(mean  $\pm$  standard deviation)로 표시하였다. DPPH 라디칼 소거능, 세포 생존을 분석은 총 3회의 실험을 수행하였다. Independent t-test를 통해 군 간 비교, paired t-test를 통해 전후 비교를 하였으며, 통계적 유의성은 P값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 한약재 5종의 추출방법에 따른 항산화활성 비교

황련, 황금, 백출, 금은화, 어성초의 추출방법에 따른 총

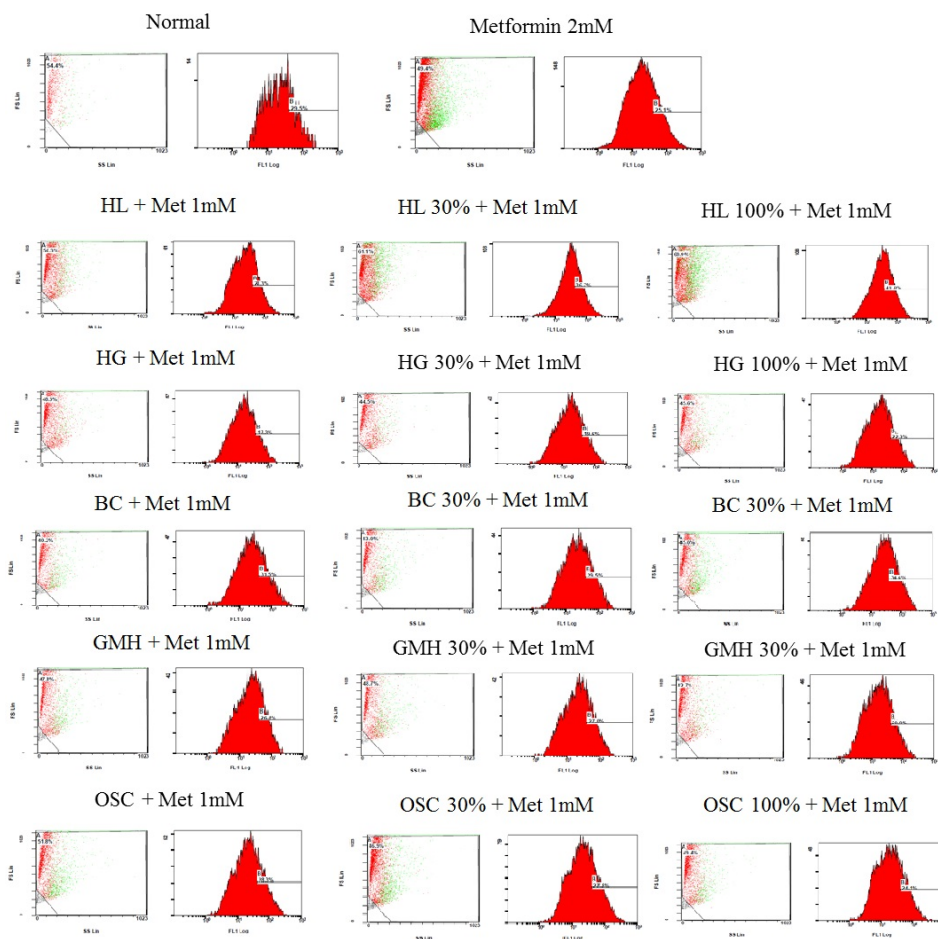
**Table 1.** Total Phenolic Compound and DPPH Radical Scavenging Activity of Five Herbs

Herb	Extraction procedure	Total phenolic compound (mg/g)	DPPH scavenging IC50 (µg/ml)
<i>Coptidis Rhizoma</i>	Water 100%	57.62	425.49
	Ethanol 30%	58.03	398.67
	Ethanol 100%	52.08	353.42
<i>Scutellariae Radix</i>	Water 100%	59.20	123.44
	Ethanol 30%	58.85	244.36
	Ethanol 100%	52.79	249.17
<i>Atractylodes Rhizoma Alba</i>	Water 100%	0.12	—
	Ethanol 30%	0.06	—
	Ethanol 100%	2.53	—
<i>Lonicerae Flos</i>	Water 100%	53.73	143.36
	Ethanol 30%	53.91	154.35
	Ethanol 100%	57.67	146.93
<i>Houttuyniae Herba</i>	Water 100%	26.42	239.8
	Ethanol 30%	37.55	246.1
	Ethanol 100%	46.85	293.11

DPPH: 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

페놀함량과 DPPH 라디칼 소거능을 비교한 결과는 Table 1에 나타났다. 총 폴리페놀 함량 및 DPPH 소거능 모두 백출균에서 가장 낮은 결과를 보였다. 특히 DPPH 라디칼 소거능의 결과값은 측정되지 않았다. 황련균에서는 총 페놀함량이 30% 에탄올 추출물에서 가장 높게 측정된 반면 황금은 100% 열수추출물, 금은화와 어성초는 에탄올 100% 추출물에서 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타냈다. DPPH 라디칼 소거능은 황련에서 가장 우수한 결과는 나타냈고 그 중 열수추출물이 가장 뛰어난 효과를 보였다. 황금과 어성초는 에탄올 100%군에서 가장 좋은 DPPH 소거능을 보였으며 금은화의 경우 30% 에탄올 군에서 높은 DPPH 소거능을 보였다.

3T3-L1 세포에 각 한약 추출물을 처리한 후 세포 내 ROS 활성도를 측정된 결과 대조군은 29.5%, metformin 2 mM군은 25.1%가 측정되었다. OSCW+Met 1 mM군은 28.3%, OSC30+Met 1 mM군은 27.8%, OSC100+ Met 1



**Fig. 1.** The level of ROS activity in 3T3-L1 cells. HL: *Coptidis Rhizoma* water 100% extract, HL30: *C. Rhizoma* ethanol 30% extract, HL100: *C. Rhizoma* ethanol 100% extract, HG: *Scutellariae Radix* water 100% extract, HG30: *S. Radix* ethanol 30% extract, HG100: *S. Radix* ethanol 100% extract, BC: *Atractylodes Rhizoma Alba* water 100% extract, BC30: *A. Rhizoma Alba* ethanol 30% extract, BC100: *A. Rhizoma Alba* ethanol 100% extract, GMH: *Lonicerae Flos* water 100% extract, GMH30: *L. Flos* ethanol 30% extract, GMH100: *L. Flos* ethanol 100% extract, OSC: *Houttuyniae Herba* water 100% extract, OSC30: *H. Herba* ethanol 30% extract, OSC100: *H. Herba* ethanol 100% extract.

mM군은 24.1%, HLW+Met 1 mM군은 28.3%, HL30+Met 1 mM군은 36.7%, HL100+Met 1 mM군은 41.0%, HGW+Met 1 mM군은 17.3%, HG30+Met 1 mM군은 19.6%, HG100+Met 1 mM군은 22.0%, BCW+Met 1 mM군은 31.5%, BC30+Met 1 mM군은 29.5%, BC100+Met 1 mM군은 34.6%, GMHW+Met 1 mM군은 26.8%, GMH30+Met 1 mM군은 27.0%, GMH100+Met 1 mM군은 20.9%가 측정되었다(Fig. 1).

## 2. Metformin과 5종의 한약재 병용 투여 시 염증억제 및 세포생존을 비교

백출, 금은화, 황금, 황련, 어성초의 단독 추출물에 metformin 1 mM을 첨가하여 3T3-L1 세포에서 세포생존율을 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다. GMHW군 200 µg/ml에서 0.459, GMH30군 200 µg/ml에서 0.45, GMH 100군 200 µg/ml에서 0.455, HLW군 200 µg/ml에서 0.485, OSCW군 200 µg/ml에서 0.459가 측정되어, 대조군의 측정값 0.597에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였음을 관찰할 수 있었다( $P < 0.05$ ). 이외의 군들에서도 경미한 증가

및 감소가 보였지만 통계적으로 유의성은 보이지 않았다.

Metformin과 다섯 가지 한약의 병용 투여 및 한약의 단독투여 시 염증생성 억제능력을 평가하기 위해 NO 생성을 측정된 결과, 대조군은 2.08, LPS를 처리한 군은 8.05로 측정되었고 LPS군이 N군에 비해 통계적으로 유의하게 증가한 것을 확인하였다( $P=0.017$ ). GMH100군은 5.83, HGW군은 3.20, HG30군은 3.15, HG100군은 4.10, HLW군은 3.45, HL30군은 2.79, HL100군은 2.64, OSC30군 5.69로 측정되어 LPS군과 비교 시 통계적으로 유의하게 감소하였다. HL30군은 2.79로 통계적으로 가장 유의한 것으로 나타났다( $P=0.0019$ ). 이외의 군들에서도 경미한 감소가 보였지만 통계적으로 유의성은 보이지 않았다. Metformin 1 mM을 병행 투여한 군에서는 BC100군은 4.93, GMH30군은 5.25, GMH100군은 5.82, HGW군은 2.92, HG30군은 2.89, HG100군은 3.64, HLW군은 2.97, HL30군은 2.61, HL100군은 2.36, OSCW군은 4.57, OSC30군은 4.87, OSC100군은 4.15로 측정되어 LPS군과 비교 시 통계적으로 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ ) HG100군은 3.74로 통계적으로 가장 유의한 것으로 나타났다( $P=0.0036$ ). 이외의

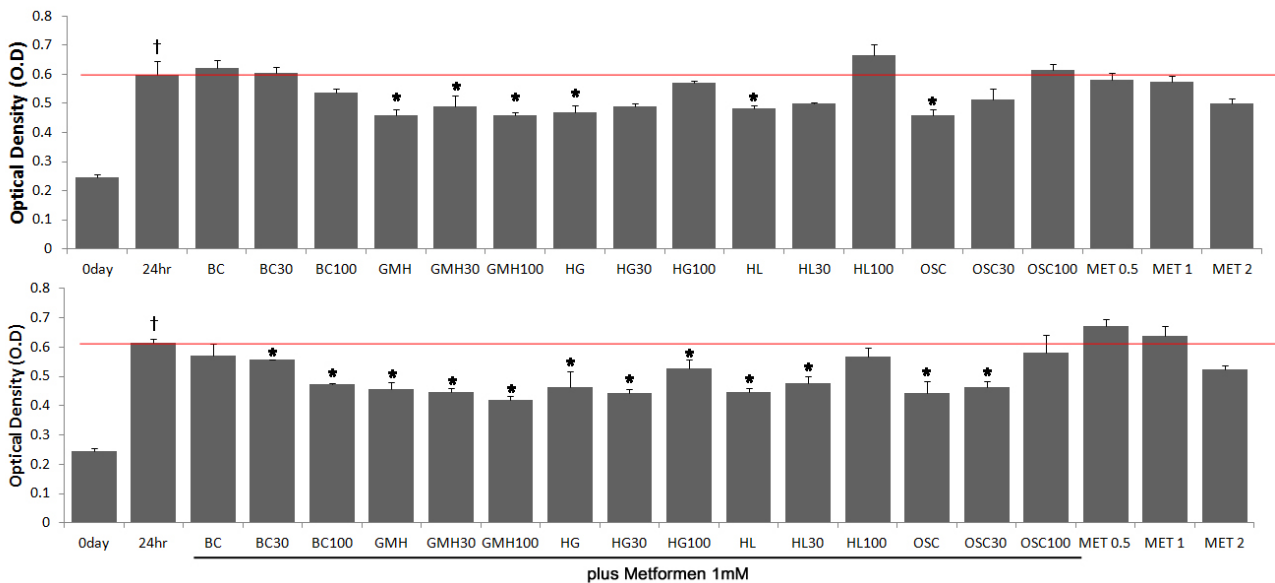
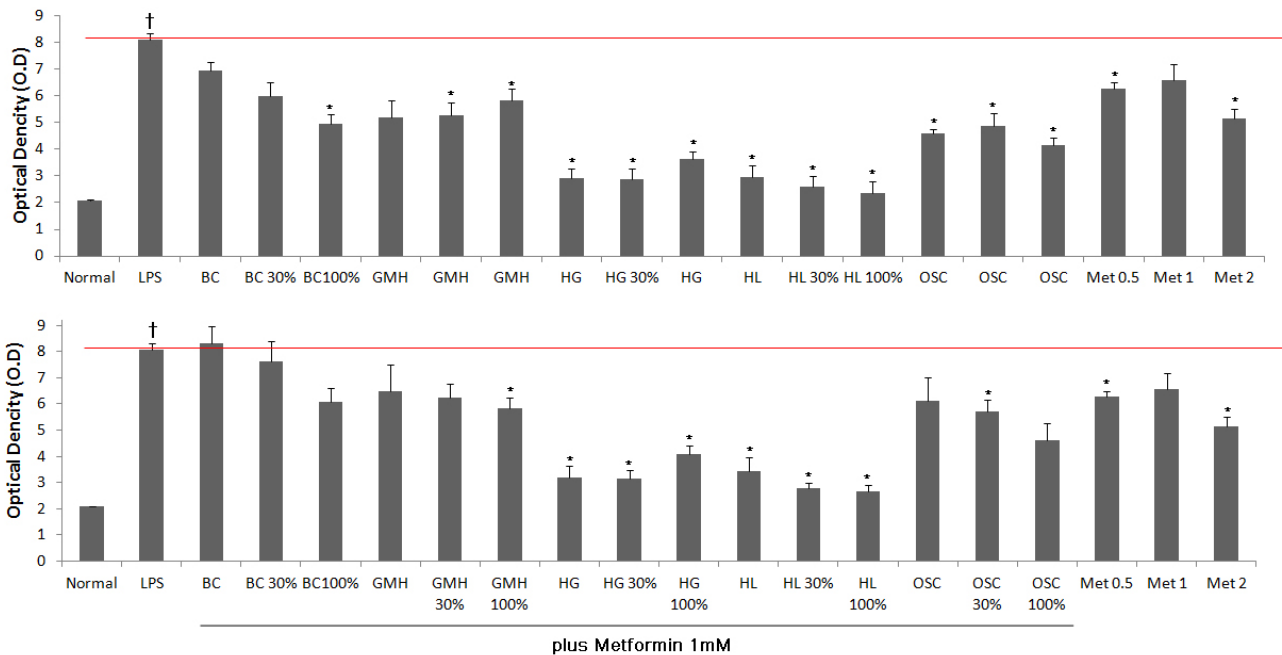


Fig. 2. The level of cell proliferation in 3T3-L1 cells. BC: *Atractylodes Rhizoma Alba* water 100% extract, BC30: *A. Rhizoma Alba* ethanol 30% extract, BC100: *A. Rhizoma Alba* ethanol 100% extract, GMH: *Lonicerae Flos* water 100% extract, GMH30: *L. Flos* ethanol 30% extract, GMH100: *L. Flos* ethanol 100% extract, HG: *Scutellariae Radix* water 100% extract, HG30: *S. Radix* ethanol 30% extract, HG100: *S. Radix* ethanol 100% extract, HL: *Coptidis Rhizoma* water 100% extract, HL30: *C. Rhizoma* ethanol 30% extract, HL100: *C. Rhizoma* ethanol 100% extract, OSC: *Houttuyniae Herba* water 100% extract, OSC30: *H. Herba* ethanol 30% extract, OSC100: *H. Herba* ethanol 100% extract, \*P-value < 0.05 as compared to 24 hours group, †P-value < 0.05 as compared to control.



**Fig. 3.** The comparison of NO production between herbal treatment and metformin and herb combination treatment in Raw 264,7 cells, LPS: lipopolysaccharide, BC: *Atractylodes Rhizoma Alba* water 100% extract, BC30: *A. Rhizoma Alba* ethanol 30% extract, BC100: *A. Rhizoma Alba* ethanol 100% extract, GMH: *Lonicerae Flos* water 100% extract, GMH30: *L. Flos* ethanol 30% extract, GMH100: *L. Flos* ethanol 100% extract, HG: *Scutellariae Radix* water 100% extract, HG30: *S. Radix* ethanol 30% extract, HG100: *S. Radix* ethanol 100% extract, HL: *Coptidis Rhizoma* water 100% extract, HL30: *C. Rhizoma* ethanol 30% extract, HL100: *C. Rhizoma* ethanol 100% extract, OSC: *Houttuyniae Herba* water 100% extract, OSC30: *H. Herba* ethanol 30% extract, OSC100: *H. Herba* ethanol 100% extract. \*P-value < 0,05 as compared to LPS group, †P-value < 0,05 as compared to control.

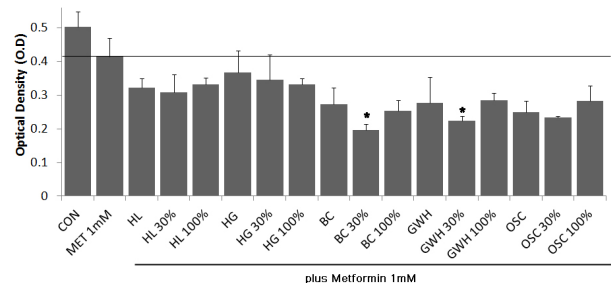
군들에서도 경미한 감소가 보였지만 통계적으로 유의성은 보이지 않았다(Fig. 3).

### 3. 한약과 메트포민 병용투여 시 지방분화 억제 능력 평가

대조군은 0.417이 측정되었다. BC30군과 1 mM metformin을 병용투여한 군은 0.197, GMH30군과 1 mM metformin을 병용투여한 군은 0.224로 측정되었으며 통계적으로 유의한 것으로 나타났다(P<0.05). BC30군이 GMH30군에 비해 측정값이 낮게 측정되었으며 통계적으로 가장 유의한 것으로 나타났다(P=0.016). 이외의 군들에서도 경미한 감소가 보였지만 통계적으로 유의성은 보이지 않았다(Fig. 4).

### 고찰

백출에 관한 대표적인 약리적인 연구로는 항산화 효과가 잘 알려져 있으며<sup>14)</sup>, 백출 열수추출액이 Th1 type 사이토카



**Fig. 4.** Oil Red O staining 3T3-L1 cells treated with 5 types of herbs combination with metformin. CON: control, HL: *Coptidis Rhizoma* water 100% extract, HL30: *C. Rhizoma* ethanol 30% extract, HL100: *C. Rhizoma* ethanol 100% extract, HG: *Scutellariae Radix* water 100% extract, HG30: *S. Radix* ethanol 30% extract, HG100: *S. Radix* ethanol 100% extract, BC: *Atractylodes Rhizoma Alba* water 100% extract, BC30: *A. Rhizoma Alba* ethanol 30% extract, BC100: *A. Rhizoma Alba* ethanol 100% extract, GMH: *Lonicerae Flos* water 100% extract, GMH30: *L. Flos* ethanol 30% extract, GMH100: *L. Flos* ethanol 100% extract, OSC: *Houttuyniae Herba* water 100% extract, OSC30: *H. Herba* ethanol 30% extract, OSC100: *H. Herba* ethanol 100% extract. \*P-value < 0,05 compared to metformin alone.

인 유도 및 대식세포에서 NO 조절 등에 관여하여 면역반응에 관여한다고 보고된 바가 있다<sup>15)</sup>. 또한 백출이 phospho-

Akt가 역할을 담당하는 세포성장억제를 통해 비만세포의 성장을 억제하며<sup>16)</sup>, 백출 및 발효백출의 위장관계 보호효과<sup>17)</sup>도 보고된 바 있다.

어성초에 관한 연구로는 항염증 효능<sup>18)</sup>, 대동맥 평활근 세포 이주 및 증식 억제효과<sup>19)</sup>, 면역활성 효과<sup>20)</sup>, 염증성 매개물질에 대한 억제효과<sup>21)</sup>에 관한 실험적 연구가 보고되었다. 어성초를 함유하는 처방인 가미패독산은 항알레르기 활성과 항염증 활성 효과를 나타내어 알레르기 및 염증의 치료제로서 개발가능성이 있다는 보고가 있다<sup>22)</sup>.

금은화는 폴리페놀 등 다양한 생리활성 물질을 함유하여 항산화 및 항균력이 있으며<sup>23)</sup>, 금은화 및 금은화전초가 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성, iNOS, COX-2 및 cytokine에 영향을 미쳐 gram-negative bacterial infection에 의한 염증반응에서 염증관련지표들을 억제함을 보고한 바 있다<sup>24)</sup>.

황금의 성분으로는 flavonoid계 화합물로서, baicalein, biacalin, chrysin, oroxylin-A, oroxylin- $\alpha$ -7-O-glucuronide, wogomin, wogonoside, skullcapflavone, dihydro-baicalin 등이 있으며<sup>25)</sup>, 황금에 관한 국내 연구로는 항염 및 항과민, 항균 및 항바이러스, 항산화작용에 관한 보고되었다<sup>26)</sup>. 이밖에 황금추출물의 섭취는 혈장과 간의 총콜레스테롤과 중성지방의 농도는 낮추고, 혈장의 high density lipoprotein (HDL)-콜레스테롤 농도, 총 콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤 비율은 높이고 동맥경화지수를 낮추어 항고지혈증 효과가 있음을 보고한 바 있다<sup>27)</sup>.

황련에 관한 연구로는 위점막 보호효과<sup>28)</sup>, 항균효과<sup>29)</sup>, 항암효과<sup>30)</sup> 등에 관한 실험적 연구가 보고되었다. 황련의 임상적 유용의 가능한 분야로는 심혈관계 효과, 간 보호 효과, 항당뇨 효과가 보고한 바 있다. 또한 황련의 berberrubine과 coptisine 성분의 수산화 라디칼 제거 능력은 기존 항산화제인 trolox보다 강력한 것으로 보고되었다<sup>31)</sup>.

본 연구는 항염증, 항지질 등의 효과가 있는 백출, 어성초, 금은화, 황금, 황련 추출물을 metformin과 병용하였을 때 항염증 항산화 효과를 알아보기 위하여 total polyphenol compound 함량, total phenolic compound 함량, DPPH 라디칼 소거능, ROS, NO 생성량을 측정하였으며, 세포독성 여부에 대해 cell proliferation을 측정하였다. Total phenolic compound 함량에서 황금, 황련, 금은화 추

출물이 백출, 어성초 추출물들에 비해 높았으며 그 중에서 HGW군과 HG30군이 59.20 mg/g, 58.85 mg/g으로 가장 높게 측정되었다. 황금의 경우 물을 이용한 추출법이 total phenolic compound를 추출하는 데 용이할 것으로 생각된다. DPPH 라디칼 소거능은 황련 추출물이 가장 높았고, 황금 추출물, 금은화 추출물은 어성초 추출물에 비해 낮았다. 백출 추출물은 radical 소거능을 측정할 수 없었으며, 이는 추출된 total phenolic compound 함량이 가장 낮음에 따라 항산화 효과가 나타나지 않는 것으로 생각된다. 어성초, 황련군에서 total phenolic compound의 추출량이 증가할수록 라디칼 소거능이 증가되는 것으로 나타났으나 황금, 금은화군의 경우 total phenolic compound 함량의 증가와 라디칼 소거능과의 상관관계가 나타나지 않는 것으로 보아 추후 지속적인 연구를 통해 추출방법에 따른 total phenolic compound 구성성분 차이 및 라디칼 소거능과의 규명도 필요할 것으로 생각된다.

ROS 측정 시 어성초, 황금, 금은화 1 mM metformin 처리군이 N군의 29.5%보다 낮게 측정되었으며 황금 1 mM metformin 처리군은 metformin 2 mM 단독처리군의 25.1%보다 낮게 측정되었다. 이 중 HGW 1 mM metformin 처리군은 17.3%로 가장 낮게 측정되었다. NO 측정 시에는 HL30 단독투여군이 2.79로 통계적으로 가장 유의한 것으로 나타났으며 metformin 병행투여 시 HG100군은 3.74로 통계적으로 가장 유의한 것으로 나타났다.

상기의 결과들로 보아 황금과 황련 추출물들이 metformin과 병용투여하였을 때 어성초, 금은화, 백출 추출물들에 비해 항산화 작용에 효과적임을 알 수 있었다. 황금의 경우 에탄올을 이용한 추출물이 물을 이용한 추출물에 비해 항산화와 관련 있는 성분 추출에 유의함을 알 수 있었다.

세포 독성에 대해 알기 위해 시행한 cell proliferation에서는 GMHW군 200  $\mu$ g/ml, GMH30군 200  $\mu$ g/ml, GMH100군 200  $\mu$ g/ml, HLW군 200  $\mu$ g/ml, OSCW군 200  $\mu$ g/ml 처리하였을 때 유의하게 감소하였다. 전체적으로 살펴봤을 때 경미한 증가와 감소가 보였지만 대조군의 측정값과 수치상 큰 차이가 없어 유해하지 않다는 것을 알 수 있었다.

지방세포분화 억제를 위해 시행한 Oil Red O staining 결과에서는 BC30군과 GMH30이 유의하게 감소하였다.

BC30군과 1 mM metformin과 병행투여 시 0.224로 측정되었으며 통계적으로 가장 유의한 것으로 나타났다.

이번 실험을 종합하면 황금과 황련추출물들이 metformin과 병용투여하였을 때 황산화 작용에 효과적이며 지방세포 분화억제에는 백출과 금은화 추출물들이 metformin과 병용투여하였을 때 유의성 있는 것으로 관찰되었다. 그리고 황금은 에탄올 100%, 금은화는 에탄올 30%로 추출하였을 경우 좋은 결과를 나타내었다. 한약물을 다양한 추출법을 통한 추출물을 metformin과 병용하여 상호작용 효과에 대해 알아보려 하였다. 이를 통해 추출법에 따라 추출물의 구성 성분차이가 다양하게 날 것으로 생각되며 이를 다른 약물과 병용하였을 때 상호작용 또한 다양하게 나타날 것으로 생각된다. 본 연구를 통해 추후 효과적인 metformin과 한약물의 병용을 위한 추출방법과 제형에 대한 연구 및 metformin과 한약물의 상호작용 규명을 위한 연구에 필요한 유효성분 추출에 관한 연구가 지속적으로 이어져야 될 것으로 생각된다.

## 결론

Metformin과 백출, 어성초, 금은화, 황금, 황련 추출물(water 100%, 에탄올 30%, 에탄올 100%)을 함께 처리하여 황산화 작용과 세포 독성, 3T3-L1 지방세포 분화 억제에 대해 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 황금, 황련, 금은화 추출물들은 total phenolic compound 함량 측정 시 백출, 어성초 추출물들에 비해 높게 측정된다.
2. 황금, 황련 추출물은 DDPH radical 소거능, ROS, NO 측정 시, 금은화, 백출, 어성초 추출물에 비해 낮게 측정된다(Fig. 3).
3. Oil red O staining 결과 백출, 금은화 추출물은 다른 추출물에 비해 지방세포 분화억제하는 경향이 있다(Fig. 4).
4. 단독투여시 황련은 에탄올 30% 추출물이, metformin 병용투여 시 황금은 에탄올 100%로 추출물이 효과가 가장 좋은 것으로 관찰되었다.
5. Metformin과 황금, 황련, 백출, 금은화 추출물의 병용은 metformin 단독 사용 시보다 염증 조절 및 지방세포분화 억제 작용 효과가 유의하게 나타났으며, 추후 지속적인

연구를 통해 각각의 한약물과 metformin 상호작용 이해 및 약효 증가시키는 병용 약물에 대한 개발이 필요할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원을 통해 보건복지부(양한방 융합기반 기술개발사업)의 재정지원을 받아 수행된 연구임(HI14C0558).

## References

1. Lee MA, Park JK, Um MH, Jeon JW, Lee JM, Park YK. Lipolytic effect of *Sparassis crispa* extracts in differentiated 3T3-L1 cells and high fat diet-induced obese mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012 ; 41(12) : 1708-15.
2. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001 ; 104(4) : 531-43.
3. Carriere A, Carmona MC, Fernandez Y. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J Biol Chem.* 2004 ; 279(39) : 40462-9.
4. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007 ; 39(1) : 44-84.
5. Lee SS. Role of reactive oxygen species in allergic rhinitis. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg.* 2012 ;55(9) : 541-5.
6. Chung HY. Aging and carcinogenic mechanisms induced by free radicals. *Korean J Gerontol.* 1992 ; 2(1) : 1-11.
7. Kim HJ, Lee SG, Park SJ, Yu MH, Lee EJ, Lee SP, et al. Antioxidant Effects of extracts from fermented red ginseng added with medicinal herbs in STZ-induced diabetic rats. *Korean J Food Sci Technol.* 2012 ; 44(3) : 367-72.
8. Kim MJ, Kim YG, Kim HS, Cheong C, Jang KH, Kang AS. Effect of antioxidant activities in ethanol extract of apple peel, grape peel and sweet potato peel as natural antioxidant. *J Korean Acad Ind Coop Soc.* 2014 ; 15(6) : 3766-73.
9. Kim MH. Effects of H<sub>2</sub>O-fraction of *Dioscorea japonica* Thunb and selenium on lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food Cook Sci.* 2001 ; 17(4) : 344-52.
10. Lim SJ, Park JE. Effects of H<sub>2</sub>O Fraction of *Alisma canaliculatum* with chromium on blood glucose levels and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food Sci Technol.* 2002 ; 34(4) : 725-31.



11. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci*. 2012 ; 122(6) : 253-70.
12. Balavoine GGA, Geletii YV. Peroxynitrite scavenging by different antioxidants. Part 1: convenient assay, Nitri Oxide. 1999 ; 3(1) : 40-54.
13. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta*. 1999 ; 1411(2-3) : 385-400.
14. Han JH, Kim JH, Kim SG, Jung SH, Kim DH, Kim GE, et al. anti-oxidative compounds from the aerial parts of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi. *Yakhak Hoeji*. 2007 ; 51(2) : 88-95.
15. Shin SW, Lee YS, Park JH. Kwon TK, Suh SI, Kwon YK. Comparison of immunomodulatory effects of water-extracted *Ginseng Radix*, *Pilose Asia-bell*, *Astragali Radix*, *Atractylodes Rhizoma alba* and *Dioscoreae Rhizoma*. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2004 ; 18(4) : 1140-46.
16. Kim CK, Kim M, Oh SD, Lee SM, Sun B, Choi GS, et al. Effects of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi rhizome on 3T3-L1 adipogenesis and an animal model of obesity. *J Ethnopharmacol*. 2011 ; 137(1) : 396-402.
17. Han KS, Kim KC, Kim HJ. Effects of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi rhizome on 3T3-L1 adipogenesis and an animal model of obesity. *J Korean Med Obes Res*. 2013 ; 13(1) : 24-32.
18. Hwang IS, Kim YJ, Park YS, Kim HJ, Kim DH, Park W. Anti-inflammatory effect of *Houttuyniae Herba* water extract on LPS-induced RAW 264.7 mouse macrophages. *Korean J Herbol*. 2014 ; 29(4) : 83-9.
19. Han JH, Park SN, Yoon MS, Choi OB. Effects of *Houttuynia cordata* Thunb extract inhibits on the migration and proliferation of vascular smooth muscle cell. *Korean J Pharmacogn*. 2011 ; 42(2) : 182-6.
20. Kim JH, Kim YS, Lim EM. Immune enhancing effect of *Houttuyniae Herba* on mouse macrophage. *J Orient Obstet Gynecol*. 2012 ; 25(2) : 12-22.
21. Lee HJ, Kim KJ. The effects of *Houttuyniae Herba* on the mastcell-mediated inflammatory responses. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2009 ; 22(2) : 60-73.
22. Kim DN, Kim JY, Han EH, Oh KN, Kim SH, Jin MR, et al. *Gamipaidok-san* possesses antiallergic and anti-inflammatory activities. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2005 ; 19(6) : 1659-65.
23. Bae JH, Kim MS, Kang EH. Antimicrobial effect of *Lonicerae Flos* extracts on food-borne pathogens. *Korean J Food Sci Technol*. 2005 ; 37(4) : 642-7.
24. Lee DE, Lee JR, Kim YW, Kwon YK, Byun SH, Shin SW, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and COX-2 Expression by flower and whole plant of *Lonicera japonica*. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2005 ; 19(2) : 481-9.
25. Kim HC. *Hanyakyakri-hak*. Seoul : Jipmoondang. 2001 : 129-33.
26. Kim KS, Kim LH, Rhee YJ, Lee SH, Choi JH, Ko HN. Analysis on research trend of studies related with *Scutellariae Radix* in Korea. *Korean J Orient Physiol Pathol* 2011 ; 25(6) : 1095-101.
27. Yoon HJ, Park YS. Effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on lipid metabolism and antioxidant defense system in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2010 ; 39(2) : 219-26.
28. Mou JC, Lee SN, Kim MG, Sea IB, Leem KH. Effects of *Coptidis Rhizoma* herbal acupuncture extract on the acute gastric mucosal lesion progression induced by compound 48/80 in rats. *Korean J Herbol*. 2013 ; 28(1) : 1-7.
29. Sea HS. An experimental study on the anti-bacterial effect of *Coptidis Rhizoma* extract compared with quantity of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Korean Inst Herb Acupunct*. 2007 ; 10(1) : 17-21.
30. Tang J, Feng Y, Tsao S, Wang N, Curtain R, Wang Y. Berberine and *Coptidis Rhizoma* as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investigations. *J Ethnopharmacol*. 2009 ; 126(1) : 5-17.
31. Kim KG, Lee HT, Ku KH, Hong JW, Cho SI. Review of pharmacological effects of *Coptidis Rhizoma* and its bioactive compounds. *J Korean Oriental Med*. 2012 ; 33(3) : 160-83.