



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

지방세포에서 황금과 시호의 상수효과
연구

Study on Interaction between Scutellariae Radix
and Bupleuri Radix in 3T3-L1 adipocytes

지도교수 엄재영

지도교수 장형진

경희대학교 대학원
한의생명과학과

박 혜 원

2016년 8월

지방세포에서 황금과 시호의 상수효과 연구

Study on Interaction between Scutellariae Radix
and Bupleuri Radix in 3T3-L1 adipocytes

지도교수 엄재영

지도교수 장형진

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

경희대학교 대학원
한의생명과학과

박 혜 원

2016년 8월

박혜원의 한의학 석사학위 논문을 인준함

주심교수 이 석 근 ①

부심교수 김 수 진 ①

부심교수 장 형 진 ①

부심교수 엄 재 영 ①

경희대학교 대학원

2016년 8월

<목 차>

List of Tables	iii
List of Figures	iv
국문 초록	vi
I. 서론	1
II. 실험 재료 및 방법	10
1. 재료	10
2. 세포 독성 검사	10
3. 세포의 배양 및 분화	10
4. Oil Red O 염색	11
5. RNA 추출과 real-time RT-PCR	11
6. 단백질 추출과 western blot assay	14
7. 통계 분석	14
III. 실험 결과	15
1. 세포 독성 시험 결과	15
2. 시호와 황금의 3T3-L1 세포 지방축적 억제 효과	18
3. 시호와 황금의 지방세포 분화조절 인자 유전자 발현 억제효과	21
4. 시호와 황금의 지방세포 분화조절 인자 단백질 발현 억제효과	26
5. 시호-황금 배합물의 3T3-L1 세포 지방축적 억제 효과	29
6. 시호-황금 배합물의 지방세포 분화조절 인자 유전자 발현 억제효과	32

7. 시호-황금 배합물의 지방세포 분화조절 인자 단백질 발현 억제효과	35
IV. 고찰	38
V. 결론	46
VI. 참고 문헌	48
Abstract	56



List of Tables

Table 1. Primer sequences (5' to 3') for real-time RT-PCR 13

Table 2. Examples of pairs and ratios of Chiljeong 40



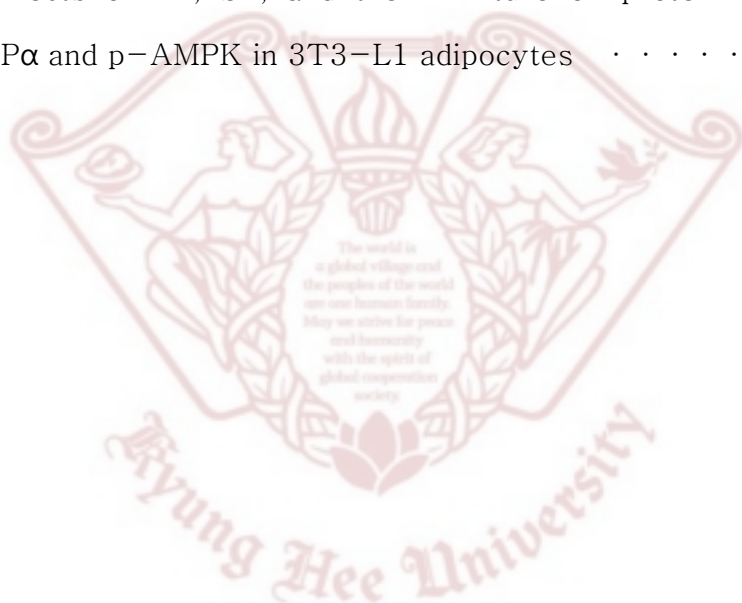
List of Figures

Figure 1. Outline of the transcriptional cascade controlling adipocyte differentiation	4
Figure 2. Regulation of energy homeostasis of the AMPK system	6
Figure 3. Effects of BR and SR on 3T3-L1 cell viability	16
Figure 4. Effect of BR on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes	19
Figure 5. Effect of SR on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes	20
Figure 6. Effect of BR on mRNA expressions of PPAR γ , C/EBP α and other adipogenic genes in 3T3-L1 adipocytes	22
Figure 7. Effect of SR on mRNA expressions of PPAR γ , C/EBP α and other adipogenic genes in 3T3-L1 adipocytes	24
Figure 8. Effect of BR on protein expressions of PPAR γ , C/EBP α and p-AMPK in 3T3-L1 adipocytes	27
Figure 9. Effect of the SR on protein expressions of PPAR γ , C/EBP α and p-AMPK in 3T3-L1 adipocytes	28

Figure 10. Effects of BR, SR, and their mixture on lipid accumulation in 3T3–L1 adipocytes 30

Figure 11. Effects of BR, SR, and their mixture on mRNA expression of PPAR γ , C/EBP α and other adipogenic genes in 3T3–L1 adipocytes . . . 33

Figure 12. Effects of BR, SR, and their mixture on protein expression of PPAR γ , C/EBP α and p–AMPK in 3T3–L1 adipocytes 36



국문 초록

지방세포에서 황금과 시호의 상수효과 연구

박 혜 원

한의생명과학과

경희대학교 대학원

지도교수 엄재영

지도교수 장형진

한약의 배합에 의한 처방은 한의학의 고유한 원리이며, 그 배오(配伍)의 원리에는 군신좌사(君臣佐使), 칠정(七精), 약대(藥對) 등이 있다. 본 연구에서는 한약의 배합에 대한 근거를 제시하고자 하였다. 특히, 「신농본초경(神農本草經)」에 소개된 본초 간의 칠정(七情) 중 특히 상수(相須) 관계에 해당하는 시호와 황금의 상호 작용을 세포의 비만 모델에서 확인하였다. 3T3L-1 지방세포에서 지방축적과 분화에 대한 억제효과를 확인하기 위해 Oil Red O 검사, 실시간 역전사효소 중합반응(real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, real-time RT-PCR), western blot 의 방법을 실행하였다. Oil Red O 검사를 통한 3T3-L1 지방세포의 지방 축적에 있어서 시호와 황금의 열수추출물이 지방축적을 유의하게 억제함을 확인하였다. Real-time RT-PCR 분석을 통하여 지방세포분화인자인 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), adiponectin, adipocyte selective fatty acid binding protein(aP2), adiponectin, LIPIN1 의 유전자 발현을 확인한 결과, 시호 및 황금의 열수추출물이 PPAR γ , C/EBP α , adiponectin, aP2 및 LIPIN1 의 유전자 발현을 농도의존적으로 유의하게 억제함을 확인하였고, 더욱이 시호와 황금을 일대일로 배합하여 처리한 군의 경우, 배합물의 억제효과가 시호 및 황금 단독처리군에 비해 더 탁월함을 확인하였다. 이와 같은

시호-황금 배합물의 단독처리에 비해 탁월한 억제 효과는 western blot 방법을 통한 PPAR γ 와 C/EBP α 의 단백질 발현에 대해서도 유사한 결과를 보였다. 또한 에너지 대사의 핵심 인자인 AMPK 에 대하여 시호와 황금 추출물은 AMPK 의 활성화를 유도하는 현상을 보였는데, 이 또한 시호-황금 일대일 배합물을 처리한 군에서 더욱 효과적으로 활성화를 일으킴을 확인하였다.

본 연구는 소시호탕의 주요 구성 약재이자 칠정(七情)이론 중 상수(相須)의 대표적인 조합인 시호와 황금의 상호작용효과를 지방세포를 이용한 비만 모델에서 확인하였으며, 이러한 결과를 통해 한약의 고유 처방방식인 다중약재의 배오에 대한 실험적 근거를 도출하였다. 본 연구는 시호와 황금의 비만치료제로서의 새로운 가능성을 제시할 뿐 아니라 상수(相須) 관계를 비롯한 다른 배오의 원리를 입증하기 위한 근거로서 제시될 수 있다.

핵심어

비만, 칠정(七情), 상수(相須), 시호, 황금

I. 서론

한약을 처방함에 있어 둘 이상의 본초를 조합하는 것은 한약처방의 일반적이며 고유한 방법이다. 현존하는 최초의 본초전문서인 「신농본초경(神農本草經)」은 365 가지의 본초를 소개하고, 기미(氣味)와 귀경(歸經), 특징에 따른 분류 등을 수록하였을 뿐만 아니라 한가지 본초를 투여했을 때의 약물 작용과 더불어 두 가지 이상의 본초를 배합함으로써 약의 효과를 더욱 증대시키고, 부작용을 감소시키도록 처방하는 원칙을 제시하고 있다(1). 이러한 처방구성의 원칙은 배오(配伍)라고도 부르는데, 「신농본초경(神農本草經)」에서 제시하는 배오의 종류로는 군신좌사(君臣佐使)와 칠정(七情), 약대(藥對)가 있다. 군신좌사(君臣佐使)란 군약(君藥), 신약(臣藥), 좌약(佐藥), 사약(使藥)으로 한 처방이 구성됨을 말하는 것이다. 군약은 주증(主證)을 치료하는 주약(主藥)의 역할을 하며, 신약(臣藥)은 주약(主藥)에 협조하거나 주약(主藥)의 약력을 증강시키는 역할을, 좌약(佐藥)은 주약(主藥)에 협조하며 겸증(兼證) 치료나 독성을 억제하는 역할을, 사약(使藥)은 각 약물의 작용을 조화시키는 역할을 한다(2). 칠정 배오(七情 配伍)란 두 가지 약물들이 서로 배합될 때 나타날 수 있는 약물상호의 작용관계를 7 가지로 나누어 설명한 것을 말하며, 그 종류로는 단행(單行), 상수(相須), 상사(相使), 상외(相畏), 상오(相惡), 상쇄(相殺), 상반(相反) 등이 있다. 약대(藥對)란 두 종류의 약물을 함께 사용하여 치료효과를 증진시키고, 독성을 감소하고자 하는 것을 말한다(3).

비만이란 체내에 지방이 과잉 축적된 상태이다. 비만은 고혈압, 심혈관질환, 제 2 형 당뇨병, 이상지질혈증, 퇴행성관절염, 수면무호흡증, 몇몇 암 등의 이환과 깊은 연관이 있으며(4), 이러한 질환들은 체중감량을 통해 예방 또는 개선이 가능하다. 이는, 비만은 흡연에 이어 두 번째로, ‘예방 가능한 죽음(preventable death)’을 야기하는 원인임과도 일맥상통한다(5). 전세계적으로 비만인구는 지속적으로 증가하고 있으며, 세계보건기구(WHO, World Health

Organization)에서는 전 세계적으로 성인 기준 1 억명 이상이 과체중(BMI \geq 25) 혹은 비만(BMI \geq 30)일 것으로 추정하고 있다. 뿐만 아니라, 미국을 기준으로 아동 중 25%가 과체중 혹은 비만이며, 이러한 수치는 2025 년이 되면 절반 이상이 될 것으로 보이고, 이는 개발도상국에서 더욱 심각한 영향을 끼친다는 점이다(6). 또한 비만 및 유관질환에 의한 경제적 비용 역시 막대하여 미국을 기준으로 매년 약 1 조달러에 해당한다(7).

한의학에서는 비만을 비(肥), 비만(肥胖), 비인(肥人), 비귀인(肥貴人), 육인(肉人), 등으로 표현해 왔다(8). 「황제내경(黃帝內經) 영추(靈樞)·위기실상편(衛氣失常篇)」에서는 비인(肥人)을 비(肥), 고(膏), 육(肉)의 세 종류로 나누고, 비만의 원인에 대해 “곡기승원기, 비위구왕, 비위구허, 비곤사승, 담음, 기허, 혈실 기허, 삭식감미(穀氣勝元氣, 脾胃俱旺, 脾胃俱虛, 脾困邪勝, 痰飲, 氣虛, 血實氣虛, 數食甘味)”와 고량후미(膏粱厚味)를 언급하고 있으며(9), 이는 수명을 단축시킬 수 있는 일이라고 하여(10) 비만은 단순한 체형의 변화가 아닌 건강한 삶을 영위하기 위해 치료해야 할 질환임을 설명하고 있다.

현대 의학의 임상에서 사용되는 비만 치료제는 여러 기전을 통해 비만을 치료하고자 하고 있다. 그 예로는 소장에서 지질분해를 억제하여 지방흡수를 감소해 항비만 효과가 있는 orlistat, 세로토닌 재흡수 억제제로 식욕을 감소시키는 sibutramine, 로카세린염산염수화물 등이 있다. 그러나 이러한 비만치료제는 체중 감소의 효과에도 불구하고 부작용사례들이 보고되어 사용이 제한되고 있다. 예를 들어, 앞서 언급한 세로토닌 재흡수 억제제 sibutramine 은 심혈관계 관련 부작용의 우려로 2010 년 10 월 FDA 에서 승인을 취소하고 현재는 사용을 제한하고 있으며, sibutramine 외에도 Fenfluramine, Dexfenfluramine, Rimonabant 등이 FDA 승인 이후 승인이 취소되어 사용이 제한되는 등 아직까지 부작용이 없는 완전한 비만치료제는 시판되지 않는 실정이다(11). 따라서 오랜 기간 사용되어 독성의 위험이 적으면서 체중감소에 효과적인 천연기능물질, 한약기원 물질에 의한 비만치료 약물개발에 관심이 높아지는 추세이다(12, 13).

비만을 세포단위에서 살펴보면, 지방전구세포의 분화 및 adipogenesis 과정에 의하여 지방세포의 세포 내 중성지방(triglyceride, TG)의 축적으로 인해 발생하고, 이러한 기전을 조절하는 것이 효과적인 비만억제를 위한 약물기전으로 알려져 있다(14). Adipogenesis 는 지방세포가 만들어지는 과정으로서 세포의 분화에 있어 세포 형태, 유전자와 단백질 발현, 호르몬 민감도의 변화 등을 동반하는데(15, 16), 그 중 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 및 cytidine-cytidine-adenosine-adenosine ethymidine (CCAAT)/enhancer binding proteins(C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ) 등과 같은 adipogenic transcription factor 등이 중요한 조절인자가 된다(17). 특히, 이 중 C/EBP β 와 C/EBP δ 는 insulin, dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 등과 같은 hormonal cocktail 에 의해 분화초기에 일시적이고 빠르게 발현되는 반면, C/EBP α 와 PPAR γ 는 분화 후기에 발현되고, 지방세포에 특이적인 유전자의 발현을 활성화하여 분화를 더욱 촉진시킨다(18). 지방세포를 가지는 동물모델에서 C/EBP α 를 제거하였을 때, 지방축적이 나타나지 않는 것이 관찰되어 효과적인 비만 억제를 위해서는 지방세포 분화과정에 관여하는 전사인자들의 활성을 억제하는 것이 매우 중요한 것으로 밝혀졌다(19-21). 지방분화과정에서 PPAR γ 와 C/EBP α 를 비롯한 다양한 관련 인자에 대한 모식도는 Figure 1 과 같다.

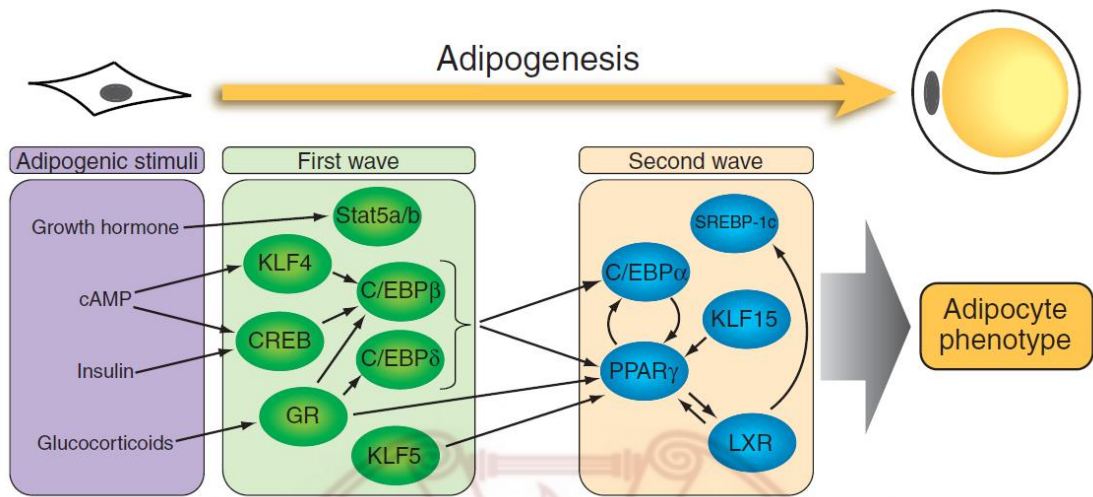


Figure 1. Outline of the transcriptional cascade controlling adipocyte differentiation(22). The adipogenic cocktail of inducers (i.e., insulin, glucocorticoids, a cAMP elevating agent, and serum containing high levels of growth hormone) activates the first wave of adipogenic transcription factors, which jointly induce the second wave of factors. The second wave, in which PPAR γ and C/EBP α play a key role, directly induces and maintains the mature adipocyte phenotype. For simplicity, only a subset of transcription factors and interconnections are indicated.

또한 세포 내의 에너지 항상성 유지에 센서 역할을 하는 효소인 AMP-activated protein kinase(AMPK)는 대사성 스트레스나 운동에 의해 세포 내의 에너지가 감소하는 경우, 즉 ATP 가 고갈되어 AMP/ATP 비율이 증가하는 경우에서 활성화되어 지방산 합성과 콜레스테롤 합성 등 ATP 를 소비하는 과정을 억제하고 지방산 산화와 해당과정 등 ATP 를 생산하는 과정을 촉진한다(Figure 2)(23). 간에서 AMPK 가 활성화되면 지방산과 콜레스테롤의 합성을 억제하고 지방산의 산화를 촉진하며, 골격근에서 AMPK 가 활성화되면 지방산의 산화와 당 흡수를 촉진하며 지방세포에서는 지방분해와 지방생성을 억제한다. 또한 췌장 β 세포에서 AMPK 의 활성화는 인슐린 분비를 촉진시킨다(24). 또한 AMPK 는 fatty acid synthase, pyruvate kinase, ACC 와 같은 지질 합성에 관계된 유전자 발현을 억제시켜, 백색지방세포 분화와도 연관되어있다(25, 26). Malonyl-CoA 를 합성하는 역할을 하는 ACC 효소는 지방산 합성에 중요한 전구체이자 미토콘드리아의 지방산 산화에 대한 잠재적인 억제자의 역할을 한다. AMPK 에 의한 ACC 불활성화는 malonyl-CoA 의 농도저하를 초래하고, carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1)의 활성도를 증가시켜 지방산 산화를 증가시킨다. aP2 는 지질 세포질막의 샤프론(chaperones)으로 작용하며, 지질신호의 역할을 한다. 또한 아디포넥틴(adiponectin)은 지방세포에서 분비되는 아디포카인(adipokine)의 하나로서 특히 지방신호에 연관되는 것으로 알려져 있다(27). 또한 LIPIN1 은 지방조직, 간, 평활근에서 가장 먼저 발현되는 고유단백으로(28), 세포 지질과 에너지대사 조절에 중요한 역할을 하는 아디포카인이며(29), 또 다른 측면에서 보자면 지방이상증(lipodystrophy)의 후보인자이기도 하다(28).

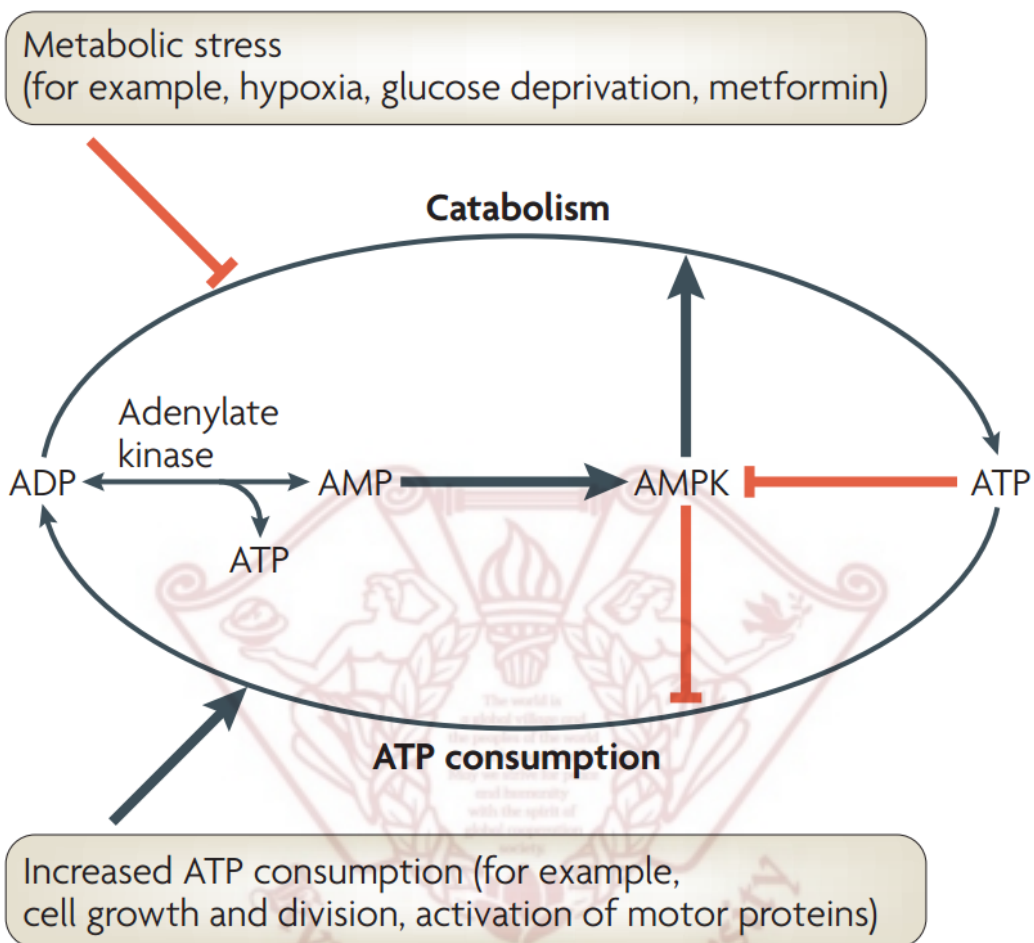


Figure 2. Regulation of energy homeostasis of the AMPK system(23). Under unstressed conditions (adequate carbon source and oxygen, optimal environment), catabolism maintains a high ratio of ATP:ADP. This drives the adenylate kinase reaction in favour of ADP synthesis and, consequently, the cellular AMP:ATP ratio is low and AMP-activated protein kinase (AMPK) is inactive. However, if the cell is subjected to a metabolic stress that interferes with ATP synthesis (for example, hypoxia, glucose deprivation or a metabolic inhibitor such as metformin) or a stress that accelerates ATP consumption (for example, activation of motor proteins, ion pumps or channels, or biosynthetic pathways), the ADP:ATP ratio tends to increase. This is

amplified by adenylate kinase into a much larger increase in the AMP:ATP ratio that then switches on AMPK. In turn, AMPK restores energy homeostasis by promoting catabolism and inhibiting ATP-consuming processes.



시호(柴胡, Bupleuri Radix)는 「신농본초경(神農本草經)」에 “주심복거장 위중결기(主心腹去腸胃中結氣), 음식적취(飲食積聚), 한열사기(寒熱邪氣), 추진치신(推陳致新)”라고 한 이후, 화해표리(和解表裏)·소간(疏肝)·승양(升陽)의 효능으로 감모발열(感冒發熱), 한열왕래(寒熱往來), 흉협창통(胸脇脹痛), 월경부조(月經不調), 자궁하수(子宮下垂), 탈항(脫肛) 등의 치료에 사용된다(3). 시호에 대한 현대 연구의 결과로는 해열작용, 진정, 진통, 진해작용, 항균 및 항바이러스 작용, 항염작용, 면역기능 촉진 작용, 지방의 대사와 간, 담에 대한 영향, 위궤양의 억제, 소화기계 운동에 대한 영향, 물질대사에 대한 영향, 배뇨에 대한 영향 등이 있다(30). 시호의 항비만 효과에 대한 연구로는, 시호의 성분인 saikosaponin a가 ERK/NF- κ B 기전을 통해 3T3-L1 지방세포의 분화를 억제한다는 보고가 존재한다(31).

황금(黃芩, Scutellariae Radix)은 꿀풀과(Labiatae)에 속한 다년생 초본인 황금(*Scutellaria baicalensis georgi*)의 뿌리를 건조한 것으로 성미는 고(苦), 한(寒), 무독(無毒)하고 고(苦)로 조습(燥濕)하고 한(寒)으로 청열(淸熱)하여 폐(肺), 담(膽), 위(胃), 대장(大腸)의 습열(濕熱)을 청리(淸利)하여 열병(熱病)의 번열부퇴(煩熱不退), 습열(濕熱)로 인한 비만(痞滿), 사리복통(瀉痢腹痛), 황달(黃疸) 등에 상용(常用)하며, 사화해독(瀉火解毒)하는 효능(效能)이 있어 열적(熱積)에 의한 하사하혈(下瀉下血) 혹은 옹저정창(癰疽疔瘡), 목적종통(目赤腫痛)에도 유효하다(3). 황금의 비만에 관한 연구로는, 황금의 주된 성분인 baicalin이 adipogenesis pathway에서 PDK1/Akt phosphorylation을 억제하여 3T3-L의 adipocytes로의 분화를 억제한다는 내용에 관한 연구가 있다(32-34). 또한 baicalein은 COX-2의 발현을 증가시킴으로써, 그리고 wogonin은 PPAR α 활성화를 통해 이상지질상태를 개선시키는 내용에 관한 연구가 있다(35-39).

시호(柴胡)와 황금(黃芩)은 동한시대(東漢時代) 장중경(張仲景)의 저서인 「상한론(傷寒論)」에 처음 수록되어 현대 임상에서도 널리 사용되는 처방인 소시

호탕(小柴胡湯)의 주요 배오 약제로, 소시호탕은 시호(柴胡) 12g, 황금(黃芩) 8g, 인삼(人蔘) 4g, 반하(半夏) 4g, 감초(甘草) 2g, 생강(生薑) 3g, 대조(大棗) 3g으로 구성된 처방이다(10).

시호와 황금에 대한 현대적 연구로는, 시호와 황금의 투여가 B(a)P에 의한 간독성의 발현을 유의성 있게 감소시켰으며 그 효과는 단독 투여에 비해 복합 투여가 전처리에 비해 후처리가 현저하였음을 보고한 연구가 있다(40). 이외에도 간세포암에 대한 화학적 예방효과 (41), 및 파킨슨병의 주요 침범범위인 뇌의 흑질선조체의 도파민계에 대한 신경보호효과(42), 간세포 재생 및 성장효과에 관한 연구(43) 등 몇몇 연구가 선행되었으나, 황금과 시호의 상수효과에 대한 비만관련 세포수준의 연구는 아직까지 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 시호와 황금의 열수 추출물의 항 비만효과가 시호 황금 각각의 단일 추출물과 혼합추출물간의 차이가 있는지를 확인하기 위하여 시호와 황금, 시호황금 혼합추출물을 다양한 유기용매로 분획하여, PPAR γ , C/EBP α , AMPK, adipocyte selective fatty acid binding protein(aP2), adiponectin, LIPIN1 등 지방세포 분화관련 인자 조절여부를 유전자와 단백질발현 측정방법을 통해 확인해보고 비만치료제로서 시호와 황금을 효과적으로 이용할 수 있는 자료를 제공하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 시호와 황금 열수추출물은 시호 및 황금 각각 100 g에 1000 ml의 물을 넣고 95 °C 이상에서 3 시간 동안 가열하여 추출하였다.

2. 세포 독성 검사

세포생존율의 측정을 위해 지방전구세포인 3T3-L1 세포를 96 well plate에 2×10^4 cell/well로 분주하여 24 시간 안정화 후, 농도별로 희석한 시호와 황금을 처리하여 48 시간 동안 배양하였다. 각 well에 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) 용액을 10 μ l 씩 첨가한 후 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 4 시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 VERSAmax microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 세포의 배양 및 분화

지방전구세포인 3T3-L1 세포를 Dulbecco's modified Eagle's media(DMEM) (GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% bovin serum(BS) (GIBCO, Grand Island, NY, USA)과 penicillin/streptomycin/glutamine 항생제가 포함된 세포배양액을 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 2-3일 간격으로 배양세포를 1× PBS로 세척한 후, 0.25% 트립신 500 μ l를 처리하여 세포를 탈착시킨 후 계대 배양을 실시하였다.

지방전구세포를 지방세포로 분화유도하기 위하여 세포가 plate에 가득차게

되는 시점(100% confluence)으로부터 48 시간 후(day 2)에 DMEM에 10% fetal bovine serum(FBS) 및 항생제가 포함된 세포배양액에 분화유도물질인 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 인슐린(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), $1 \mu\text{M}$ 의 DEX(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 0.5 mM 의 IBMX(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)가 함유된 분화유도 배양액으로 2일간 배양하였다. 48 시간 후 (day 4) DMEM + 10% FBS 세포배양액에 $1 \mu\text{g/ml}$ 인슐린만 함유한 배양액으로 교환하여 다시 48 시간 배양한 후, day 6에 동일한 배양액으로 교체하여 추가적인 48 시간의 배양을 시킨 후에 8일 째 되는 날 최종적으로 배양액을 버리고 남아있는 세포를 회수하여 실험에 사용하였다. 시호 및 황금 열수추출물의 처리는 day 4의 배양액에 희석하여 처리하였다.

4. Oil Red O 염색

지방세포로 분화되는 과정에서 축적되는 세포 내의 지방의 양을 측정하기 위해 Oil Red O 염색법을 사용하였다. 최종적으로 분화가 완료된 지방세포를 10% 포르말린으로 1 시간 동안 고정시킨 후 60% isopropanol로 세척하고 완전히 말린 다음, 60% Oil Red O 염색약(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)으로 30 분 간 염색하였다. 그 후, 3차 증류수를 이용하여 4번의 세척 과정을 거친 뒤에 광학현미경 Olympus IX71 Research Inverted Phase microscope(Olympus Co., Tokyo, Japan)을 통해 지방의 염색된 모습을 관찰하고, 100% isopropanol로서 염색된 Oil Red O를 용해한 뒤, VERSAmax microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 500 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 지방세포의 지방축적도를 측정하였다.

5. RNA 추출과 real-time RT-PCR

지방세포를 분화시켜 약물을 농도 별로 처리한 후, QIAzol lysis

reagent(QIAZEN sciences, Maryland, MD, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 각각의 실험군에서 얻어진 2 μ g의 RNA를 template로 하여 power cDNA synthesis kit(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 사용하여 single stranded cDNA를 제조하였다. DNA 내의 PPAR γ , C/EBP α , aP2, adiponectin, LIPIN1을 특이적으로 증폭시키는 primer를 넣어 StepOnePlus Real-time RT-PCR System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 mRNA의 발현 정도를 분석하였다. 실험에 사용된 primer들은 Table 1에 명시하였다.



Table 1. Primer sequences (5' to 3') for real-time RT-PCR.

Genes	5' to 3' Oligonucleotide Sequences
Mouse PPAR γ	
Sense (Forward)	TTT TCA AGG GTG CCA GTT TC
Antisense (Reverse)	TTA TTC ATC AGG GAG GCC AG
Mouse C/EBP α	
Sense (Forward)	GCC GAG ATA AAG CCA AAC AA
Antisense (Reverse)	CCT TGA CCA AGG AGC TCT CA
Mouse aP2	
Sense (Forward)	CGTAAATGGGGATTTGGTCA
Antisense (Reverse)	TCGACTTTCCATCCCACTTC
Mouse adiponectin	
Sense (Forward)	AGACCTGGCCACTTTCTCCTCATT
Antisense (Reverse)	AGAGGAACAGGAGAGCTTGCAACA
Mouse LIPIN1	
Sense (Forward)	TTCCTTGTCCCTGAACTGCT
Antisense (Reverse)	TGAAGACTCGCTGTGAATGG
Mouse GAPDH	
Sense (Forward)	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG
Antisense (Reverse)	GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT

PPAR γ , peroxisome proliferator activated receptor γ ; C/EBP α , CCAAT enhancer binding protein α ; aP2, adipocyte fatty acid-binding protein 2; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

6. 단백질 추출과 western blot assay

지방세포를 분화시켜 약물을 처리한 후, 3T3-L1 세포를 radioimmunoprecipitation assay(RIPA) 용액으로 용해시켜 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질 15 μ g을 62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol로 구성된 sample buffer와 함께 섞어 95 $^{\circ}$ C에서 5 분 간 반응시키고 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동을 통해 단백질을 분리한 후 polyvinyl difluoride 멤브레인에 transfer시켰다. 멤브레인을 5 % skim milk로 blocking한 후에 PPAR γ , C/EBP α , p-AMPK, AMPK, GAPDH 등의 1차 항체를 부착시켜 저온실에서 반응시킨 다음, 부착된 1차 항체에 적합한 2차 항체로 1시간 이상 반응시킨 후 ECL 용액(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 목적 단백질의 발현량을 확인하였다.

7. 통계 분석

실험 결과는 각 실험에 대한 평균값 \pm standard error mean(S.E.M.)으로 표기하였고, 각 그룹 간의 차이를 결정하기 위한 통계 분석은 Student t-test를 이용하였다. 통계적 유의성을 판단하는 기준은 $p < 0.05$ 였으며, 모든 통계 분석은 SPSS v20 statistical analysis software(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다.

III. 실험 결과

1. 세포 독성 시험 결과

실험에 사용된 시호와 황금의 열수추출물이 지방세포의 생존율에 미치는 영향을 관찰하기 위해 MTS assay를 시행하였다. 그 결과 시호는 10 μ g/ml, 황금은 1 μ g/ml의 농도까지 지방세포의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였다 (Figure 3).



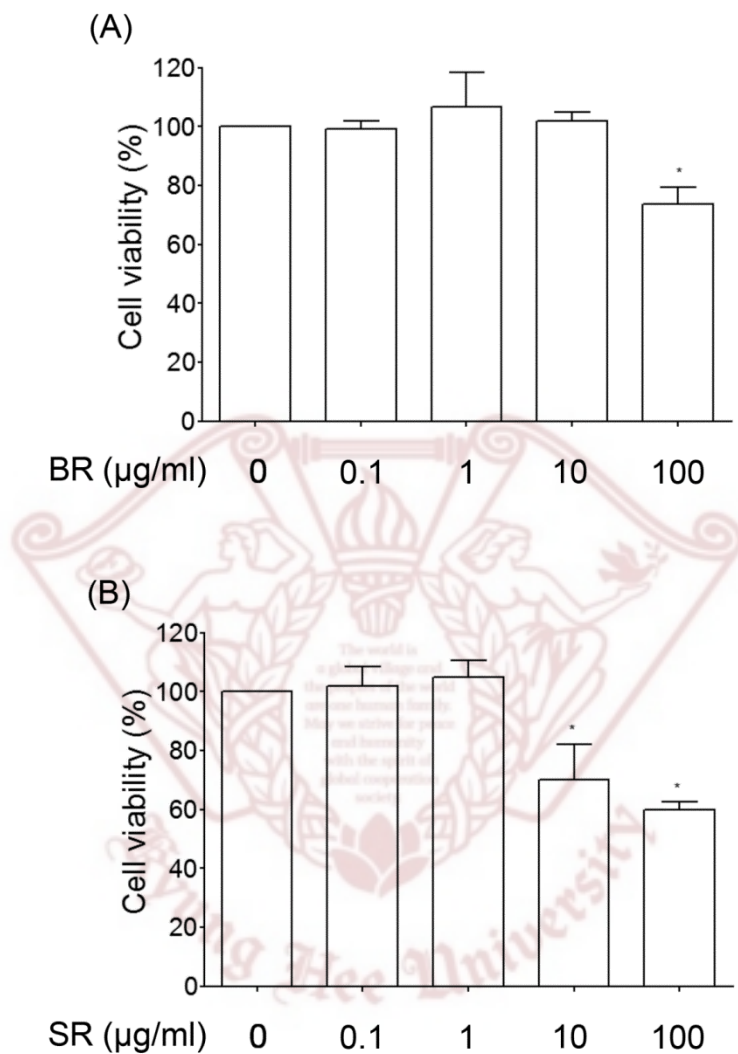


Figure 3. Effects of BR and SR on 3T3-L1 cell viability. An MTS assay was performed in order to measure the effects of (A) Bupleuri Radix and (B) Scutellariae Radix on cell viability in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 adipocytes were incubated with BR extract (0.1, 1, 10, 100 μg) or SR extract (0.1, 1, 10, 100 μg) for 48h. Cell viability was determined by the MTS colorimetric assay. Control was treated with DW instead of extracts. Assays were performed on

duplicates for each concentration, and experiments were repeated at least three times. Data represented are the relative expression. All values are mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, significantly different from untreated adipocytes. BR, Bupleuri Radix; SR, Scutellariae Radix.



2. 시호와 황금의 3T3-L1 세포 지방축적 억제 효과

시호와 황금이 3T3-L1 지방세포의 분화 과정에서 지방축적에 미치는 영향을 확인하기 위해 Oil Red O 염색법을 이용하였다. 앞서 세포생존을 검사를 통해 설정된 최대 농도를 기준으로 시호는 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$, 황금은 0.01, 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과, 시호와 황금 모두에서 지방축적을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다(Figure 4 and 5).



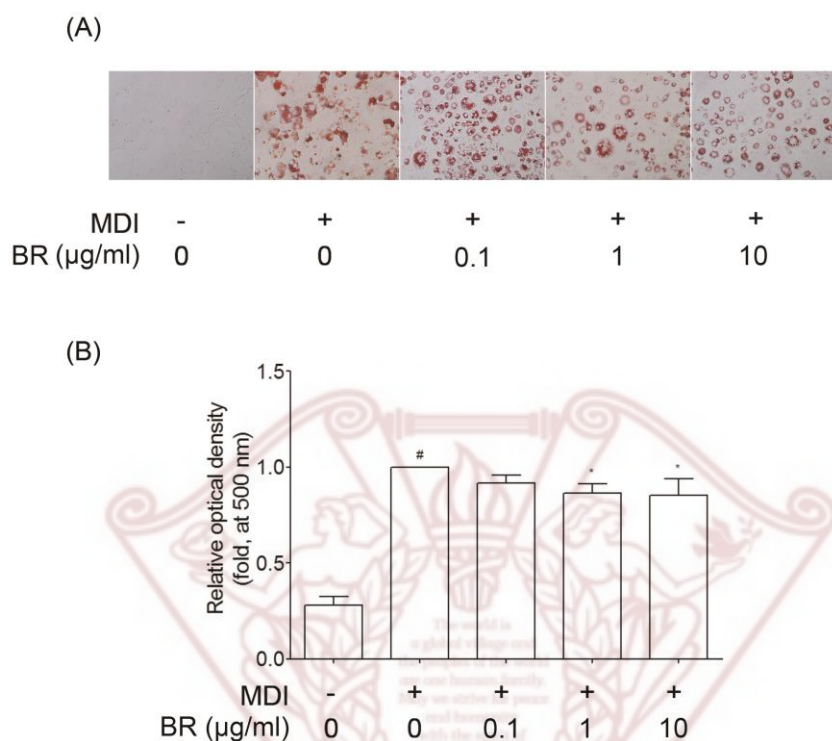


Figure 4. Effect of BR on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. An Oil Red O assay was performed in order to measure the effect of Bupleuri Radix on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. (A) Visual comparisons and (B) relative optic densities were measured. 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate with 10 % FBS/DMEM medium containing MDI (insulin, DEX and IBMX), 0, 0.1, 1 or 10 µg/ml of BR extract for 2 days, and then culture media were replaced with 10 % FBS/DMEM medium containing insulin for the following 2 days. Control was treated with DW instead of extracts. Data represented are the relative expression. All values are mean \pm S.E.M. $^{\#}p < 0.05$, significantly different from MDI-uninduced preadipocytes; $^{*}p < 0.05$, significantly different from MDI-induced adipocytes. BR, Bupleuri Radix.

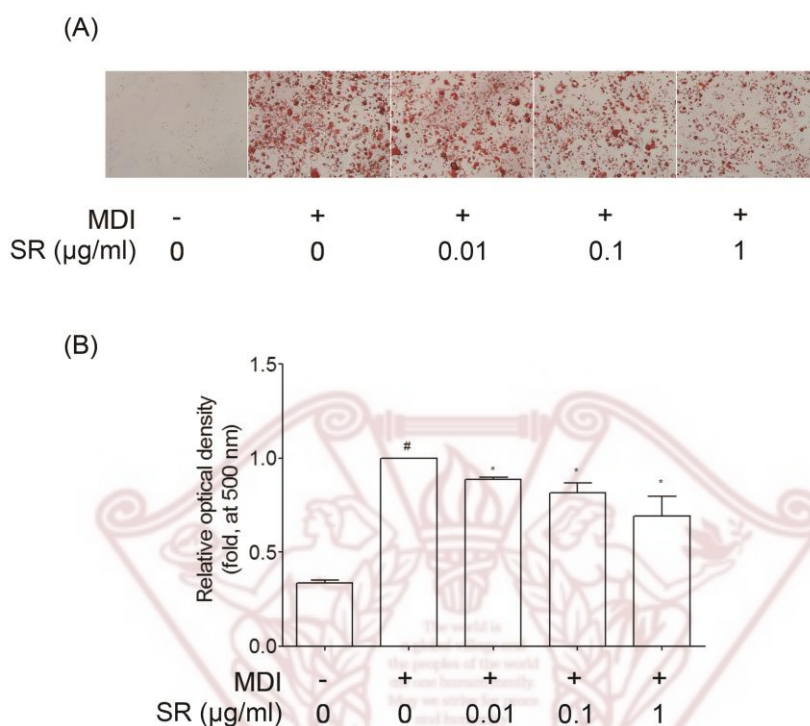


Figure 5. Effect of SR on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. An Oil Red O assay was performed in order to measure the effect of Scutellariae Radix on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. (A) Visual comparisons and (B) relative optic densities were measured. 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate with 10 % FBS/DMEM medium containing MDI (insulin, DEX and IBMX), 0, 0.01, 0.1 or 1 μ g/ml of SR extract for 2 days, and then culture media were replaced with 10 % FBS/DMEM medium containing insulin for the following 2 days. Control was treated with DW instead of extracts. Data represented are the relative expression. All values are mean \pm S.E.M. [#] $p < 0.05$, significantly different from MDI-uninduced preadipocytes; ^{*} $p < 0.05$, significantly different from MDI-induced adipocytes. SR, Scutellariae Radix.

3. 시호와 황금의 지방세포 분화조절 인자 유전자 발현 억제효과

시호와 황금 개별 추출물의 지방축적 억제효과가 지방세포의 분화 과정에 관련된 다양한 adipogenic transcription factor들에 미치는 영향을 확인하기 위해 real-time RT-PCR 실험을 시행하였다. 지방분화 과정에서 핵심적인 영향을 미치는 인자로는 PPAR γ 와 C/EBP α 로서, 이들의 발현은 상호작용을 통하여 세포 내 lipid droplet 생성 및 세포의 크기 증가 등과 같은 형태적 특징과 더불어 adiponectin, LIPIN1, aP2 등과 같은 아디포카인과 adipogenic protein의 발현에 중요한 역할을 한다(27-29).

해당 인자들에 대하여 real-time RT-PCR 실험 결과, 시호와 황금의 개별 추출물은 PPAR γ 와 C/EBP α 를 모두 유의하게 억제하는 효과를 보였으며 이들의 하위인자이자 지방분화과정에서 중요한 역할을 하는 adiponectin, aP2, LIPIN1의 mRNA 발현을 모두 감소시켰다(Figure 6 and 7).

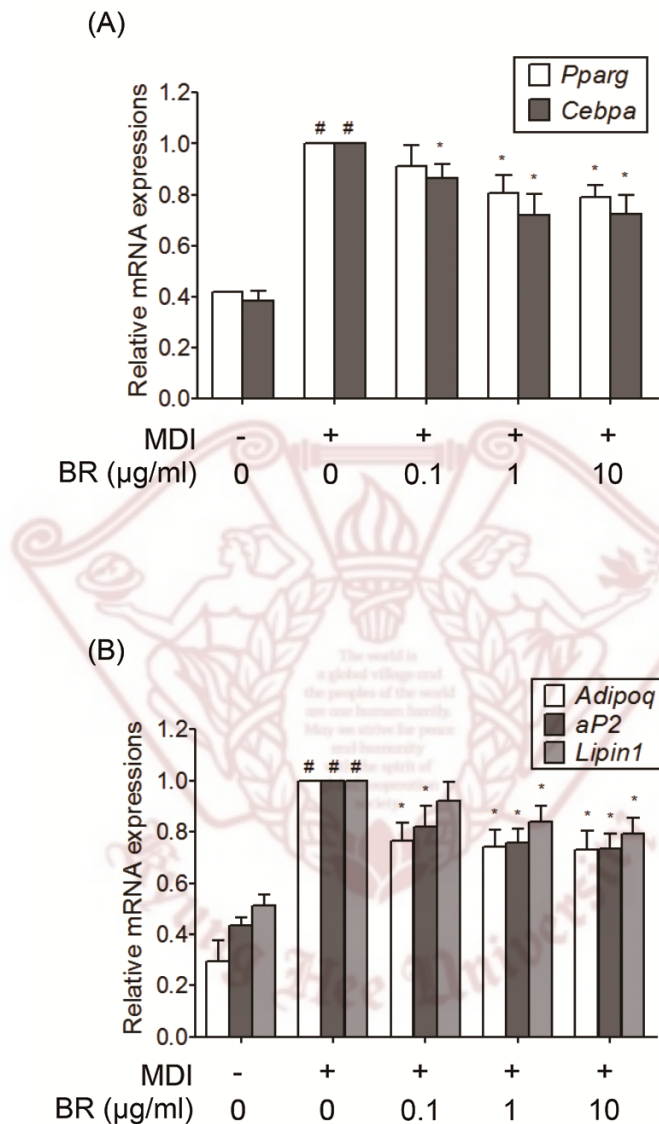


Figure 6. Effect of BR on mRNA expressions of PPAR γ , C/EBP α and other adipogenic genes in 3T3-L1 adipocytes. A real-time RT-PCR assay was performed in order to measure the effect of Bupleuri Radix on mRNA expressions of (A) PPAR γ , C/EBP α and (B) adiponectin, aP2, LIPIN1 in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate with 10 %

FBS/DMEM medium containing MDI (insulin, DEX and IBMX), 0, 0.1, 1 or 10 $\mu\text{g/ml}$ of BR extract for 2 days, and then culture media were replaced with 10 % FBS/DMEM medium containing insulin for the following 2 days. Control was treated with DW instead of extracts. Total RNA was prepared at the fourth day after differentiation induction and analyzed for the indicated genes. GAPDH mRNA was analyzed as an internal control. Data represented are the relative expression. All values are mean \pm S.E.M. $^{\#}p < 0.05$, significantly different from MDI–uninduced preadipocytes; $*p < 0.05$, significantly different from MDI–induced adipocytes. BR, Bupleuri Radix.



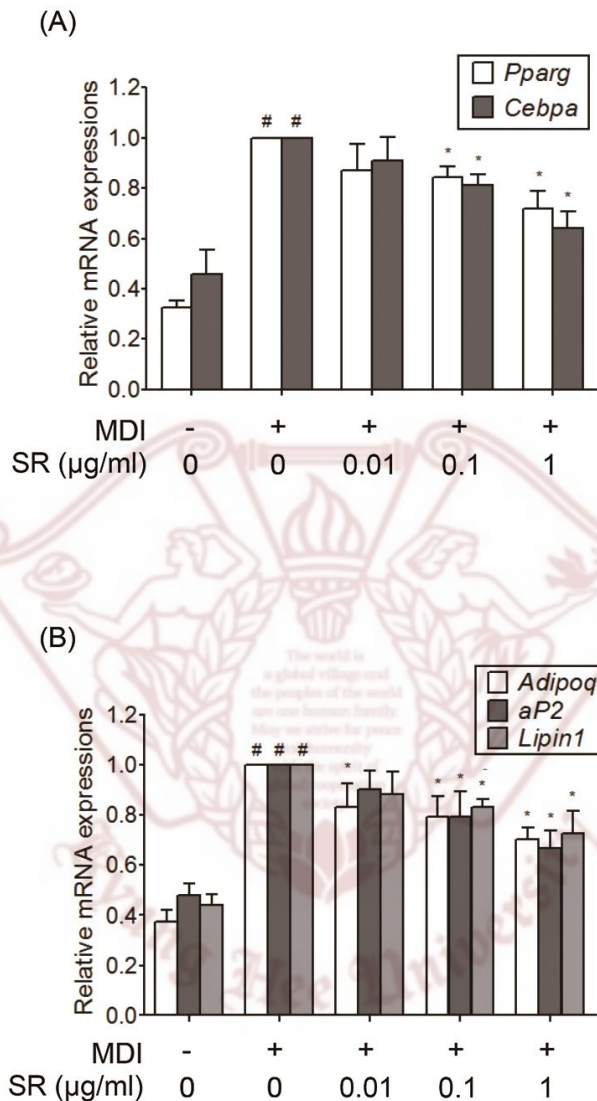


Figure 7. Effect of SR on mRNA expressions of PPAR γ , C/EBP α and other adipogenic genes in 3T3-L1 adipocytes. A real-time RT-PCR assay was performed in order to measure the effect of Scutellariae Radix on mRNA expressions of (A) PPAR γ , C/EBP α and (B) adiponectin, aP2, LIPIN1 in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate with 10 %

FBS/DMEM medium containing MDI (insulin, DEX and IBMX), 0, 0.01, 0.1 or 1 $\mu\text{g/ml}$ of SR extract for 2 days, and then culture media were replaced with 10 % FBS/DMEM medium containing insulin for the following 2 days. Control was treated with DW instead of extracts. Total RNA was prepared at the sixth day after differentiation induction and analyzed for the indicated genes. GAPDH mRNA was analyzed as an internal control. Data represented are the relative expression. All values are mean \pm S.E.M. $^{\#}p < 0.05$, significantly different from MDI-uninduced preadipocytes; $^{*}p < 0.05$, significantly different from MDI-induced adipocytes. SR, Scutellariae Radix.



4. 시호와 황금의 지방세포 분화조절 인자 단백질 발현 억제효과

3T3-L1 지방세포의 분화과정에서 시호와 황금의 열수추출물을 각각 처리하여 지방세포 분화조절 인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 단백질 발현 정도 및 AMPK의 활성화 정도를 western blot analysis를 통해 측정하였다. 그 결과, 단백질 수준에서 역시 시호와 황금은 농도의존적으로 PPAR γ 와 C/EBP α 모두를 억제하는 효과가 있었으며, AMPK의 인산화 정도를 확인하였을 때 시호와 황금 모두 AMPK를 활성화 시킬 수 있음을 확인하였다(Figure 8 and 9).



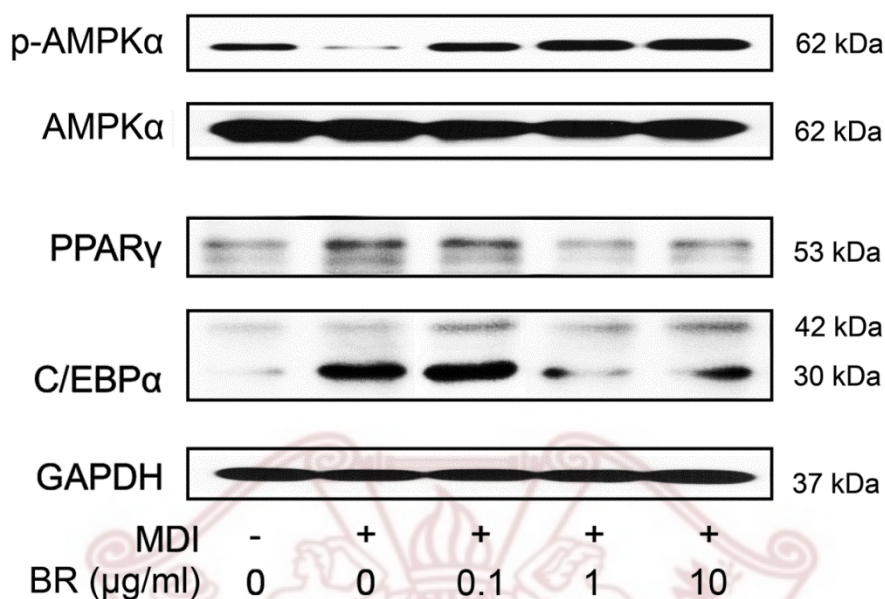


Figure 8. Effect of BR on protein expressions of PPAR γ , C/EBP α and p-AMPK in 3T3-L1 adipocytes. A western blot assay was performed in order to measure the effect of Bupleuri Radix on protein expressions of (A) PPAR γ , C/EBP α and (B) p-AMPK in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate with 10 % FBS/DMEM medium containing MDI (insulin, DEX and IBMX), 0, 0.1, 1 or 10 μ g/ml of BR extract for 2 days, and then culture media were replaced with 10 % FBS/DMEM medium containing insulin for the following 2 days. Control was treated with DW instead of extracts. At the sixth day after differentiation induction, 3T3-L1 adipocytes were collected and lysed for western blotting. GAPDH protein level was analyzed as an internal control. Data represented are the relative expression. All values are mean \pm S.E.M. $^{\#}p < 0.05$, significantly different from MDI-uninduced preadipocytes; $^{*}p < 0.05$, significantly different from MDI-induced adipocytes. BR, Bupleuri Radix.

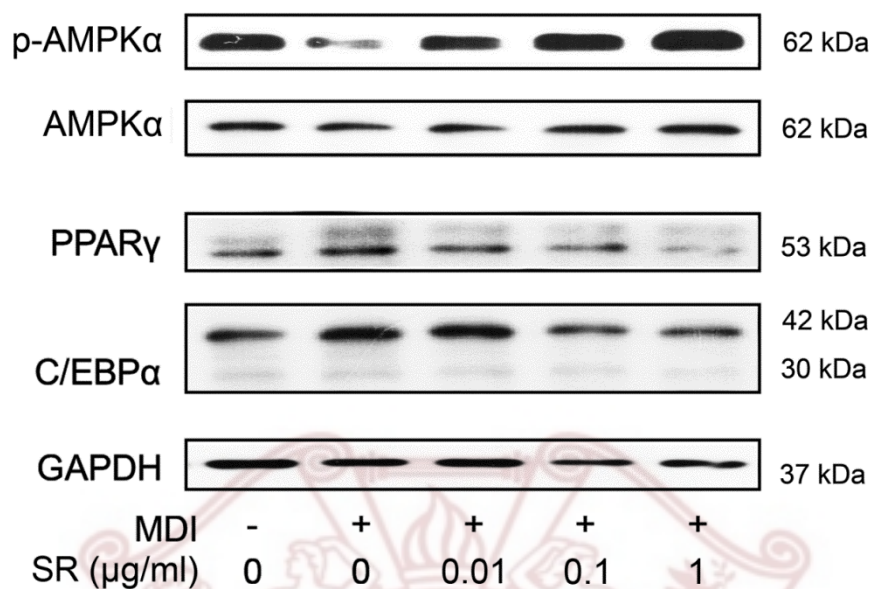
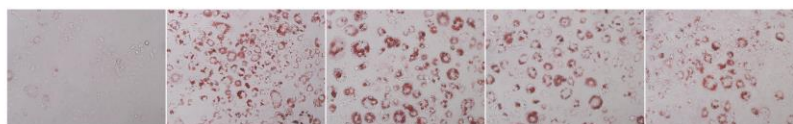


Figure 9. Effect of SR on protein expressions of PPAR γ , C/EBP α and p-AMPK in 3T3-L1 adipocytes. A western blot assay was performed in order to measure the effect of Scutellariae Radix on protein expressions of (A) PPAR γ , C/EBP α and (B) p-AMPK in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate with 10 % FBS/DMEM medium containing MDI (insulin, DEX and IBMX), 0, 0.01, 0.1 or 1 μ g/ml of SR extract for 2 days, and then culture media were replaced with 10 % FBS/DMEM medium containing insulin for the following 2 days. Control was treated with DW instead of extracts. At the sixth day after differentiation induction, 3T3-L1 adipocytes were collected and lysed for western blotting. GAPDH protein level was analyzed as an internal control. Data represented are the relative expression. All values are mean \pm S.E.M. [#] $p < 0.05$, significantly different from MDI-uninduced preadipocytes; ^{*} $p < 0.05$, significantly different from MDI-induced adipocytes. SR, Scutellariae Radix.

5. 시호-황금 배합물의 3T3-L1 세포 지방축적 억제 효과

시호와 황금의 상수 효과를 확인하기 위해 시호와 황금의 배합물에 대한 추가적인 실험을 진행하였다. 시호와 황금의 배합비를 설정함에 있어 앞서 개별추출물에 대한 실험을 진행한 결과 황금은 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 최대의 효과를 보이는 반면, 시호의 경우 1과 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 농도의 효과에 유의적인 차이가 존재하지 않았고, 소시호탕에서의 시호와 황금이 각각 12 g과 8 g이 포함되므로 일대일의 비율에 가깝다고 판단하였으며, 보다 객관적인 상수효과를 확인하기 위해 배합비를 단순화하여 추후 비교 실험은 시호 $1 \mu\text{g/ml}$, 황금 $1 \mu\text{g/ml}$, 그리고 시호와 황금을 각각 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 씩 배합한 시호와 황금의 배합물을 대상으로 시행하였다. 우선 시호-황금 배합물이 3T3-L1 세포의 지방축적 억제효과에 미치는 영향을 확인하기 위해 Oil Red O 염색을 시행한 결과, 시호와 황금 각각의 단독처리에 비해 시호-황금 배합물은 동일농도임에도 더 우수한 지방축적 억제효과를 보였다(Figure 10).

(A)



MDI	-	+	+	+	+
BR (μg/ml)	0	0	1	0	0.5
SR (μg/ml)	0	0	0	1	0.5

(B)

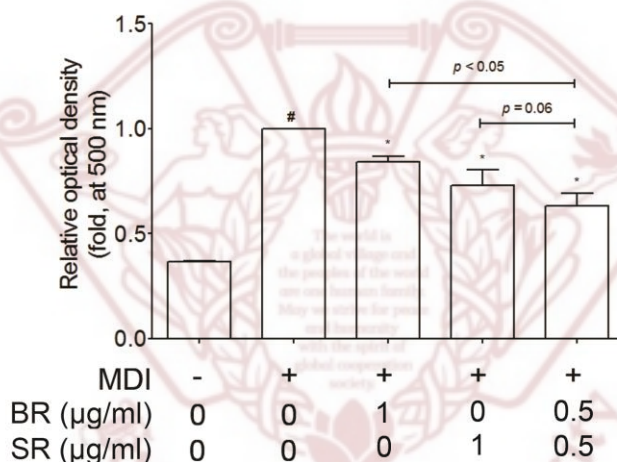


Figure 10. Effects of BR, SR, and their mixture on lipid accumulation in 3T3–L1 adipocytes. An Oil Red O assay was performed in order to measure the difference between the effects of Bupleuri Radix, Scutellariae Radix and their mixture on lipid accumulation in 3T3–L1 cells. 3T3–L1 preadipocytes were induced to differentiate with 10 % FBS/DMEM medium containing MDI (insulin, DEX and IBMX), 1 μg/ml of BR or SR extract, or 0.5 μg/ml of both for 2 days, and then culture media were replaced with 10 % FBS/DMEM medium containing insulin for the following 2 days. Control was treated with DW instead of extracts. Data represented are the relative expression. All values

are mean \pm S.E.M. $^{\#}p < 0.05$, significantly different from MDI-uninduced preadipocytes; $^{*}p < 0.05$, significantly different from MDI-induced adipocytes. BR, Bupleuri Radix; SR, Scutellariae Radix.



6. 시호-황금 배합물의 지방세포 분화조절 인자 유전자 발현 억제효과

시호-황금 배합물의 3T3-L1 지방세포의 분화관련인자에 대한 영향을 확인하고 이를 시호와 황금 단독추출물과 비교하기 위해 real-time RT-PCR 실험을 시행한 결과, 시호와 황금 각각의 단독처리에 비해 시호-황금 배합물은 지방분화 조절 핵심인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 및 관련 인자들인 adiponectin, LIPIN1, aP2 등의 mRNA 발현을 효과적으로 억제하였다(Figure 11).



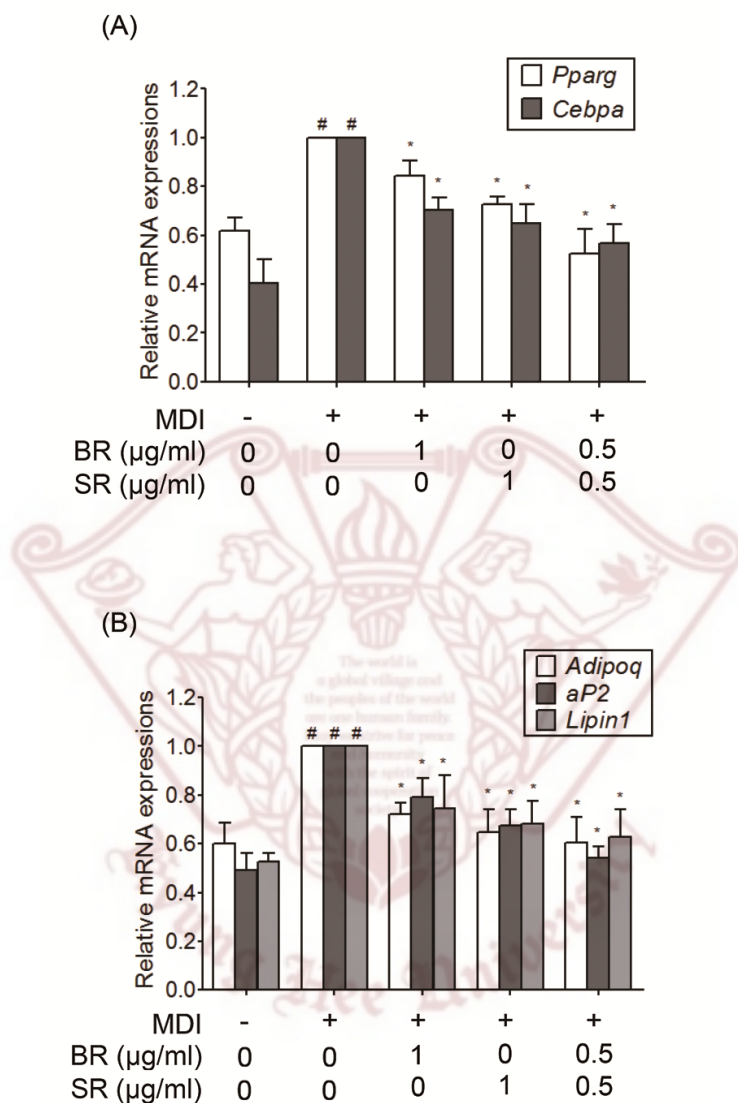
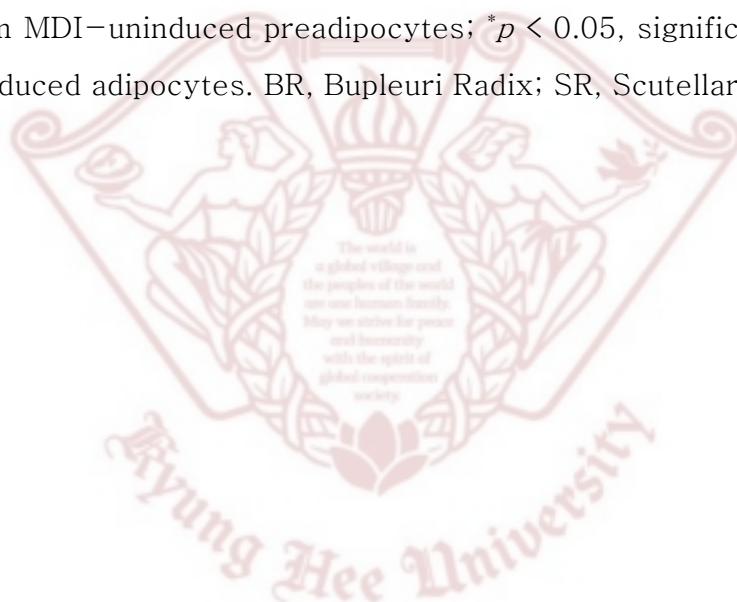


Figure 11. Effects of BR, SR, and their mixture on mRNA expression of PPAR γ , C/EBP α and other adipogenic genes in 3T3-L1 adipocytes. A real-time RT-PCR assay was performed in order to measure the difference between the effects of Bupleuri Radix, Scutellariae Radix and their mixture on protein expressions of (A) PPAR γ , C/EBP α and (B) p-AMPK in 3T3-L1 cells.

3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate with 10 % FBS/DMEM medium containing MDI (insulin, DEX and IBMX), 1 μ g/ml of BR or SR extract, or 0.5 μ g/ml of both for 2 days, and then culture media were replaced with 10 % FBS/DMEM medium containing insulin for the following 2 days. Control was treated with DW instead of extracts. Total RNA was prepared at the fourth day after differentiation induction and analyzed for the indicated genes. GAPDH mRNA was analyzed as an internal control. Data represented are the relative expression. All values are mean \pm S.E.M. [#] $p < 0.05$, significantly different from MDI-uninduced preadipocytes; * $p < 0.05$, significantly different from MDI-induced adipocytes. BR, Bupleuri Radix; SR, Scutellariae Radix.



7.시호-황금 배합물의 지방세포 분화조절 인자 단백질 발현 억제효과

시호-황금 배합물이 3T3-L1 지방세포의 분화관련인자에 대한 영향을 단백질 수준에서 확인하기 위해 western blot assay를 시행하였다. 그 결과, 시호와 황금 각각의 단독처리에 비해 시호-황금 배합물은 지방분화 조절 핵심인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 를 단백질 수준에서 효과적으로 억제했으며, 에너지 대사의 핵심인자이자 지방분화과도 관련성을 갖는 AMPK 역시 시호 및 황금의 단독 처리군에 비해 효과적으로 활성화시켰다(Figure 12).



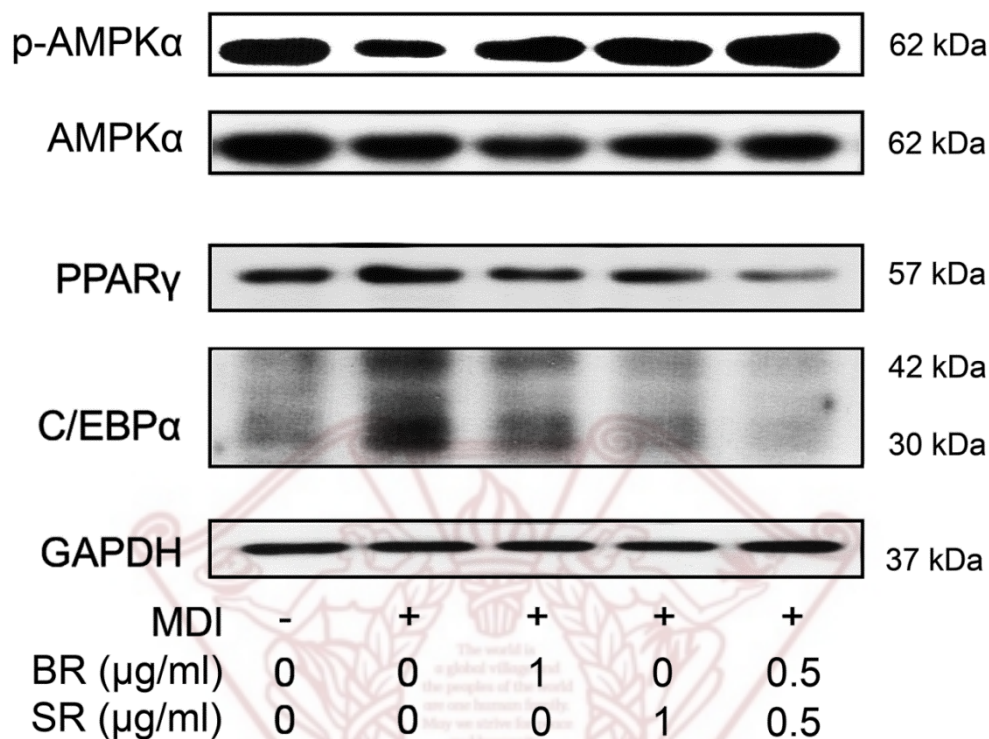


Figure 12. Effects of BR, SR, and their mixture on protein expression of PPAR γ , C/EBP α and p-AMPK in 3T3-L1 adipocytes. A western blot assay was performed in order to measure the difference between the effects of Bupleuri Radix, Scutellariae Radix and their mixture on protein expressions of (A) PPAR γ , C/EBP α and (B) p-AMPK in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate with 10 % FBS/DMEM medium containing MDI (insulin, DEX and IBMX), 1 μ g/ml of BR or SR extract, or 0.5 μ g/ml of both for 2 days, and then culture media were replaced with 10 % FBS/DMEM medium containing insulin for the following 2 days. Control was treated with DW instead of extracts. At the sixth day after differentiation induction, 3T3-L1 adipocytes were collected and lysed for western blotting. GAPDH protein level was analyzed as an internal control. Data represented are the relative

expression. All values are mean \pm S.E.M. $^{\#}p < 0.05$, significantly different from MDI-uninduced preadipocytes; $^{*}p < 0.05$, significantly different from MDI-induced adipocytes. BR, Bupleuri Radix; SR, Scutellariae Radix.



IV. 고찰

본 연구에서는 시호와 황금의 항비만 효과를 3T3-L1 세포에서 확인하는 한편, 소시호탕의 주요 구성 약재로서 상수 관계로 알려진 두 본초의 조합에 대하여 항비만 효과를 단독 약재와 비교하는 연구를 진행하였다.

한의학의 고유 특성 중 하나인 다중약재(multiple component)의 활용은 단일 성분 위주의 투약을 시행하는 서양의학과는 차별되는 점으로서, 약재의 조합을 구성하는 기본적인 이론으로 「신농본초경(神農本草經)」을 비롯한 한의학 서적에서는 칠정(七情)을 제시하고 있다. 칠정(七情)은 다시 그 조합의 특성에 따라 단행(單行), 상수(相須), 상사(相使), 상외(相畏), 상오(相惡), 상쇄(相殺), 상반(相反) 등으로 분류되며, 이 중 단행(單行)은 단 한가지의 약물만을 사용하여 병을 치료하는 것으로, 인삼 한가지로 기혈부족을 치료하는 독삼탕(獨參湯), 해수와 천식을 길경만으로 치료하는 독길탕(獨桔湯) 등이 이에 해당한다. 단행은 병세가 복잡하거나 급하게 변하는 경우는 응용이 적은 편이며, 민간요법이나 자연요법으로 사용된 예가 많다.

단행을 제외하고는, 두 가지 약물 상호간의 작용기전에 대한 원칙을 제시하고 있다. 그 중 첫 번째로, 상수(相須) 배오는 약물의 기미(氣味)나 약성(藥性)이 서로 비슷한 약물이 배합되어 약효가 상승되거나 서로 더해지는 경우를 말하며, 방제를 구성할 때 가장 많이 활용되고 있다. 상사(相使)는 두 가지 약물이 배오될 때 한 약물이 다른 약물의 주작용을 보조하는 배합관계를 말하며, 두 가지 약물은 서로 주종관계를 이룬다. 이는 주약(主藥)의 효과를 상승시키거나 증대시키기 위해 배합되는 경우로써 방제구성에 상수(相須)와 더불어 많이 활용되는 편이다. 상수(相須)는 “상수자 동류이불가리 상용 상수자량(相須者 同類而不可離, 常用 相須者良)”이라하여 같은 종류의 약물이 배오(配伍)되어 서로 떨어질 수 없는 유기적 연관관계를 이룬 것으로, 상수를 처방에 활용하는 것은 매우 좋다고 하였다. 상수는 약물 상호간의 배오 비율이 1:1 인 경우가 많다. 반면,

상사(相使)는 주약(主藥)의 효과를 상승시키기 위해 두 가지 약물을 배오하는 경우에 해당한다. “상사(相使)란 아지좌사(我之佐使)”라 하여 두 가지 약물이 주종관계로 배오된 것이다. 상사는 주약의 치료작용을 배오되는 보조약이 협력하여 그 치료효과를 상승시키거나 증대시켜주는 배오이므로 배오의 비율에 있어서도 주약과 보조약의 뚜렷한 차이를 보이고 있다.

상외(相畏)는 두 가지 약물이 배합될 때 상대 약물로부터 약효나 성미에 영향을 받는 것으로, 독성이나 부작용을 다른 한약이 제거하거나 경감시키는 것을 말하며, 상오(相惡)는 두 종류의 약물이 상대적으로 배합된 약물에 대하여 성미나 효능에 제약을 미치게 하는 배합관계를 말한다. 상쇄(相殺)는 두 종류의 약물을 배합할 때 한 약물이 다른 약물의 독을 없애버리는 것을 말하고, 상반(相反)은 두 종류의 약물을 합용할 때 심한 반대작용으로 인하여 배합이 불가능하게 되고 중독증상을 일으키는 것을 말한다. 상오보다 심한 부작용을 동반할 때가 많다(1). 상외(相畏), 상쇄(相殺)는 두가지 약물이 배합될 때 상대 약물로부터 약효나 성미에 영향을 받거나(상외), 혹은 상대적으로 배합된 약물에 대하여 성미나 효능에 제약을 미치게하는 배합관계(상쇄)로써 주로 독성이나 약력이 준열하여 그대로 활용하면 부작용이 생길 우려가 있는 경우에 서로 제약하여 순화시키거나 완화시킬 목적으로 활용하며 법제할 때 많이 응용한다. “상외자 수피지제야 상살자 제피지독야 약유독의제 가용상살상(相畏者 受彼之制也 相殺者 制彼之毒也 若有毒宜制 可用相殺相畏者)”라 하였듯이 상대적으로 배오되는 약물의 효과를 서로 제약하여 인체에 해가 없도록 순화하거나 완화시킨다. 예를 들면 반하의 준열한 조성과 독성을 생강즙이 해독시키고 완화시켜서, 조습 거담 지구작용이 인체에 무리없이 원활히 이루어질 수 있도록 하며 여기에 해당되는 대표적인 기본방제는 소반하탕(小半夏湯), 이진탕(二陳湯) 등이 있다. 칠정(七情)의 대표적인 관계인 상수(相須), 상사(相使), 상외(相畏), 상쇄(相殺)의 대표적인 약물 조합례와 배오비율은 Table 2에 명시되어 있다.

Table 2. Examples of Pairs and Ratios of Chiljeong(1).

배오종류	구성약물	배오비율	처방명	주치	비고
상수 (相須)	지실 : 백출	1 : 2	지출환 (枳朮丸)	治痞 消食 健脾 消痞	
	곽향 : 진피	1 : 1	회생산 (回生散)	治 霍亂吐瀉	
	정향 : 백두구	1 : 1	신향산 (神香散)	治 嘔噦脹滿痰飲 膈噎	
	생강 : 귤피	2 : 1	생강귤피탕 (生薑橘皮湯)	治 乾嘔 手足闕 冷	
	당귀 : 천궁	1 : 1	궁귀탕 (芎歸湯)	治 產前後諸病 惡露血崩不止	
	녹용 : 부자	1 : 1	용부탕 (茸附湯)	治 氣精血虛損 燥熱盜汗	
	감초 : 흑두	1 : 1	감두탕 (甘豆湯)	解百藥百物毒	
	숙지황 : 토사자	1 : 1	쌍보환 (雙補丸)	平補氣血 不燥不 熱	
상사 (相使)	길경 : 감초	7 : 3	감길탕 (甘桔湯)	治 少陰客寒 咽 痛	길경의 치 인후종통 (治咽喉腫痛) 작용을 감초의 사화 작용(瀉火作用)으로 조(助)한다.
	석고 : 지모	5 : 2	백호탕 (白虎湯)	治 陽明經痛 汗多煩渴	석고의 양명열(陽明熱)을 사(瀉)하는 작용을 지모가 조(助)한다.

	작약 : 감초	2 : 1	작감탕 (芍甘湯)	平肝止痛 緩急 治 一切腹痛	작약의 평간지통 (平肝止痛) 작용을 감초의 완화(緩和) 작용으로 조(助)한다.
	황기 : 당귀	5 : 2	당귀보혈탕 (當歸補血湯)	治 氣虛血脫	황기의 보기(補氣) 작용을 당귀의 보혈(補血)로 조(助)한다.
	황련 : 목향	4 : 1	황련환 (黃蓮丸)	治 赤白膿血下痢 脹痛及諸痢	황련의 치리(治痢) 작용을 목향의 조기(調氣)로 조(助)한다.
상외 (相畏) 상쇄 (相殺)	반하 : 생강	4 : 1	소반하탕 (小半夏湯)	治 飲停心下嘔吐 不渴 心下痞悶	생강이 반하의 조성(燥性)을 완화시킨다.
	활석 : 감초	6 : 1	육일산 (六一散)	治 中暑 吐瀉下 痢 止渴除煩 解百藥 酒食邪毒	감초가 활석의 한활(寒滑)한 성질을 완화시킨다.
	황련 : 부자	6 : 1	황부육일탕 (黃附六一湯)	治 熱鬱 胃胸痛	부자가 황련의 한랭(寒冷)한 성미(性味)를 줄인다.

시호(柴胡, *Bupleuri Radix*)는 산형과(Umbelliferae)에 속한 다년생 본초인 시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 뿌리를 건조한 것으로, 맛은 쓰고, 성질은 서늘하고 무독(無毒)하며, 주로 간, 담경에 들어가 약효를 발휘하는데, 주된 효능으로는 화해퇴열(和解退熱), 소간해울(疏散退熱), 승거양기(升舉揚氣) 하여 감모발열(感冒發熱), 한열왕래(寒熱往來), 흉만협통(胸滿脇痛), 구고이롱(口苦耳聾), 두통목현(頭痛目眩), 학질(瘧疾), 하리탈항(下痢脫肛), 월경부조(月經不調), 자궁하수(子宮下垂) 등을 치료하는 효과가 있다. 시호의 성분은 saponin, sapogenin, carbohydrate, sterol, fatty acid와 flavonoids 등이 있으며, 그 중 saponin이 주성분으로 알려져있다. Saponin은 중추신경계 작용이 현저하여 진정과 진통, 해열, 체온강하 및 진해작용, 간장에 개선작용이 있다고 알려져 있으며(44) 항균과 항병독작용, 평활근 이완작용, 항스트레스작용 등이 있음이 보고되었다(3). 주성분인 시호 사포닌 이외에 함유성분으로 다당류의 약리효과도 밝혀져 있는데 정유성분은 해열, 항염, 항종양 등에 효과가 있으며 다당류성분은 면역계조절, 항괴양작용 등이 알려져 있다(45).

황금(黃芩, *Scutellariae Radix*)은 꿀풀과에 속하는 여러해살이 초본식물인 황금(*Scutellaria baicalensis georgi*)의 뿌리로 만든 약재로 성미(性味)는 고한(苦寒)하고 귀경(歸經)은 폐, 담, 위, 대장경으로, 실화(實火)를 끄고 습열(濕熱)을 제거하며, 출혈을 멎게 하고, 태아를 안정시키는 안태(安胎)의 효능이 있다(10). 황금의 성분으로는 flavonoid 계 화합물로서 baicalein, baicalin, chrysin, oroxylin-A, oroxylin- α -7-O-glucuronide, wogonin, wogonoside, wogonin glucuronide, neo-baicalein, koganebananin, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone, skullcapflavone, dihydrobaicalin 등이 있으며, sterol 류로는 β -sitosterol, campesterol, stigmasterol 등이 함유되어 있다. 또한 당류로서 sucrose 및 D-glucose 등이 함유되어 있고 그 외 14 종의 아미노산, 정유 등이 있으며 광범위한

항균 및 항바이러스 작용, 항염 및 항과민, 진정작용 및 혈압강하, 지질저하, 항산화, 항종양 작용 등이 보고되고 있다(30).

시호와 황금은 특히 상한론(傷寒論)의 소시호탕(小柴胡湯)의 주요구성약재로서 칠정(七情) 중 상수(相須) 관계를 가지는 것으로 알려져 있는데, 장중경(張仲景)은 소시호탕을 “태양병의 상한 5-6일이나 혹은 중풍에서 한열(寒熱)이 교대로 발작하고, 흉협부가 매우 만민(滿悶)하며, 말을 하지 않으면서 음식 생각이 없고, 때로는 가슴이 두근거리고 잦은 구역질이 나타난다. 혹은 단지 흉중이 번요(煩擾)하되 구토하지 않거나, 혹은 입이 마르거나, 혹은 복부가 아프거나, 혹은 협하가 비색만경(痞塞滿硬)하거나, 혹은 심하동悸(心下動悸)하면서 소변불리(小便不利)하거나, 혹은 구갈(口渴)이 없으면서 체표가 미열(微熱)하거나, 혹은 해수(咳嗽)를 겸한 경우에는 모두 소시호탕으로 치료할 수 있다(傷寒五六日, 中風, 往來寒熱, 胸脇苦滿, 嘔噦不欲陰食, 心煩喜嘔 或胸中煩而不嘔 或渴, 或腹中痛, 或脇下痞硬 或心下悸, 小便不利, 或不渴, 身有微熱, 或咳者 小柴胡湯 主之)”고 하였으며(46), 황금과 시호를 배오(配伍)하여 한열왕래(寒熱往來)를 치료한다고 하였다(30).

비만은 칼로리 섭취 과다의 장기간 지속으로 인해 여분의 열량이 중성지방의 형태로 지방조직에 과도하게 축적된 것을 말한다(47). 비만은 다양한 요인들의 상호 복합적 작용에 의해 발생하지만, 과도한 에너지의 섭취와 부족한 신체활동, 부적절한 생활습관에 의한 낮은 에너지 소비가 가장 큰 원인으로 제시되고 있다. 따라서 에너지의 섭취를 줄이는 방법으로 식이조절을 쉽게 선택하고 있으나 열량섭취의 무조건적인 제한은 일상생활의 영위가 어려워 비만치료의 목표까지 도달하기가 쉽지 않고, 체내 단백질 손실의 우려도 있는 것이 현실이다. 또한 체지방 함량의 조절은 뇌와 신체 조직의 수준에서 여러 영양소, 감각신경 및 호르몬에 의한 영향을 받는다(48). 비만의 기전의 기반에는 골격근과 지방조직의 효소와 그 수용기 및 각종 호르몬 등의 변화와 육체적 활동량 부족과 적절하지 못한(고지방, 고탄수화물) 식이 등이 영향을 주고 있다(49). 비만으로

인해 야기되는 다양한 질환의 심각성(20)과 전세계적으로 증가 중인 비만의 인구(6)와 비만치료에 대한 경제적 비용(7)에 비해 현대의학에서 활용되는 치료제의 종류는 제한적이며, 부작용 역시 다수가 보고되고 있는 실정이다. 따라서 천연물 유래의 비만치료제에 대한 관심이 나날이 증대되고 있으며(12, 13), 수 천 년의 임상자료가 축적되어 있는 한의학의 처방에 대한 관심 역시 증가하고 있는 추세이다. 최근의 한약에의 항비만 효과에 대한 연구로는 박 등(51)의 태음조위탕(太陰調胃湯)에 관한 연구와 황 등(52)의 방풍통성산(防風通聖散)에 대한 연구를 비롯, 다양한 처방과 단일 본초에 대한 연구가 진행되고 있으며, 시호와 황금 역시 유효성분의 항비만 효과에 대한 연구가 보고되어 있지만 시호와 황금의 배오활용에 대한 연구 및 이를 통한 상수 관계의 증명에 대한 연구는 현재까지 보고된 바가 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 시호와 황금의 배합물의 항비만 효과를 개별 약재의 단독활용과 비교하여 3T3-L1 지방세포를 대상으로 확인하였다. 본 실험에 사용한 3T3-L1 세포주는 분화된 3T3-L1 adipocytes 가 in vivo adipocytes 의 생화학적, 형태학적 성질들과 사실상 동일하다는 보고에 따라(53), 지방의 분화에 대한 약물 효과를 판단하는 대상으로 활용하기에 적절하다고 판단, 3T3-L1 세포를 분화시켜 연구를 진행하였다. 시호와 황금은 모두 지방의 축적을 유의적으로 억제하였으며(Figure 4 와 5), 상세 기전의 연구를 위해 지방분화와 연관된 다양한 인자를 대상으로 real-time RT-PCR 을 시행한 결과, 시호와 황금의 열수 추출물은 모두 단독 처리시에 지방세포의 형성 과정의 주요인자인 PPAR γ 와 C/EBP α (17)를 유의적으로 억제함을 관찰하였다. 또한 지방분화 과정 중 PPAR γ 와 C/EBP α 의 하위 인자들로 작용하는 adiponectin, aP2, LIPIN1(54)의 mRNA 발현 역시 시호와 황금 단독 처리군에서 유의하게 감소함을 확인하였다(Figure 6 과 7). 시호와 황금의 지방분화억제 효과는 단백질 수준을 대상으로 한 western blot 실험에서도 PPAR γ 와 C/EBP α 가 억제되는 mRNA 수준의 그것과 유사한 결과가 나왔으며, 에너지 대사의 핵심인자인 AMPK 또한

유의적으로 활성화시킴을 확인하였다(Figure 8 과 9). 추가적인 실험을 통해 시호와 황금을 일대일로 혼합하여 처치한 실험군은 시호 및 황금의 단독 처리군에 비해 지방축적을 보다 효과적으로 억제하였으며(Figure 10), real-time RT-PCR 실험 결과에서도 마찬가지로 PPAR γ , C/EBP α , adiponectin, aP2, LIPIN1 등의 지방분화 관련인자들에 대해 큰 억제효능을 보였다(Figure 11). PPAR γ , C/EBP α , AMPK 에 대한 western blot assay 결과, 시호-황금 배합물은 시호나 황금 단독 추출물에 비해 PPAR γ 와 C/EBP α 모두를 더욱 효과적으로 억제하였으며, AMPK 의 활성화 역시 큰 폭으로 증가시킬 수 있음을 확인하였다(Figure 12).

본 연구에서는 시호와 황금, 그리고 시호-황금의 배합물이 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제하고 지방세포 분화와 관련된 전사인자의 활성을 억제함을 관찰함으로써, 시호와 황금의 개별 약재 비만 치료에 대한 활용 가능성을 확인하였다. 뿐만 아니라 시호-황금의 배합물이 단독 처치에 비해 그 항비만 효과가 우수함을 관찰함으로써, 두 약재의 배오의 시너지 효과를 확인하였고, 이는 본초의 상호 관계에 대한 한의학 이론인 칠정(七情) 중 상수관계에 해당하는 두 약재의 배합에 대한 실험적 입증을 의미한다. 다만, 세포 단계에서 확인한 본 연구에 이어, 실제적인 시호와 황금의 상수 관계에 대한 과학적 입증은 나아가 추가적인 동물실험 등의 진행과 상세 기전의 규명을 통해 완성할 수 있을 것이며, 본 연구는 한의학의 다중약재 처방 활용의 근거 마련의 단초를 제공한 것에 그 의의가 있을 것이다.

V. 결론

시호와 황금의 항비만 효과를 확인하고, 이 둘의 상호 관계에 대한 실험적 근거를 마련하기 위해, 시호와 황금 열수추출물을 단독으로, 그리고 1:1 배합하여 3T3-L1 지방전구세포에 처리하여 Oil Red O, real-time RT-PCR, western blot 등의 방법을 통해 지방세포분화 조절 인자의 발현을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시호와 황금의 열수 추출물은 각각 $10 \mu\text{g/ml}$ 과 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 3T3-L1 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는다.
2. 시호와 황금의 열수 추출물은 3T3-L1 세포의 지방 축적을 유의성 있게 억제한다.
3. 시호와 황금의 열수 추출물은 3T3-L1 세포의 주요 지방 분화 관련 인자인 $\text{PPAR } \gamma$, $\text{C/EBP } \alpha$, adiponectin, aP2, LIPIN1의 mRNA 발현을 유의적으로 억제한다.
4. 시호와 황금의 열수 추출물은 3T3-L1 세포의 주요 지방 분화 관련 인자인 $\text{PPAR } \gamma$ 와 $\text{C/EBP } \alpha$ 의 단백질 발현을 억제하며, 에너지대사 인자인 AMPK를 활성화시킨다.
5. 시호와 황금의 열수 추출물을 각각 단독 처리한 군에 비해 시호와 황금을 배합하여 처리한 군에서 3T3-L1 세포의 지방 축적 효과가 우수하다.
6. 시호와 황금의 열수 추출물을 각각 단독 처리한 군에 비해 시호와 황금을 배합하여 처리한 군에서 3T3-L1 세포의 주요 지방 분화 관련 인자인 $\text{PPAR } \gamma$, $\text{C/EBP } \alpha$, adiponectin, aP2, LIPIN1의 mRNA 발현 억제 효과가 우수하다.
7. 시호와 황금의 열수 추출물을 각각 단독 처리한 군에 비해 시호와 황금을 배합하여 처리한 군에서 3T3-L1 세포의 주요 지방 분화 관련 인자인 $\text{PPAR } \gamma$ 와 $\text{C/EBP } \alpha$ 의 단백질 발현억제 효과가 크며, 에너지대사 인자인 AMPK의 활성화 정도가 우수하다.

이러한 결과로, 시호와 황금의 3T3-L1 지방세포에서 항비만 효과를 보이
나 시호-황금 배합물은 이에 비해 더욱 우수한 항비만 효과를 보임을 입증하였으
며, 이들의 배합물이 비만의 치료제로 유효하게 활용 가능할 것으로 사료된다.



VI. 참고 문헌

1. 윤용갑. 동의방제와 처방해설: 의성당; 2007.
2. WHO. WHO International Standard Terminologies on Traditional Medicine in the Western Pacific Region. In: Organization WH, editor. 2007.
3. 공동교재편찬위원회 전. 본초학. 서울: 영림사; 2000.
4. Kissebah AH, Freedman DS, Peiris AN. Health risks of obesity. The Medical clinics of North America. 1989 Jan;73(1):111-38. PubMed PMID: 2643000. Epub 1989/01/01. eng.
5. Mokdad AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL. Actual causes of death in the United States, 2000. JAMA. 2004 Mar 10;291(10):1238-45. PubMed PMID: 15010446. Epub 2004/03/11. eng.
6. Haslam DW, James WP. Obesity. Lancet. 2005 Oct 1;366(9492):1197-209. PubMed PMID: 16198769. Epub 2005/10/04. eng.
7. Wolf AM, Colditz GA. Current estimates of the economic cost of obesity in the United States. Obesity research. 1998 Mar;6(2):97-106. PubMed PMID: 9545015. Epub 1998/04/17. eng.
8. Lee SH, Lee JS. The Reductive Effects of Oriental Medicine on the Body Fat and Abdominal Obesity. J Korean Soc Study Obes. 2001;1(1):33-42.
9. 김석, 편승희, 김태희. 동의보감을 위주로한 비만의원인, 증상, 치료법 연구. 대한한의학회지. 1998;19(2):125-36.
10. 허준. 동의보감: 남산당; 1991.
11. Powell AG, Apovian CM, Aronne LJ. New drug targets for the treatment of obesity. Clinical pharmacology and therapeutics. 2011 Jul;90(1):40-51. PubMed PMID: 21654742. Epub 2011/06/10. eng.
12. Yin J, Zhang H, Ye J. Traditional chinese medicine in treatment of

- metabolic syndrome. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2008 Jun;8(2):99–111. PubMed PMID: 18537696. Pubmed Central PMCID: PMC2467395. Epub 2008/06/10. eng.
13. Ahn IS, Do MS, Kim SO, Jung HS, Kim YI, Kim HJ, et al. Antiobesity effect of Kochujang (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3–L1 adipocytes. *Journal of medicinal food*. 2006 Spring;9(1):15–21. PubMed PMID: 16579723. Epub 2006/04/04. eng.
 14. Chen HC, Farese RV, Jr. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity: lessons from DGAT1–deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005 Mar;25(3):482–6. PubMed PMID: 15569818. Epub 2004/12/01. eng.
 15. Koutnikova H, Auwerx J. Regulation of adipocyte differentiation. *Annals of medicine*. 2001 Nov;33(8):556–61. PubMed PMID: 11730163. Epub 2001/12/04. eng.
 16. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006 Dec;7(12):885–96. PubMed PMID: 17139329. Epub 2006/12/02. eng.
 17. Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *The Journal of nutrition*. 2000 Dec;130(12):3116S–21S. PubMed PMID: 11110883. Epub 2001/01/04. eng.
 18. Ntambi JM, Young–Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *The Journal of nutrition*. 2000 Dec;130(12):3122S–6S. PubMed PMID: 11110885. Epub 2001/01/04. eng.
 19. Fox KE, Fankell DM, Erickson PF, Majka SM, Crossno JT, Jr., Klemm DJ. Depletion of cAMP–response element–binding protein/ATF1 inhibits

- adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. The Journal of biological chemistry. 2006 Dec 29;281(52):40341-53. PubMed PMID: 17071615. Epub 2006/10/31. eng.
20. Schroeder-Gloeckler JM, Rahman SM, Janssen RC, Qiao L, Shao J, Roper M, et al. CCAAT/enhancer-binding protein beta deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in Lepr(db/db) mice. The Journal of biological chemistry. 2007 May 25;282(21):15717-29. PubMed PMID: 17387171. Pubmed Central PMCID: PMC4109269. Epub 2007/03/28. eng.
 21. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, et al. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. Science (New York, NY). 1995 Aug 25;269(5227):1108-12. PubMed PMID: 7652557. Epub 1995/08/25. eng.
 22. Siersbaek R, Mandrup S. Transcriptional networks controlling adipocyte differentiation. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2011;76:247-55. PubMed PMID: 21900150. Epub 2011/09/09. eng.
 23. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. Nature reviews Molecular cell biology. 2007 Oct;8(10):774-85. PubMed PMID: 17712357. Epub 2007/08/23. eng.
 24. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell metabolism. 2005 Jan;1(1):15-25. PubMed PMID: 16054041. Epub 2005/08/02. eng.
 25. Kim SK, Kong CS. Anti-adipogenic effect of dioxinohydroeckol via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes. Chemico-biological interactions. 2010 Jun 7;186(1):24-9. PubMed PMID: 20385110. Epub 2010/04/14.

eng.

26. Huang B, Yuan HD, Kim do Y, Quan HY, Chung SH. Cinnamaldehyde prevents adipocyte differentiation and adipogenesis via regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) and AMP-activated protein kinase (AMPK) pathways. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011 Apr 27;59(8):3666-73. PubMed PMID: 21401097. Epub 2011/03/16. eng.
27. Tuncman G, Erbay E, Hom X, De Vivo I, Campos H, Rimm EB, et al. A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 May 2;103(18):6970-5. PubMed PMID: 16641093. Pubmed Central PMCID: PMC1447594. Epub 2006/04/28. eng.
28. Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nature genetics*. 2001 Jan;27(1):121-4. PubMed PMID: 11138012. Epub 2001/01/04. eng.
29. Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Miles LM, Phanavanh B, Starks TN, et al. Lipin expression is attenuated in adipose tissue of insulin-resistant human subjects and increases with peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Diabetes*. 2006 Oct;55(10):2811-8. PubMed PMID: 17003347. Epub 2006/09/28. eng.
30. 한중현 김. 한방약리학. 서울: 의성당; 2004.
31. Kim SO, Park JY, Jeon SY, Yang CH, Kim MR. Saikosaponin a, an active compound of *Radix Bupleuri*, attenuates inflammation in hypertrophied 3T3-L1 adipocytes via ERK/NF-kappaB signaling pathways. *International*

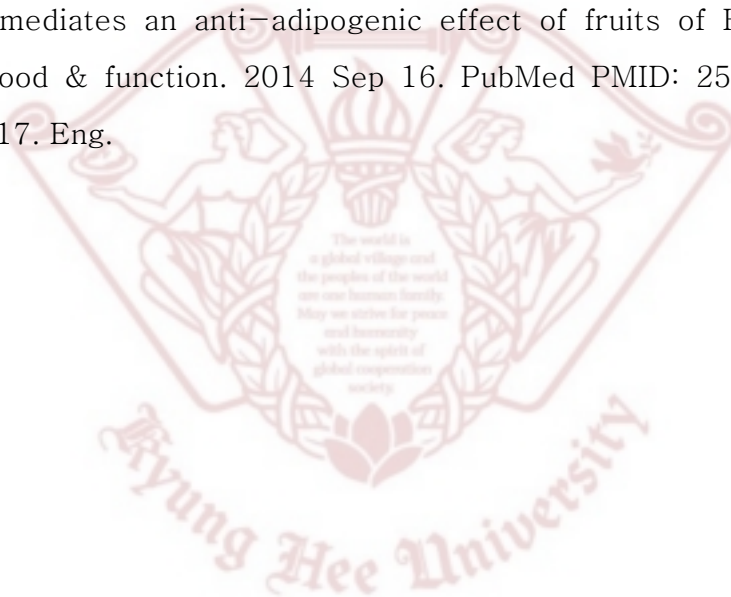
- journal of molecular medicine. 2015 Apr;35(4):1126–32. PubMed PMID: 25672367. Epub 2015/02/13. eng.
32. Lee H, Kang R, Hahn Y, Yang Y, Kim SS, Cho SH, et al. Antiobesity effect of baicalin involves the modulations of proadipogenic and antiadipogenic regulators of the adipogenesis pathway. *Phytotherapy research : PTR*. 2009 Nov;23(11):1615–23. PubMed PMID: 19813240. Epub 2009/10/09. eng.
33. Kwak DH, Lee JH, Song KH, Ma JY. Inhibitory effects of baicalin in the early stage of 3T3–L1 preadipocytes differentiation by down–regulation of PDK1/Akt phosphorylation. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014 Jan;385(1–2):257–64. PubMed PMID: 24091917. Epub 2013/10/05. eng.
34. Kimura Y, Kubo M, Tani T, Arichi S, Ohminami H, Okuda H. Studies on *Scutellariae radix*. III. Effects on lipid metabolism in serum, liver and fat cells of rats. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 1981 Aug;29(8):2308–12. PubMed PMID: 7318038. Epub 1981/08/01. eng.
35. Cha MH, Kim IC, Lee BH, Yoon Y. Baicalein inhibits adipocyte differentiation by enhancing COX–2 expression. *Journal of medicinal food*. 2006 Summer;9(2):145–53. PubMed PMID: 16822198. Epub 2006/07/11. eng.
36. Lu RH, Li Y, Zhang LJ, Yang GS. [Effects of baicalein on the proliferation and differentiation of pig preadipocyte]. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*. 2006 Nov;22(6):1002–6. PubMed PMID: 17168327. Epub 2006/12/16. chi.
37. Pu P, Wang XA, Salim M, Zhu LH, Wang L, Chen KJ, et al. Baicalein, a natural product, selectively activating AMPK α 2 and ameliorates metabolic disorder in diet–induced mice. *Molecular and cellular*

- endocrinology. 2012 Oct 15;362(1-2):128-38. PubMed PMID: 22698522. Epub 2012/06/16. eng.
38. Seo MJ, Choi HS, Jeon HJ, Woo MS, Lee BY. Baicalein inhibits lipid accumulation by regulating early adipogenesis and m-TOR signaling. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2014 May;67:57-64. PubMed PMID: 24560969. Epub 2014/02/25. eng.
39. Bak EJ, Kim J, Choi YH, Kim JH, Lee DE, Woo GH, et al. Wogonin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia via PPARalpha activation in db/db mice. Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland). 2014 Feb;33(1):156-63. PubMed PMID: 23623334. Epub 2013/04/30. eng.
40. Yoon SH, Oh KH, Park EJ. The Effect of Bupleuri Radix Extract and Scutellariae Radix Extract on the Benzo(a) pyrene-induced Hepatotoxicity in Rats. RESEARCH BULLETIN. 1992;537-550.
41. Lee CY, Hsu YC, Wang JY, Chen CC, Chiu JH. Chemopreventive effect of selenium and Chinese medicinal herbs on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced hepatocellular carcinoma in Syrian hamsters. Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. 2008 Jul;28(6):841-55. PubMed PMID: 18346132. Pubmed Central PMCID: PMC2440552. Epub 2008/03/19. eng.
42. Lin AM, Ping YH, Chang GF, Wang JY, Chiu JH, Kuo CD, et al. Neuroprotective effect of oral S/B remedy (Scutellaria baicalensis Georgi and Bupleurum scorzonerifolium Willd) on iron-induced neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic system of rat brain. Journal of ethnopharmacology. 2011 Apr 12;134(3):884-91. PubMed PMID: 21296142.

43. Lee CY, Wang JY, Chen TC, Jiang JK, Peng CH, Kuo CD, et al. Effects of S/B remedy containing *Scutellaria baicalensis* and *Bupleurum scorzonerifolium* on hepatic interleukin-6 related signal transducer and activator of transcription 3 activation in mice through cell-cell interaction. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2011;34(5):727-33. PubMed PMID: 21532164. Epub 2011/05/03. eng.
44. 高本敬次朗 柴. 柴胡の藥理研究. 藥學雜誌. 1969;89권(5호,10호):712-20, 1367-78.
45. Kwan Su K, Seung Tack L, Young Am C. 柴胡의 藥理成分 特性. *KOREAN JOURNAL OF CROP SCIENCE*. 1996 8;41(S):123-44. 한국어.
46. 장중경. 상한론정해: 일증사; 2003. 215-7 p.
47. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):635-43. PubMed PMID: 10766250. Epub 2000/04/15. eng.
48. Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetic factors in human obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2007 Mar;8 Suppl 1:37-40. PubMed PMID: 17316299. Epub 2007/02/24. eng.
49. Garrow J. Treatment for obesity. *Lancet*. 1998 May 23;351(9115):1590. PubMed PMID: 10326575. Epub 1999/05/18. eng.
50. Kissebah AH, Freedman DS, Peiris AN. Health risks of obesity. *Med Clin North Am*. 1989;73:111-38.
51. Park SS, Cho SW. Effects of Taeyeumjowee-tang on Loss in Body Weight, Plasma Lipids and UCPI Revelation of Fated White Rats. *The Journal of Korean Oriental Medicine*. 2004 2004-06-28;25(2):87-97.
52. Hwang SJ, Song TW, Oh MS. The Inhibitory Effects of Bangpuangtongseoung-san on the Obese gene and Obese Inhibitory about

Obese-mouse induced by High Fat Diet. The Journal of Korean Oriental Medicine. 2006 2006-03-30;27(1):11-22.

53. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995 Sep 26;92(20):9034-7. PubMed PMID: 7568067. Pubmed Central PMCID: PMC40918. Epub 1995/09/26. eng.
54. Kim HL, Sim JE, Choi HM, Choi IY, Jeong MY, Park J, et al. The AMPK pathway mediates an anti-adipogenic effect of fruits of *Hovenia dulcis* Thunb. Food & function. 2014 Sep 16. PubMed PMID: 25224378. Epub 2014/09/17. Eng.



Abstract

Study on Interaction between *Scutellariae Radix* and *Bupleuri Radix* in 3T3-L1 adipocytes

by Hyewon Park

Master of Korean Medicine

Graduate School of Kyung Hee University

Advised by Prof. Jae-Young Um

Advised by Prof. Hyeung-Jin Jang

Obesity has become a major health threat in developed countries. However, current medications for obesity are limited because of their adverse effects. Interest in natural products for the treatment of obesity is thus rapidly growing. Korean Medicine (KM) is characterized by the wide use of herbal formulas. However, the combination rule of herbal formulas in KM lacks experimental evidence. According to Shennong's Classic of Materia Medica, the earliest book of herbal medicine, among the seven relationships between herbs, Chiljeong, *Bupleuri Radix* (BR) and *Scutellariae Radix* (SR) possess the Sangsoo relationship, which means they have synergistic features when used together. Therefore these two are frequently used together in prescriptions such as Sosihotang. In this study, we have shown the effects of BR, SR, and their combination on obesity in 3T3-L1 adipocytes. BR, SR, and BR-SR mixture significantly decreased lipid accumulation and the expressions of two major adipogenesis genes, peroxisome proliferator-activated receptor γ

(PPAR γ) and CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), and their downstream genes, adiponectin, adipocyte selective fatty acid binding protein (aP2) and LIPIN1 in 3T3-L1 cells. In addition, the BR-SR mixture had synergistic effects compared with BR or SR on inhibition of adipogenic-gene expressions. BR and SR also inhibited the protein expressions of PPAR γ and C/EBP α . Furthermore, the two extracts successfully activated AMP-activated protein kinase (AMPK), the key regulator of energy metabolism. When compared to those of BR or SR, the BR-SR mixture showed higher inhibition rates of PPAR γ and C/EBP α , along with higher activation rate of AMPK.

These results indicate a new potential anti-obese pharmacotherapy and also provide scientific evidence supporting the usage of herbal combinations instead of mixtures in KM.

Key words

Obesity, Chiljeong, Sangsoo, Bupleuri Radix, Scutellariae Radix