

## Palmitic acid로 지방 축적을 유도한 HepG2 cell에 대한 삼황사심탕과 대황황련사심탕의 효과 연구

엄은식, 김영철  
경희대학교 대학원 임상한의학과

### Effect of Samhwangsasim-tang and Daehwanghwangryunsasim-tang on Palmitate-induced Lipogenesis in HepG2 cells

Eun sik Um, Young Chul Kim

Department of Clinical Korean Medicine, Graduate School, Kyung Hee University

**Objectives:** The goal of this study was to investigate the anti-lipogenic effects of Samhwangsasim-tang(SHT), Daehwanghwangryunsasim-tang(DHT) aqueous extract on HepG2 cells with palmitate.

**Materials and Methods:** HepG2 cells treated with palmitate were used in this study as hepatic steatosis model. Cells were treated with different concentrations of SHT, DHT aqueous extract for 24 hours. Cell viability and cytotoxicity were analyzed by MTT assay. Expressions of Bcl-2, Bax, Survivin, P21, TGF- $\beta$ 1, LXR- $\alpha$ , ChREBP, ACC1, SCD1 mRNA were determined by Real-time PCR. Apoptosis of cells was detected by ELISA and FACS. Expression level of caspase-3 was studied by Western blot. Lipid accumulation was indicated by Oil Red O staining.

**Results:** SHT, DHT aqueous extract had no cytotoxicity, but decreased palmitate-induced lipid accumulation in HepG2 cells. SHT aqueous extract suppressed fatty acid synthesis by inhibiting LXR- $\alpha$ , ChREBP, SCD1 activation and increasing TGF- $\beta$ 1 expression level. DHT aqueous extract also suppressed fatty acid synthesis by decreasing ChREBP expression and increasing TGF- $\beta$ 1 expression. Apoptosis of lipid accumulated cells was increased by enhanced activities of P21, caspase-3 and inhibited expressions of Bcl-2, Survivin.

**Conclusions:** These results suggest that SHT and DHT have an anti-lipogenic effects on lipid accumulation of hepatic cell. Also SHT and DHT have an efficacy to increase apoptosis of adipocyte without cytotoxicity. Therefore, SHT and DHT might have potential clinical applications for treatment of hepatic steatosis.

**Key Words :** *Samhwangsasim-tang, Daehwanghwangryunsasim-tang, Hepatic steatosis, NAFLD, Lipogenesis, Apoptosis*

### 서론

지방간이란 지방이 간조직에 과다 축적되어, 간 무게의 5% 이상을 차지한 경우를 말한다<sup>1)</sup>. 특히 대사성 질환의 유병율이 점차 증가함에 따라, 만성 간 질환에서 비알코올성 지방간 질환(Non-alcoholic

fatty liver disease, NAFLD)의 비중이 커지고 있다<sup>2)</sup>. NAFLD는 알코올성 간질환과 유사한 조직학적 손상을 보이는 질환으로, 단순한 간지방증(hepatosteatosis)부터<sup>3)</sup> 비알코올성 지방간염(Non-alcoholic steatohepatitis, NASH)을 거친 간섬유화, 간경변에 이르기까지 다양한 간손상을 유발한

• Received : 27 November 2015      • Revised : 16 March 2016      • Accepted : 24 March 2016

• Correspondence to : 김영철(Young Chul Kim)

서울시 동대문구 경희대로 23 경희의료원 한방병원 한방내과

Tel : +82-2-958-9118, Fax : +82-2-958-9258, E-mail : flare0722@khu.ac.kr

다<sup>4)</sup>.

선진국의 경우 비만인구가 늘면서 NAFLD의 유병률은 14~27%까지 나타나고 있으며<sup>5)</sup>, 우리나라 역시 식습관이 서구화되고 생활환경이 바뀔에 따라 비알코올성 지방간의 유병률이 증가하고 있는 추세이다<sup>6)</sup>.

이렇게 NAFLD의 중요도가 높아지면서 그 발생 기전과 치료 및 관리에 관한 연구도 다양하게 이루어지고 있지만<sup>7,8)</sup>, 확실하게 효과가 입증된 약물은 아직 보고되지 않고 있으며, 치료지침도 기존 간보호 약제 사용이나 생활습관 개선 등으로 질환의 진행을 예방하는 정도에 머물러 있는 상황이다<sup>9)</sup>. NAFLD와 관련하여 한의학적인 연구도 활발하게 진행되고 있는데, 세포 및 동물 실험을 통해 한약재의 치료효과와 기전을 밝히고 있다<sup>10,11,12)</sup>.

본 연구에 사용한 삼황사심탕은 고혈압, 동맥경화증에 다용하는 대표 처방으로, 앞선 연구에서 비만 동물 모델의 대사질환에 효과가 있다는 것이 확인되었으며<sup>13)</sup>, 구성 약재인 황금과 황련은 지질대사 관련 동물실험에서도 뛰어난 조절효과가 있다고 보고되었다<sup>14)</sup>. 대황황련사심탕 역시 구성 약재인 황금, 황련, 대황의 항고지혈증 효과가 밝혀져 있어<sup>15)</sup>, 두 약제 모두 대사증후군을 관리하면서 NAFLD 치료 및 예방에 접근하는 약물로서 가치가 있다.

저자는 삼황사심탕과 대황황련사심탕이 비만 및 대사질환에 미치는 영향을 바탕으로, 복합성분의 한

약 추출물이 비알코올성 지방간 세포 모델에 작용하는 분자생물학적 기전을 살펴보고자 하였다. 효과 검증을 위해 MTT assay, Realtime-PCR, ELISA, FACS, Western Blotting, Oil Red O staining 등을 시행하였고, 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격집에 근거하여 경희대학교 부속 한방병원에서 구입하여 사용하였으며, 내용 및 용량은 아래 Prescription 과 같다.

#### 2) 검액의 조제

삼황사심탕(이하 SHT) 4 첵(112 g)과 대황황련사심탕(이하 DHT) 5 첵(80 g)을 환류추출기에 넣고, 3차 증류수 1000ml 를 더하여 2 시간 동안 가열 추출한 후 여과하였다. 추출액을 여과하여 감압농축한 후, 동결건조기로 건조하여 삼황사심탕 물 추출물 24 g(수율 21.4%)과 대황황련사심탕 물 추출물 21.28 g(수율 26.6%)을 얻었다.

Prescription of Samhwangsasimtang(SHT), Daehwanghwangryeonsasimtang(DHT)

		Scientific name	Volume(g)
Herbs of DHT	대황	<i>RheiRhizoma</i>	40
	황련	<i>CoptidisRhizoma</i>	20
	황금	<i>Scutellariae Radix</i>	20
total amount			80
		Scientific name	Volume(g)
Herbs of SHT	대황	<i>RheiRhizoma</i>	48
	생지황	<i>Rehmanniae Radix</i>	32
	황련	<i>CoptidisRhizoma</i>	16
	황금	<i>Scutellariae Radix</i>	16
total amount			112

### 3) 재료

Palmitic acid, Oil Red O, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), Trizma base, Ammonium persulfate(APS), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED), Phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)는 Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

단백질 분석을 위해 필요한 재료 중, Pageruler Plus Prestained Protein Ladder, Pierce BCA Protein Assay Kit, Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate 는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였고, 10×cell lysis buffer 는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서 Western Blotting Detection Reagent 는 GE Healthcare(Little Chalfont, UK)에서 구매하였다. 단백질 detecting 을 위한 Enhanced Chemiluminescence Kit 는 Santa Cruz Biotechnology(CA, USA)에서, 단백질 발현을 분석하기 위한 Davinch-Chemi™ Chemiluminescence Imaging System 은 Davinch-K Co. Ltd(Seoul, Korea)에서 구입한 것을 사용하였다.

세포 배양을 하기 위한 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS), Dulbecco's modification of Eagle's medium(DMEM)은 Welgene Inc.(대구, Korea)에서 구입하였고, Penicillin streptomycin, Trypsin-EDTA, no Glucose 는 Gibco Invitrogen (Grand Island, NY, USA)에서, Fetal Bovine Serum(FBS)은 Atlas Biologicals(Fort Coliins, CO, USA)에서 구매하였다.

## 2. 방법

### 1) 세포 배양

인간 간암 세포주(Human hepatocellular carcinoma cell line) HepG2 cell 은 한국세포주은행으로부터 구매해 사용하였다. HepG2 cell 은 FBS 10%, penicillin 10 µU/mL, streptomycin 100 µg/mL 를 첨가한 DMEM 을 사용하여, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 환경에서 배양하였다.

### 2) 지방산 준비

Palmitic acid 준비 과정은 Choi 등의 실험<sup>16)</sup>을 참고하였다. NaOH 0.01 M 에 PA 20 mM 을 섞고, 70°C에서 30 분 유지시켜 현탁액을 만든 다음, 10% fatty acid free BSA solution 과 1:3 비율로 혼합하여 37°C로 conjugation 시켰다. 이렇게 제작한 FA stock solution 5 mM 을 Glucose DMEM 5.5 mM, 0.5% FBS 와 1:4 비율로 섞어 FA working solution 1 mM 을 만들었다.

### 3) MTT assay

Cell viability 를 확인하기 위해 MTT assay 를 시행하였다. 먼저 HepG2 cell 을 24well cell culture plates 에 5×10<sup>4</sup> cells/well 만큼 나누어 colony 를 만들고, 48 시간 동안 배양하였다. 그 다음 24 시간 동안 5.5 mM Glucose DMEM, 0.5% FBS 으로 fasting 시킨 후 약제를 처리하고 PMS/MTS solution 을 이용하여 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) Real-time PCR

Total RNA 는 세포배양 후 total RNA 는 Trizol reagent 를 이용하여 제작사의 지시에 따라 분리하였다(Invitrogen). 이렇게 얻어진 total RNA 1 µg 을 random hexamers 를 이용한 reverse-transcription system(Promega, Madison, WI, USA)으로 cDNA 로 변환하였다. 실험에 사용된 primer 종류와 sequences 는 table1.과 같다.

Real-timePCR 은 Applied Biosystem 사(CA, USA) 의 StepOnePlusReal\_time PCR System 을 이용하여 제작사가 권고하는 방법에 따라 시행하였으며, House keeping gene 인 β-actin 을 기준으로 상대적인 유전자의 발현값을 정량적으로 표현하였다. 2 x SYBR Green PCR Master Mix 10 µl, cDNA 1 µl, primer(sense) 1 µl, primer(anti-sense) 1 µl, Distilled water 7 µl 를 혼합하여 전체 부피를 총 20 µl 로 조절하였고, 초기변성(denaturation)은 첫 cycle 만 95°C에서 3 분간, 나머지 40 cycle 까지는 95°C에서 10 초간, 풀림(annealing)은 60°C에서 10 초간, 연장

(extension)은 72°C에서 15 초간으로 하여 증폭시켰다.

#### 5) ELISA

한약제가 간암세포주의 세포자멸에 미치는 영향을 밝히기 위해 Cell death detection ELISA kit(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하여 측정하였다. HepG2 세포를 6-well plate에 분주하여 24 시간 동안 부착시킨 후 PA 및 한약재를 농도별로 처리하고 24 시간동안 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후 0.2 ml의 용해완충액 (lysis buffer)을 첨가하여 30 분간 방치하고 200 µg에서 10 분간 원심분리 한 후 제조사의 지시에 따라 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 6) FACS

Annexin-V/PI assay kit를 사용하여, 약제처리에 의한 HepG2 세포주의 세포자멸을 확인하였다. PA 및 한약재를 농도별로 처리한 HepG2 세포주를 ice-cold PBS buffer로 2 차례 씻어내고, 500 µl binding buffer에서 재침전한 뒤, FITC 결합 Annexin-V (10 mg/ml)와 PI (50 mg/ml) 5 µl로 염색하여, 실온의 어두운 환경에서 5-15 분가량 배양하고, FACS Calibur (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

FITC에만 양성반응을 보이는 세포는 조기 세포자멸, FITC와 PI에 모두 양성반응을 보이는 세포는 후기 세포자멸 단계로, 이 두 가지 단계의 세포 수 비율의 합으로 세포주의 세포자멸을 평가하였다.

#### 7) Western Blotting

100 mm cell culture dish에  $2 \times 10^6$  cells/well 만큼 나누어 colony를 만들고 48 시간 배양한 후 5.5 mM Glucose DMEM, 0.5% FBS으로 24 시간 fasting시켰다. PA와 SHT, DHT 등을 처리한 뒤 24 시간 후에 1×cell lysis buffer+1mM PMSF를 사용하여 단백질을 추출하였고, 정량을 위해 제조사의 권고에 따라 Pierce BCA Protein Assay Kit를 이용

하였다. Sample buffer를 100mM DTT, 30% glycerol, 0.3% bromophenol blue, 187 mM Tris-HCL pH6.8 등에 희석해 95°C 환경에서 5 분간 유지시킨 후 10~12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. 전기적으로 gel 상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 이동시키고 1 시간 동안 상온에서 5% nonfat dry milk로 blocking 하였다. 4°C에서 overnight 하여 Cleaved Caspase-3, β-actin의 항체와 반응하게 만들고, TBS-T를 이용해 1:1000으로 희석하였다. 그 다음 TBS-T로 1:2500 희석되고 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체로 반응하도록 상온에서 1 시간 기다린 후, 재차 TBS-T로 1 시간 동안 세척하였다. 단백질들은 Enhanced Chemiluminescence Kit를 사용해 detecting하였고, 발현된 단백질들을 분석하기 위해 Davinch-Chemi™ Chemiluminescence Imaging System을 이용하였다. 결과 band의 intensity는 농도계로 측정하였다.

#### 8) Oil Red O staining

HepG2 cell의 중성지방 생성량을 확인하기 위해, intracytoplasmic lipids를 측정하는데 적합한 Oil Red O<sup>17)</sup>를 활용하여 염색을 하였다. 6well culture plates에  $3 \times 10^5$  cells/well 만큼 나누어 colony를 만들고 48 시간 배양한 다음, 24 시간 동안 5.5 mM Glucose DMEM, 0.5% FBS으로 fasting시켰다. PA와 SHT, DHT 등을 처리한 다음에는 24 시간이 지난 후 DPBS로 2회 세척하고 10% formalin으로 10 분간 고정하였으며, 60% isopropanol과 증류수로 세척하는 과정까지 거친 뒤 plates를 완전히 말려 isopropanol에 용해시킨 Oil Red O dye를 처리하였다. 20 분 동안 orbital shaker에 넣고 incubation한 다음 증류수를 이용하여 여러 번 세척하였고, 염색 정도 확인을 위해 200 배율 위상차 현미경으로 관찰하였다.

### 3. 통계 분석

실험을 통해 얻어진 결과는 Excel과 Prism program의 one-way ANOVA, Bonferroni's post

hoc test, Student's t-test 를 이용해 대조군과 실험군의 데이터 차이를 비교하였다. 통계적 유의성은 P 값( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )을 기준으로 하여 평가하였다.

## 결 과

### 1. PA와 SHT, DHT 추출물이 세포 활성도에 미치는 영향

0, 100, 200, 300  $\mu\text{M}$  농도의 PA 를 HepG2 세포주에 투여하여 24 시간 배양한 결과, 농도 의존적으로 세포수가 감소하였다.

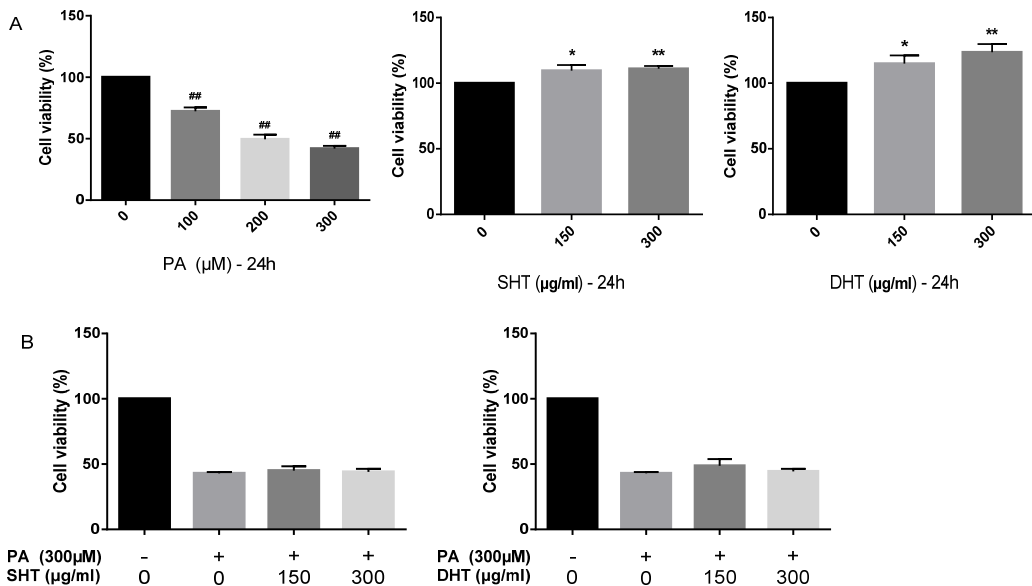
0, 100, 200, 300  $\mu\text{M}$  농도의 SHT, DHT 추출물을 HepG2 세포주에 투여하여 24 시간 배양하였을 때는 세포의 활성도에 저하가 없었으므로, 실험에 사용하는 약재 추출물에는 세포 독성이 없음을 알 수 있다(Figure 1. A). 또한 PA 와 SHT, DHT 추출물을 같이 처리한 경우 PA 만 처리했을 때 보다 세포 활성도가 증가하였다(Figure 1. B).

### 2. SHT, DHT 추출물이 Apoptosis 관련 mRNA (Bcl-2, Bax, Survivin, P21)에 미치는 영향

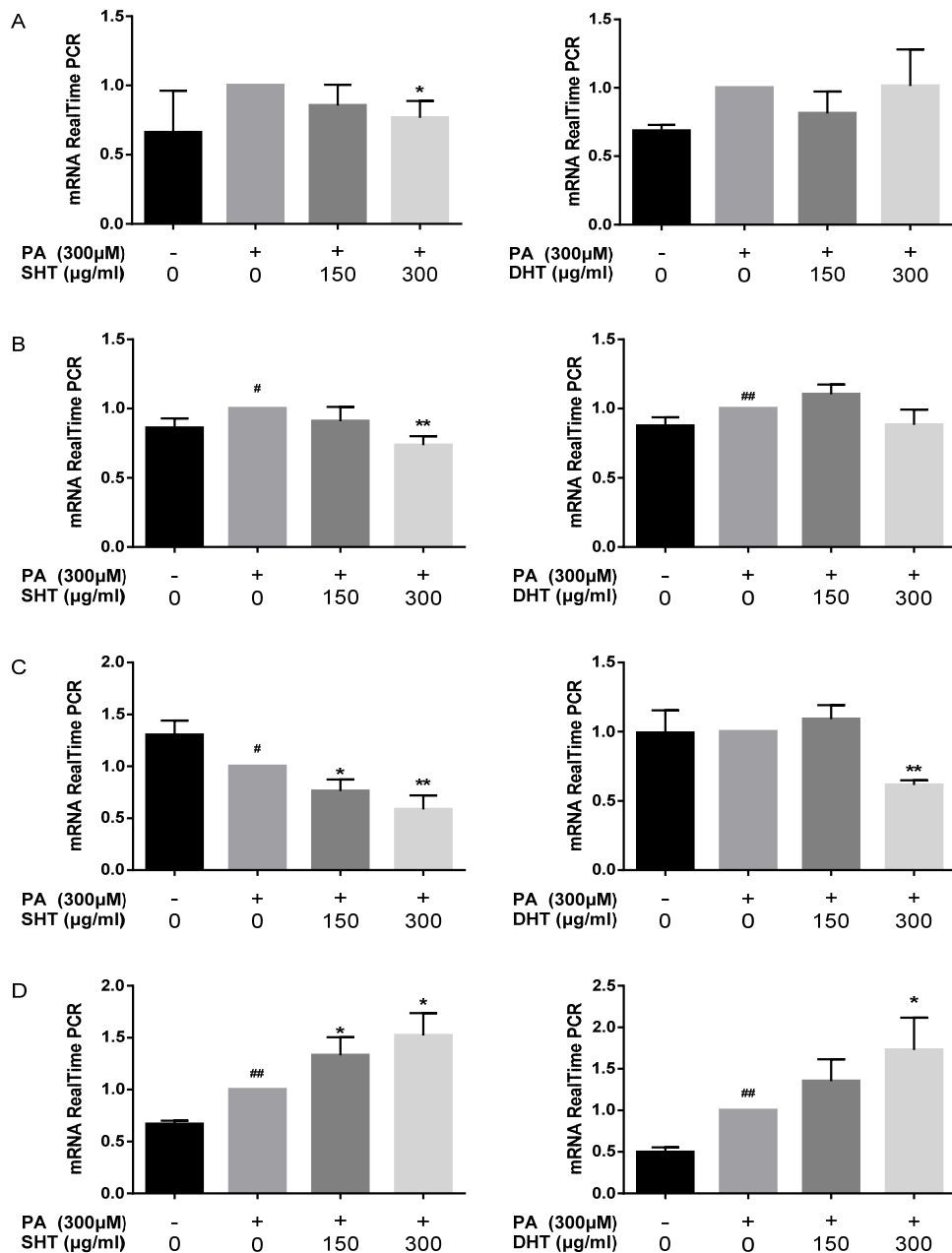
HepG2 세포주에 PA 와 SHT, DHT 추출물을 투여하고 24 시간이 지난 후 Bcl-2, Bax, Survivin, P21 mRNA 발현을 관찰하였다. PA 300  $\mu\text{M}$  만 처리한 군을 기준으로 하여 상대적인 변화를 확인하였다.

Bcl-2 mRNA 발현의 경우 SHT 추출물 300  $\mu\text{g/ml}$  투여군에서 유의하게 감소하였으며, DHT 추출물 투여군의 경우 유의한 차이는 나타나지 않았다(Figure 2.A). Bax mRNA 는 SHT 추출물 300  $\mu\text{g/ml}$  투여군에서 유의한 감소가 관찰되었으며, DHT 추출물 투여군은 뚜렷한 변화가 없었다(Figure 2.B).

Survivin mRNA 의 경우 PA 300  $\mu\text{M}$  투여군도 control 군보다는 감소함을 알 수 있었고, SHT 추출물 150, 300  $\mu\text{g/ml}$  투여군에서는 상대적으로 더욱 유의하게 줄어든 것을 확인하였다. DHT 추출물 투여군에선 300  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 Survivin mRNA 발현이 유의하게 감소하였다(Figure 2.C).



**Fig. 1.** Cell viability assay. After treatment of Palmiticacid(PA) and SHT, DHT extract on HepG2 cells, MTT assay was performed, PA was treated as 100, 200, 300  $\mu\text{M}$  for 24h. PA lowered viability of HepG2 cells. On the other hand, SHT, DHT extract(100, 200, 300  $\mu\text{g/ml}$ ) showed no toxicity to HepG2 cells(A). SHT, DHT extract increased viability of HepG2 cells treated with PA(B). Statistical significance was determined by one-way ANOVA test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  PA-treated group compared to control, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  SHT, DHT-treated group compared to control.

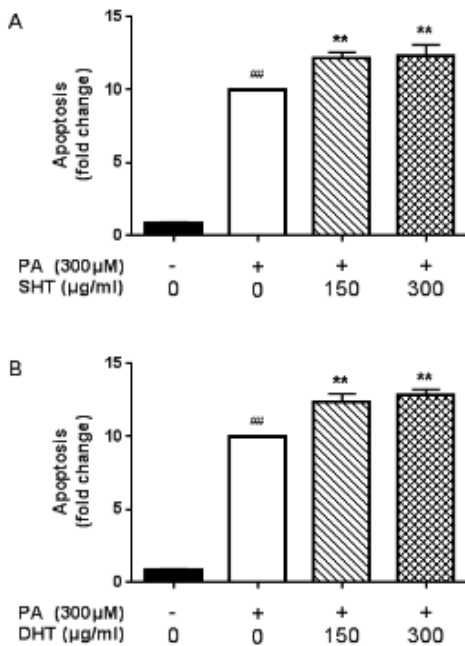


**Fig. 2.** Bcl-2, Bax, Survivin, P21 mRNA Expression Level. PCR was performed with 1  $\mu$ l of cDNA in 20  $\mu$ l reaction mixtures that comprised 10 ml of Power SYBR Green PCR Master Mix, 2  $\mu$ l of primers, and 7  $\mu$ l of PCR-grade water. The reactions were performed with a denaturation step at 95 $^{\circ}$  C for 10 min, 40 cycles of 95 $^{\circ}$  C for 15 s, and 60 $^{\circ}$  C for 1 min. The crossing point of the target genes with  $\beta$ -actin was calculated using the formula 2 (targetgene- $\beta$  actin), and the relative amounts were quantified. HepG2 cells were treated with 300  $\mu$  M of PA and 0, 150, 300  $\mu$  g/ml of SHT, DHT extract for 24 hours. Relative mRNA levels of Bcl-2(A), Bax(B), Survivin(C), P21(D) are represented on each bar graph. Statistical significance was determined by one-way ANOVA test. Also Bonferroni's test and Student's t-test were used to compare each set of data. #p<0.05, ##p<0.01 PA-treated group compared to control, \*p<0.05, \*\*p<0.01 SHT, DHT-treated group compared to PA-treated group.

P21 mRNA 는 PA 300  $\mu$ M 투여군에서 발현이 유의하게 상승하였고, SHT 추출물 150, 300  $\mu$ g/ml 투여군에서도 상대적으로 유의한 발현량 증가를 보였다. DHT 추출물 300  $\mu$ g/ml 투여군에서 역시 유의하게 발현량이 증가함을 알 수 있었다(Figure 2.D).

### 3. SHT, DHT 추출물이 apoptosis에 미치는 영향 (ELISA)

HepG2 세포주에 PA 300  $\mu$ M, SHT, DHT 추출물 0, 150, 300  $\mu$ g/ml 를 처리하고 24 시간 동안 배양한 후 세포자멸에 미치는 효과를 관찰하였다. Cell death detection ELISA kit 를 이용하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. PA 를 처리한 세포주에서 세포자멸이 유의하게 늘어남을 볼 수 있었고,

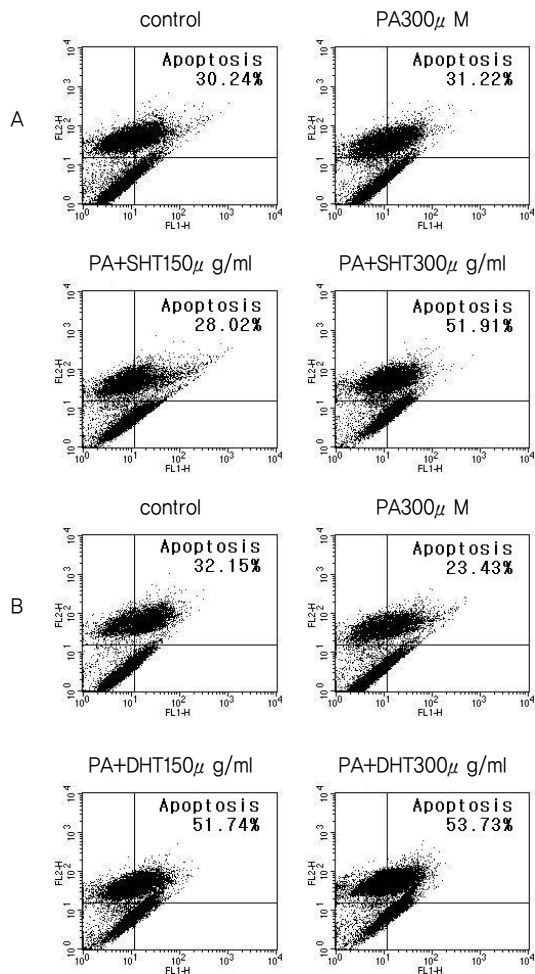


**Fig. 3.** SHT, DHT Extract Induced Apoptosis in HepG2 Cells. Apoptotic cells were detected by cell death detection ELISA kit(A)(B). Bar graph shows relative gradient of apoptosis in SHT, DHT-treated groups compared to PA-treated group. Statistical significance was determined by one-way ANOVA test,  $^{\#}p<0,05$ ,  $^{\#\#}p<0,01$  PA-treated group compared to control,  $^{*}p<0,05$ ,  $^{**}p<0,01$  SHT, DHT-treated group compared to PA-treated group.

SHT, DHT 추출물을 투여한 경우는 모두 농도의존적으로 세포자멸이 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 3. A,B).

### 4. SHT, DHT 추출물이 apoptosis에 미치는 영향 (FACS)

PA 300  $\mu$ M, SHT, DHT 추출물 0, 150, 300  $\mu$ g/ml 를 처리한 HepG2 세포주를 PBS buffer 로 씻



**Fig. 4.** FACS Histograms of Apoptosis Assays by Annexin V-FITC/PI Staining Method in HepG2 Cells. HepG2 cells were treated with 300  $\mu$ M of PA and 0, 150, 300  $\mu$ g/ml of SHT, DHT extract for 24 hours. The sums of proportion of early and late stage apoptotic cells are represented on each graph.

어내고 binding buffer 로 재침전 시킨 뒤, FITC 결합 Annexin-V 와 PI 5  $\mu$ l 로 염색하여, 실온의 어두운 환경에서 5-15 분 가량 배양하고, FACS Calibur 를 이용하여 세포수를 비교하여 분석하였다. 조기 세포사멸 단계(UR)와 후기 세포사멸 단계(LR)의 세포수 비율의 합을 구하여 약물이 apoptosis 에 미치는 영향을 평가하였다.

SHT 추출물 투여군에선 300  $\mu$ g/ml 농도에서 세포사멸이 급격히 증가하는 결과를 보였고(Figure 4. A), DHT 추출물 투여군에선 농도의존적으로 세포사멸이 증가하는 것으로 나타났다(Figure 4. B).

### 5. SHT, DHT 추출물이 Caspase-3에 미치는 영향 (Western Blotting)

SHT, DHT 추출물이 지방축적을 유도한 HepG2 세포주의 세포사멸에 어떠한 영향을 주는지 확실히 알아보기 위하여, cleaved Caspase-3 에 대한 Western Blotting 을 진행하였다. SHT, DHT 추출물을 처리하였을 때 농도의존적으로 cleaved Caspase-3 의 발현이 증가하였다(Figure 5. A, B).

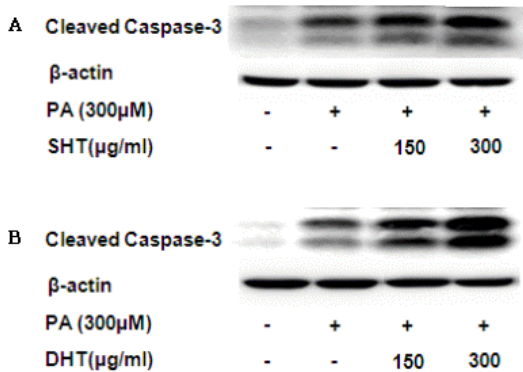


Fig. 5. The Cleaved Form of Caspase-3 Expression Level. SHT, DHT extract both showed concentration dependent increase of expression level of caspase-3.

### 6. SHT, DHT 추출물이 lipogenesis 관련 mRNA(TGF- $\beta$ 1, LXR- $\alpha$ , ChREBP, ACC1, SCD1)에 미치는 영향

HepG2 세포주에 PA 와 SHT, DHT 추출물을 처리하고 24 시간이 지난 후 mRNA 발현의 변화를 확인하였다.

TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현은 SHT, DHT 추출물 투여군에서 모두 유의한 증가를 보였다(Figure 6. A).

LXR- $\alpha$  mRNA 의 경우 SHT 추출물 300  $\mu$ g/ml 투여군에서 유의한 발현량 감소를 보였으며, 다른 실험군에선 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Figure 6. B).

ChREBP mRNA 는 SHT 추출물 150, 300  $\mu$ g/ml, DHT 추출물 300  $\mu$ g/ml 투여군에서 유의한 발현의 감소가 관찰되었다(Figure 6. C).

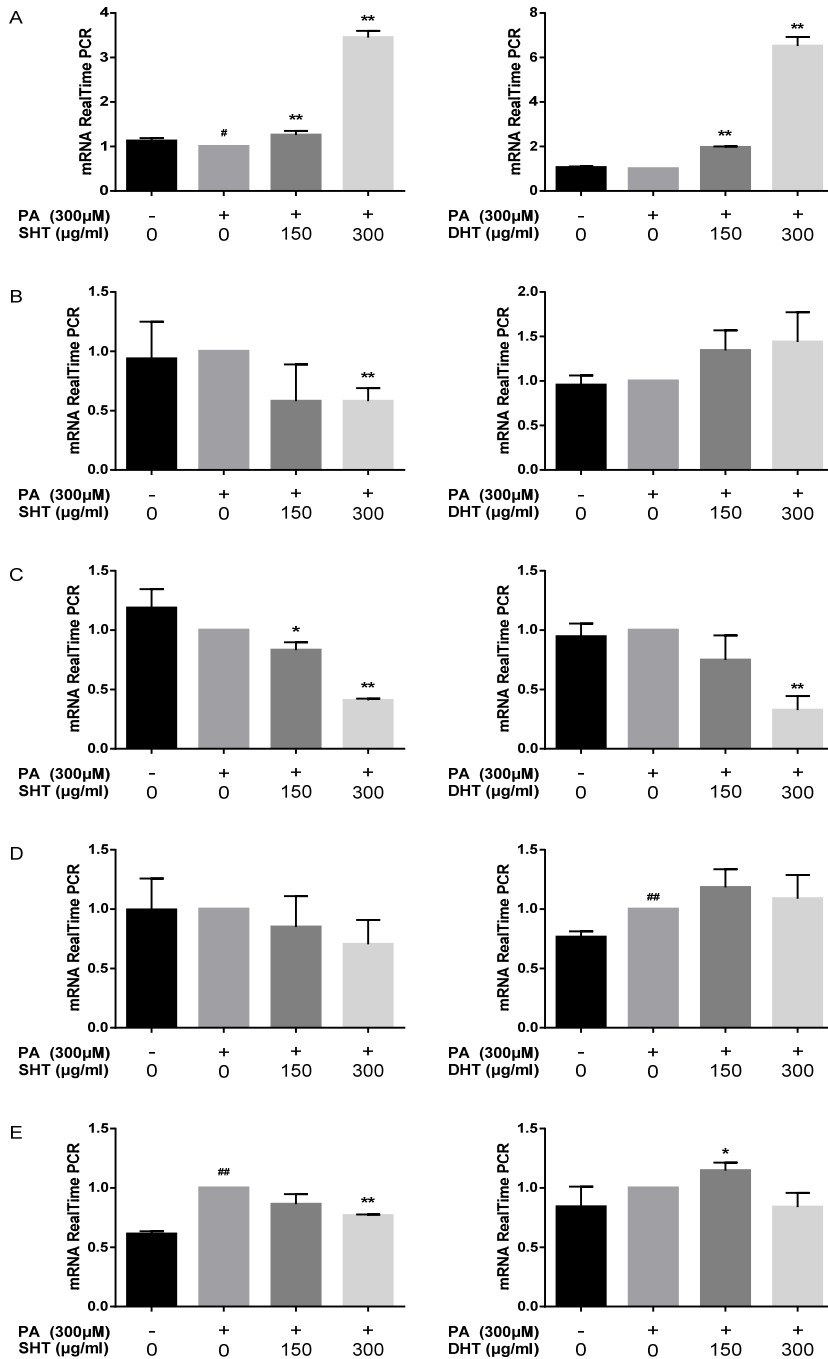
ACC1 mRNA 발현은 일부 PA 300  $\mu$ M 투여군에서 증가가 관찰되었다. SHT, DHT 추출물 투여군에서는 특별한 변화를 발견할 수 없었다(Figure 6. D).

SCD1 mRNA 는 PA 300  $\mu$ M 투여군에서 상대적인 발현량 증가가 있었고, SHT 추출물 300  $\mu$ g/ml 투여군에서 발현량이 유의하게 감소하였다. DHT 추출물은 150  $\mu$ g/ml 를 처리하였을 때 유의하게 SCD1 mRNA 발현량이 증가하였다가 300  $\mu$ g/ml 를 투여한 경우는 다시 감소하는 경향을 보였다(Figure 6. E).

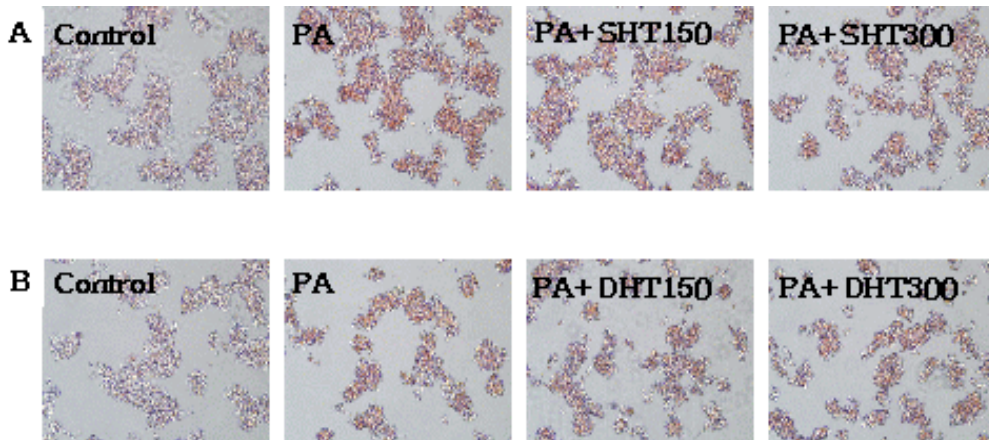
### 7. SHT, DHT 추출물이 세포 지방 축적에 미치는 영향

SHT 와 DHT 의 간세포 내 지방축적 감소 효과를 확인하기 위하여 HepG2 cell 에 PA 300  $\mu$ M 을 처리한 후, SHT, DHT 추출물을 각각 150, 300  $\mu$ g/ml 처리하였다. Oil Red O staining 을 통해 PA 가 HepG2 cell 의 지방 축적을 유도한 것을 확인할 수 있었으며, 이렇게 발생한 지방은 SHT, DHT 추출물을 함께 처리한 경우 농도 의존적으로 감소하였다 (Figure 7. A, B). 앞선 결과와 종합해 보면, SHT, DHT 추출물이 세포의 활성화는 저해하지 않지만 지방증을 감소시키는 효과가 있음을 추측할 수 있다.





**Fig. 6.** TGF-β 1, LXR-α, ChREBP, ACC1, SCD1 mRNA Expression Level, HepG2 cells were treated with 300 μ M of PA and 0, 150, 300 μ g/ml of SHT, DHT extract for 24 hours. Relative mRNA levels of TGF-β 1(A), LXR-α (B), ChREBP(C), ACC1(D), SCD1(E) are represented on each bar graph. Statistical significance was determined by one-way ANOVA test. Also Bonferroni's test and Student's t-test were used to compare each set of data, #p<0.05, ##p<0.01 PA-treated group compared to control, \*p<0.05, \*\*p<0.01 SHT, DHT-treated group compared to PA-treated group.



**Fig. 7.** Oil Red O staining of HepG2 Cells, PA 300  $\mu$  M for 24 h induced lipid accumulation in HepG2 cells. The cells were stained with Oil Red O and observed by microscope( $\times 200$ ): Control group cells were treated with only 1% BSA. Lipid accumulation was decreased in PA+SHT 150  $\mu$  g/ml group, and the least lipid accumulation was observed in PA+SHT 300  $\mu$  g/ml group(A). Also, lipid accumulation was lowered in PA+DHT 150  $\mu$  g/ml group, and the least lipid accumulation is detected in PA+DHT 300  $\mu$  g/ml group(B).

### 고찰 및 결론

비알코올성 지방간 질환(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 습관적인 알코올 남용이 없는 환자에게서 알코올성 간질환과 유사한 간의 조직학적 손상이 나타나는 질환으로, 고혈압과 고지혈증, 인슐린 저항성이나 비만 등과 같은 대사질환과 연관되어 흔히 발생한다<sup>18)</sup>. 최근 다양한 대사증후군의 발생이 증가하면서 NAFLD의 유병률도 늘어나고 있는데, 앞으로는 만성 간질환의 가장 중요한 원인으로 NAFLD가 지목될 가능성이 높다<sup>19)</sup>.

특히 인슐린 저항성은 초기 NAFLD에서 관찰되는 주된 병리적 변화로<sup>20)</sup>, 비만이나 인슐린 저항성이 있는 환자의 경우 혈중 유리지방산 농도가 증가하여 간으로의 유리지방산 유입이 많아지게 된다<sup>21)</sup>. 또한 혈중 인슐린 농도가 늘어나 간 내의 lipogenic gene들의 발현이 증가하게 되고, 지방산 합성이 많이 이루어진다<sup>22)</sup>. 결과적으로 간지방증은 지방산이 간으로 유입되거나 간 내의 지방산 합성이 늘어나 발생한다고 볼 수 있다. 따라서 약물의 지방간 치료 효과를 확인하기 위해선, 실험과정에서 실제 지방세포 축적의 변화를 보고, 지방산 합성과 관련된 gene

들의 발현 정도를 비교하는 것이 중요하다.

기존 연구에서 삼황사심탕은 비만을 유도한 동물 모델의 실험에서 대사질환 치료에 효과가 있다는 것이 보고되었으며<sup>13)</sup>, 비만으로 늘어난 체중과 간증량, 혈중 콜레스테롤 등을 유의하게 감소시키는 결과를 보였다<sup>23)</sup>.

대황황련사심탕의 구성약재인 대황, 황련, 황금 역시 동물실험에서 항고지혈 효과가 있다고 보고되어 있다<sup>15)</sup>. 특히 황련과 대황의 경우는 일부 동물실험에서 체중증가를 억제하는 결과가 보고되었는데<sup>24)</sup>, 이는 대사질환과 깊은 연관성이 있는 지방간에도 위 약물들이 응용될 가능성이 높다는 것을 말한다.

본 연구에서는 이전의 연구들을 바탕으로 삼황사심탕과 대황황련사심탕이 지방축적을 억제하는 효능이 있을 것으로 생각하고, 그 기전을 밝히기 위해 적합한 세포모델을 설정하여 실험을 진행하였다. 삼황사심탕은 《東醫寶鑑》의 처방구성을 참고하였고, 대황황련사심탕은 《金匱要略》의 처방구성을 바탕으로 실험을 진행하였다. HepG2 cell에 Palmitic acid를 처리하여 지방 축적을 유도하고, 약물이 어떤 기전으로 영향을 주는지 확인하기 위하여 삼황사심탕과 대황황련사심탕의 물추출물을 0, 150, 300  $\mu$

g/ml 의 농도로 처리하여 24 시간 배양하고 관찰하였다. 세포모델에 대한 효과를 보기 위하여 MTT assay, Real-time PCR, ELISA, FACS, Western Blotting, Oil Red O staining 등을 시행하였다.

Cell viability(MTT assay)의 결과에서 PA 투여는 HepG2 cell 의 세포활성을 감소시키고, 삼황사심탕과 대황황련사심탕은 각각 단독으로 투여하면 세포활성을 증가시키는 효과를 확인할 수 있었다. PA 와 한약재를 같이 투여하면 PA 만 투여하였을 때보다도 세포활성이 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다.

다음으로, 한약 추출물이 지방세포의 형성과 자멸에 어떤 영향을 주는지 관찰하기 위해 apoptosis 와 lipogenesis 관련 gene 들을 대상으로 Real-time PCR 을 진행하였다. Anti-apoptotic family 인 Bcl-2 와 pro-apoptotic 작용을 하는 Bax<sup>25)</sup> 두 가지 mRNA 의 발현을 관찰한 결과, 삼황사심탕 추출물 투여군에서 Bcl-2, Bax 의 발현이 모두 감소되는 것으로 나타나서 유전자 발현과 관련된 경향을 확인하기 어려웠다. 대황황련사심탕 추출물 투여군에서는 유의한 결과가 나타나지 않았다.

Survivin 은 세포자멸을 유도하는 Caspase-3 와 결합하여 그 활성화를 방해하는 단백질이다<sup>26)</sup>. 삼황사심탕과 대황황련사심탕 추출물 투여군에서 모두 Survivin 을 유의하게 감소시키는 결과가 나타났다. 또한 Cyclin dependent 인산화 효소의 활성 억제 단백질인 P21 은 세포주기를 G1 단계에서 멈추게 하여 세포자멸을 유도하는 역할을 하는데<sup>27)</sup>, 실험 결과 삼황사심탕과 대황황련사심탕 추출물 투여군 둘 다 농도의존적으로 P21 이 증가함을 알 수 있었다.

세포자멸과 관련하여 진행한 ELISA 및 FACS 의 결과에서는, 전체적으로 약물이 세포자멸을 유도하는 방향으로 결과가 나타났다. ELISA 의 경우, SHT, DHT 추출물 투여군 모두에서 농도의존적으로 세포자멸이 증가하는 것을 확인하였고, FACS 에서도 SHT 추출물 300 µg/ml, DHT 추출물 150, 300 µg/ml 투여군에서 세포자멸이 증가하는 것으로 나타났다.

Western blotting 으로 확인한 cleaved caspase-3<sup>28)</sup> 역시 SHT, DHT 추출물을 투여했을 때 증가하는 것으로 나타났다.

이상의 결과에서, PA 와 한약재를 동시에 투여하면 apoptosis 관련 유전자 및 단백질의 발현이 PA 단독 처리에 비하여 유의성 있게 증가하는 것으로 나타나는데, MTT assay 를 통해서 관찰되는 세포활성이 control 군에 비하여 감소되지 않게 나타나는 것은 삼황사심탕과 대황황련사심탕이 정상세포는 활성화 시키면서도 지방이 축적된 세포에 대해서는 세포자멸을 유도하는 양면적인 효과를 발휘하는 것으로 추정할 수 있다.

다음으로는 지방전구세포의 분화를 막고 지방축적에 관여하는 주요 enzyme 들을 억제하는 효과<sup>29)</sup>에 주목해 약물 처리 후의 변화를 확인하였다. TGF-β1 은 세포 내에서 다양한 조절 역할을 하는 단백질로<sup>30)</sup>, 삼황사심탕과 대황황련사심탕 추출물 투여군에서 모두 TGF-β1 mRNA 발현량의 유의한 증가가 나타났다. 특히 300 µg/ml 투여 시에는 현저한 증가를 보였다.

LXR-α 는 인슐린에 반응하여 지방산을 만들어내는 nuclear hormone receptor 로, ChREBP 를 타겟으로 ACC1, SCD1 과 같은 지방산 합성 유전자에 작용하여 지방 축적 과정에 관여한다<sup>31)</sup>. 삼황사심탕 추출물 투여군에서 LXR-α mRNA 가 유의하게 감소되었고, 대황황련사심탕 추출물 투여군에서는 약간의 증가가 있었지만 유의성은 인정되지 않았다.

Glucose 에 의해 발현되는 liver transcription factor 인 ChREBP 는 LXR 의 독립적인 타겟으로, 다양한 지방 합성 유전자들을 유도한다<sup>32)</sup>. 실험 결과 삼황사심탕, 대황황련사심탕 추출물 투여군에서 모두 유의한 감소를 보였고, 농도의존적으로 ChREBP mRNA 의 발현을 억제하였다.

ACC1 와 SCD1 은 주요 lipogenic enzyme 들로, 활성화되면 지방산과 중성지방 합성에 관여한다<sup>33)</sup>. ACC1 은 약물 투여군에서 유의한 변화가 관찰되지 않았지만, SCD1 은 삼황사심탕 추출물 300 µg/ml 투여군에서 발현량이 유의하게 감소하였다. 대황황

**Table 1.** Primer Sequences for PCR.

Genes	Primer sequence	Size (bp)
Bcl-2	5'-GATTGATGGGATCGTTGCCTTA-3' 5'-CCTTGCCATGAGATGCAGGA-3'	200
Bax	5'-GGATGCGTCCACCAAGAAG-3' 5'-GCCTTGAGCACCAAGTTTGC-3'	216
Survivin	5'-GGCCCAGTGTCTTCTCTGCTT-3' 5'-GCAACCCGGACGAATGCTTT-3'	91
P21	5'-CAGACCAGCATGACAGATTTC-3' 5'-TTAGGGCTTCCTCTTGAGA-3'	66
TGF-β1	5'-TGAACCGGCCTTTCCTGCTTCTCATG-3' 5'-GCGGAAGTCAATGTACAGCTGCCGC-3'	152
LXR-α	5'-GCCGAGTTTGCTTGGCTCA-3' 5'-TCCGGAGGCTCACCAGTCC-3'	187
ChREBP	5'-CAGCTGCGGGATGAGATTGA-3' 5'-AAACGCTGGTGTGTGATGGGA-3'	95
ACC1	5'-AGTGAGGATGGCAGCTCTGGA-3' 5'-TGAGATGTGGCAGCATGAAAC-3'	132
SCD1	5' CCGGGAGAATATCCTGGTTT 3' 5' GCGGTACTCACTGGCAGAGT 3'	97
β-actin	5'-GCGAGAAGATGACCCAGATC-3' 5'-GGATAGCACAGCCTGGATAG-3'	77

련사심탕을 150 µg/ml 처리하였을 때 SCD1 발현량의 유의한 증가가 보이나, 300 µg/ml 투여군의 경우는 다시 감소하는 경향을 보였다.

이상 lipogenesis 와 관련된 real-time PCR 결과를 종합해보면, 삼황사심탕 추출물은 ACC1 을 제외한 다른 mRNA 발현을 농도의존적으로 억제하였고, 대황황련사심탕 추출물 역시 TGF-β1, ChREBP 의 발현을 억제하는 것으로 확인되었다. 삼황사심탕과 대황황련사심탕이 지방 합성에 관여하는 인자들은 억제하고, 지방세포 분화를 막는 TGF-β1 은 늘리는 것으로 보아, 간세포의 지방변성을 막고 지방축적을 억제하는 효과가 있다고 사료된다.

이러한 분자생물학적 기전이 세포모델의 지방 축적을 실제로 어떻게 변화시키는지 관찰하기 위해 Oil Red O staining 을 시행하였다. 삼황사심탕, 대황황련사심탕을 처리한 두 군에서 모두 붉은색으로 염색된 지방 축적이 감소되는 것으로 나타났으며, 이는 한약재 처리가 LXR-α 와 ChREBP 의 유전자

활성을 감소시켜 PA 로 인한 세포 내의 지방산 합성을 억제하였기 때문인 것으로 사료된다.

따라서 삼황사심탕과 대황황련사심탕은 지방축적이 일어난 세포의 세포자멸을 유도하고, 간세포의 지방 축적과 관련된 신호 전달 과정을 막아 간지방증의 치료에 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 하지만 두 약물 모두 간보호 효과에서 미흡한 결과가 보여, 기타 간손상이나 염증으로 진행된 질환에 대해서는 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다. 또한 기존의 동물실험에서 밝혀진 중성지방 억제 효능을 확실히 검증하기 위하여, 본 약물의 total cholesterol, triglyceride 억제 기전을 좀 더 심도 있게 연구하는 과정이 필요할 것이다.

### 참고문헌

1. Bellentani S, Bedogni G, Miglioli L, Tiribelli C. The epidemiology of fatty liver. *European*

- journal of gastroenterology & hepatology, 2004; 16(11):1087-1093.
2. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *The American journal of medicine*. 1999;107(5):450-455.
  3. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl A M, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005-2023.
  4. Anstee QM, Day CP. The Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Spotlight on PNPLA3 and TM6SF2. In *Seminars in liver disease*. 2015;35(3):270-290.
  5. Angulo P. GI epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007;25(8):883-889.
  6. Ministry of Food and Drug Safety. Influence of dietary intake on non-alcoholic fatty liver disease in Koan.Cheongwon, Korea: Ministry of Food and Drug Safety. 2012
  7. Jang E, Shin MH, Kim KS, Kim Y, Na YC, Woo HJ. Anti-lipoapoptotic effect of *Artemisia capillaris* extract on free fatty acids-induced HepG2 cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2014;14(1):253.
  8. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114(2):147.
  9. Park SH. Nonalcoholic fatty liver disease: treatment. *Korean Journal of Medicine*. 2010; 79(5):481-489.
  10. Han CW, Lee JH. Effects of KHchunggan -tang on the nonalcoholic fatty liver disease in palmitate-induced cellular model. *J Korean Oriental Med*. 2011;32(1):109-110.
  11. Kim SY, Kwon JN, Lee I, Hong JW, Choi JY, Park SH, et al. Research on Anti-lipogenic Effect and Underlying Mechanism of *Laminaria japonica* on Experimental Cellular Model of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *The Journal of Korean Oriental Internal Medicine*. 2014; 35(2):175-183.
  12. Choi MY, Woo HJ, Kim YC, Lee JH. Effects of Gamisaenggan-tang on High Fat Diet-induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Korean J. Orient. Int. Med*. 2009;30(2): 365-374.
  13. Lee JY, Yoon BK. Effects of Samhwangsasim -tang on obesity-related metabolic diseaseinmice. *Dept. of Korean Medicine*. 2014;22(1):93-104.
  14. Yoon HJ, Park YS. Effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on lipid metabolism and antioxidant defense system in rats fed high fat diet. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2010.
  15. Ro HS, Ko WK, Kim OJ, Park KK, Cho YW, Park HS. Antihyperlipidemic Activity of *Scutellaria baicalensis* Georg., *Coptidis japonica* Makino and *Rheikoreanum Nakai* on Experimental Hyperlipidemia in Rats. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 1996;26(3): 215-219.
  16. Choi SE, Jung IR, Lee YJ, Lee SJ, Lee JH, Kim Y, et al. Stimulation of lipogenesis as well as fatty acid oxidation protects against palmitate-induced INS-1  $\beta$ -cell death. *Endocrinology*. 2011;152(3):816-827.
  17. Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil Red O. *Histochemistry*. 1992;97(6):493-497.

18. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(31): 32345-32353.
19. Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park D I, Cho YK. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2006;21(1): 138-143.
20. Marra F, Gastaldelli A, Baroni GS, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(2):72-81.
21. Wahren J, Sato Y, Ostman J, Hagenfeldt L, Felig P. Turnover and splanchnic metabolism of free fatty acids and ketones in insulin-dependent diabetics at rest and in response to exercise. *Journal of Clinical Investigation*. 1984;73(5): 1367.
22. Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(31): 11245-11250.
23. Chung MH, Han SJ. Effect of composite preparation of crude drugs on experimentally induced hyperlipemia in rats-Sam WhangSasim Tang and Whang Ryun Haedok Tang. *Korean Journal of Pharmacognosy (Korea Republic)*. 1996;7(2):46-54
24. Oh MG, Song YS. Influence of RhizomaRhei water extract on the obese mouse model. *J Oriental Rehab Med*. 1997;7(2):46-54.
25. Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *cell*. 1993;74(4):609-619.
26. Tamm I, Wang Y, Sausville ED, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer research*. 1998;58(23): 5315-5320.
27. Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman B E, Herren B, Orth K, et al. Cleavage of p21 Cip1/Waf1 and p27 Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Molecular cell*. 1998; 1(4):553-563.
28. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*. 1996;6(2):99-104.
29. Petruschke TH, Röhrig K, Hauner H. Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits the differentiation of human adipocyte precursor cells in primary culture. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1994;18(8):532-536.
30. Nam IK, Yoo J. Downregulation of SGK1 Expression is Critical for TGF-β-induced Apoptosis in Mouse Hepatocytes Cells. *Journal of life science*. 2012;22(11):1500-1506.
31. Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis The carbohydrate -response element-binding protein is a target gene of LXR. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(1):743-751.
32. Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and experimental gastroenterology*. 2014;7:221.
33. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y,

(76) 대한한의학회지 제37권 제1호 (2016년 3월)

Lobaccaro JMA, Shimomura I. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR $\alpha$

and LXR $\beta$ . Genes & development. 2000; 14(22):2819-2830.