어혈치방 3종이 지방전구세포 분화에 미치는 영향

이호영^{1#}, 심은형¹, 이명수², 이주아^{1*}

1 : 한국한의학연구원 한의기반연구부, 2 : 한국한의학연구원 임상연구부

Anti-adipogenesis Effects of 3 Herbal Formula on Blood Stasis

Hoyoung Lee^{1#}, Eun Hyoun Shim¹, Myeong Soo Lee², Ju Ah Lee^{1*}

1 : KM Fundamental Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine 483 Expo-ro,
Yuseong-gu, Daejeon, 305-811, Republic of Korea

2 : Clinclal Reserach Division, Korea Institute of Oriental Medicine 483 Expo-ro,
Yuseong-gu, Daejeon, 305-811, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Blood stasis (BS) is related to be caused by blood circulation and stagnation which are cancer, atherosclerosis and hyperlipidemia in traditional medicine. We extracted 3 kinds of BS formula; Seogakjihwang-tang (SGT), Tonggyuhawlhyul-tang (THT), Hyulbuchukeo-tang (HCT). This study was conducted to investigate whether the 3 kinds of herbal formula extracts have inhibitory efficacy association with anti-adipogenesis.

Methods : To investigate the anti-adipogenesis, we used the mouse fibroblast cell line, 3T3-L1 which differentiated into adipocytes in response to insulin, IBMX and dexamethasone (MDI). Cytotoxicity of herbal formula extracts were examined by CCK-8 kit. Intracellular lipid droplets were detected by Oil-Red-O staining. Triglyceride (TG) and leptin were measure using elisa kit.

Results : The yield of water extracts was 14.62% (SGT), 21.27% (THT), 20.02% (HCT). Lipid accumulation was reduced significantly by 3 kinds of herbal formula compared to control. Especially, THT and HCT decreased lipid droplet, respectively at all concentration. The TG and leptin were also inhibited by 3 kinds of herbal formula. The IC50 of TG were 280.51 $\mu\text{g/ml}$ (SGT), 52.62 $\mu\text{g/ml}$ (THT), 313.99 $\mu\text{g/ml}$ (HCT). The IC50 of leptin were 348.76 $\mu\text{g/ml}$ (SGT), 164.02 $\mu\text{g/ml}$ (THT), 257.00 $\mu\text{g/ml}$ (HCT). THT was better than other herbal formula on anti-adipogenesis.

Conclusion : kinds of herbal formula inhibited adipogenesis in MDI-induced 3T3-L1 adipocytes, as indicated by the significant reduction in TG and leptin concentration without cytotoxicity. Therefore, 3 kinds of herbal formula for BS might act as a therapeutic agent for preventing lipid diseases, such as obesity and atherosclerosis.

Key words : Blood stasis, Seogakjihwang-tang (Xijiao Dihuang Decoction), Tonggyuhawlhyul-tang (Tongqiaohuoxue Decoction), Hyulbuchukeo-tang (Xuefuzhuyu decoction), anti-adipogenesis

I. 서 론

한의학에서 어혈이란 혈액이 제대로 순환하지 못하고 한 곳에 정체되어 있는 증상을 말한다. 혈액학적으로는 혈액의

투과성이나 정체로 인한 질병 등의 원인이 되는 변증으로 순환장애의 기능개념으로 인식되고 있다. 어혈로 인한 질환은 불임, 자궁내막증, 자궁근종, 월경 곤란증 등을 포함하는 부인과 질환과 악성 종양, 만성 두통, 동맥경화, 간경화 등을 포

*Corresponding author : Ju Ah Lee, PhD, KM Fundamental Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, South Korea.

· Tel : +82-42-868-9386 · Fax: +82-42-868-9622 · E-mail : motoong@kiom.re.kr

#First author : Hoyoung Lee, KM Fundamental Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, South Korea.

· Tel : +82-42-868-9514 · Fax: +82-42-868-9622 · E-mail : lhoyoung@kiom.re.kr

· Received : 7 October 2016 · Revised : 1 November 2016 · Accepted : 16 November 2016

합하는 내분비 질환, 그 외 자반, 만성 염증 등에 영향을 준다고 보고되고 있다. 최근에는 어혈을 연관된 질환의 병인으로 보고 어혈로 인한 내분비 질환 및 여성 질환과 관련된 어혈 연구가 다양하게 진행되고 있다.

서구화된 식습관과 생활환경의 변화로 인해 에너지 불균형으로 인한 체내 중성지방의 축적이 비만을 야기하며 비만과 더불어 당뇨, 동맥경화, 고지혈증 등 다양한 질환이 증가하고 있다²⁾. 동맥경화 등 지질관련 질환들은 지방 대사의 불균형으로 인해 야기되며 한의학에서는 어혈이 하나의 원인으로 작용한다고 보고 있으며 어혈과 동맥경화, 심근경색 등 지방대사 및 혈관 염증과 연관된 연구가 증가하는 추세이다¹⁾. 본 연구는 어혈 처방들이 지방대사에 작용하는 기전을 확인하고자 어혈 처방 중 심혈관계 질환에 많이 쓰이고 있는 것으로 알려진 서각지황탕(犀角地黃湯), 통규활혈탕(通竅活血湯), 혈부축어탕(血府逐瘀湯)에 대한 지방전구세포억제 효과를 확인하고자 하였다.

서각지황탕(犀角地黃湯)은 어혈을 삭히고 한(寒)에 상하여 위(胃)에 화열(火熱)이 성하여 양독(陽毒), 발광(發狂)을 치료하는 처방으로 알려져 있으며 외상성 통증³⁾, 바이러스성 출혈열⁴⁾, 간손상⁵⁻⁶⁾, 출혈성 뇌혈관질환⁷⁾ 등에 대한 연구가 보고되었다. 통규활혈탕(通竅活血湯)은 혈(血)을 통하게 하고 어혈(瘀血)로 인한 두통, 거친 피부, 설담(舌淡)하고 어반(瘀斑)이 있는 증상을 치료하는 처방으로 알려져 있으며 심혈관질환⁸⁾, 신경손상 치료⁹⁾, 간손상¹⁰⁾, 항암¹¹⁾에 대한 연구가 진행되었다. 혈부축어탕(血府逐瘀湯)은 어혈로 인한 가슴통증, 두통 등 통증

치료를 위해 사용하는 처방으로 정맥혈전증¹²⁾, 고지혈증¹³⁾, 부인과질환¹⁴⁾, 혈전 용해¹⁵⁾, 항암¹⁶⁻¹⁷⁾, 심혈관계 질환과 관련된 혈전 생성 억제¹⁸⁻¹⁹⁾ 등 다양한 효능에 대한 보고가 있었다.

세가지 처방이 어혈로 인한 심혈관계 질환에 공통적으로 사용된다는 근거를 바탕으로 서각지황탕(犀角地黃湯), 통규활혈탕(通竅活血湯), 혈부축어탕(血府逐瘀湯)에 mouse fibroblast cell line인 3T3-L1세포를 이용하여 대한 지방 전구세포의 증식억제, 지방형성 (adipogenesis)억제, 지방분해 등의 기전을 확인하고 각 처방의 활성을 비교하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물의 제조

본 실험에 사용된 약재는 (주) 옴니허브(Deagu, Korea)에서 구입하였다. 실험에 사용한 처방 구성은 Table 1과 같다. 서각지황탕에 사용되는 서각방은 수입이 금지되어 수우각(水牛角)으로 대체되었다. 각 처방은 배합량의 약 10배에 해당하는 전탕수를 가한 뒤 초고속 진공 저온 농축 추출기 (COSMOS-660, Kyungseo Machine, Incheon, Korea)를 이용하여 100℃에서 가압하여 3시간 동안 전탕하였다. 전탕액은 여과지를 사용하여 여과 후 동결건조를 진행하였다. 동결 건조된 추출물은 -70℃에서 보관하였다. 추출물은 PBS에 녹인 후 0.20 μm syringe filter로 여과하여 처리하였다.

Table 1. Composition of herbal formula

처방명	약재명	원산지	생약명	양(g)	Yield (%)
犀角地黃湯	生地黃	Korea	Rehmaniae Recens Radix	30	14, 62
	赤芍藥	China	Paeoniae Rubra Radix	12	
	犀角鎔 (水牛角)	China	Rhinoceri Cornu (Bubalys bubalis Linnaeus)	1	
	牡丹皮	China	Moutan Cortex Radicis	9	
通竅活血湯	赤芍藥	China	Angelicae Sinens Radix	4	21, 27
	川芎	Korea	Rehmaniae Recens Radix	4	
	桃仁	China	Persicae Semen	12	
	紅花	Korea	Carthami Flos	12	
	蘆薈根	Korea	Allium fistulosum L	3	
	大棗	Korea	Zizyphi Fructus	2	
	生薑	Korea	Zingiberis Recens Rhizoma	12	
	木香	China	Saussureae Radix	5	
血府逐瘀湯	當歸	Korea	Angelicae Sinens Radix	12	20, 02
	生地黃	Korea	Rehmaniae Recens Radix	12	
	桃仁	China	Persicae Semen	15	
	紅花	Korea	Carthami Flos	12	
	枳殼	China	Ponciri Seu Aurantii Fructus	8	
	赤芍藥	China	Paeoniae Rubra Radix	8	
	柴胡	China	Bupleuri Radix	4	
	甘草	China	Glycyrrhizae Radix	4	
	桔梗	Korea	Platycodi Radix	6	
	川芎	Korea	Cnidii Rhizoma	6	
	牛膝	China	Achyranthis Bidentatae Radix	12	

2. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Calf serum (CS), penicillin-streptomycin 및 phosphate-buffered saline (PBS)은 Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였으며, dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), insulin (Sigma-Aldrich, MO, USA), DMSO, lipopolysaccharide (LPS), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Cell Counting Kit-8 (CCK-8)은 Dojindo (Kumamoto, Japan) 제품, Leptin (R&D, MI, USA) 제품, Triglyceride (Bioassay systems, USA) 제품을 구입하여 사용하였다

3. 세포배양 및 분화

Mouse fibroblast cell line인 3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 DMEM (10% calf serum 1% P&S)배지로 37℃ 및 5% CO₂조건에서 배양하였다. 지방세포 분화를 위해 3×10^5 cells/well씩 6well에 배양하였다. 세포가 confluency 되었을 때 1 μ M DEX, 5 mM IBMX, 1 μ g/mL insulin (MDI) 이 포함된 DMEM (10% FBS, 1% P&S)로 배양하고 각 처방을 농도별 (62.5, 125, 250, 500 μ g/mL)로 처리한 후 48시간을 배양하였다. 48시간 후 DMEM (10% FBS, 1% P&S)배지에 1 μ g/mL insulin이 첨가된 배지를 3일, 2일 간격으로 교체하면서 지방전구세포를 분화하고 동시에 처방을 농도별로 처리하였다. 7일동안 분화한 세포, 상층액을 이용하여 효능 확인을 진행하였다(Fig 1).

Fig 1. Time schedule of differentiation on 3T3-L1

4. 세포독성평가

서각지황탕(Xijiao Dihuang Decoction), 통규활혈탕(Tongqiaohuoxue Decoction), 혈부축어탕(Xuefuzhuyu decoction), 세포독성을 알아보기 위해 3T3-L1 세포를 96well plate에 8×10^3 cells/well씩 분주하여 overnight 한 후, 추출물을 농도별(0, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 μ g/mL)로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 이후 CCK-8 용액을 10 μ L씩 첨가하여 4시간 동안 배양하고 microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 대조군과 비교하여 결과값(% of control)을 계산하여 이후 실험

에서는 세포독성이 나타나지 않은 최고 농도를 기준으로 진행하였다.

5. Oil-Red-O 염색

세포를 분화하는 과정에 발생한 지방구를 확인하기 위하여 Oil-Red-O (0.3% Oil Red O in 60% isopropanol) 염색을 진행하였다. 7일동안 분화 시킨 후 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척하고 10% formaldehyde 용액으로 고정시켰다. 다시 PBS로 세척 후, Oil-Red-O 1 mL/well씩 분주하여 실온에서 1시간 교반 염색하였다. 염색이 완료된 후 Oil-Red-O 용액을 제거한 후 증류수로 4회 세척 후 위상차 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 을 이용하여 관찰하였다. 흡광도를 측정하기 위해 DMSO로 지방구를 용출시켜 microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 지방 전구세포에서의 중성지방 및 leptin 생성량 측정

지방 전구세포에서 중성지방과 leptin의 양을 측정하기 위해 7일 분화된 세포를 사용하였다. 중성지방은 7일 분화시킨 후 PBS로 3회 세척 후 5% Triton X-100 500 μ L를 이용하여 lysate를 수집한다. 수집된 lysate는 3000 rpm에서 3분간 원심분리(4℃)후 상등액을 분리한다. 분리된 상층액은 제조사 (Bioassay System, CA, USA)의 방법대로 시약을 제조한 후 microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정한다. Leptin은 7일 분화된 지방전구세포의 상층액을 수집하여 leptin elisa kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 제조사의 방법대로 측정한다.

7. 통계 처리

본 연구 결과의 통계 분석은 SYSTAT (SPSS Inc, USA, ver 13.0)을 이용하여 분석하였다 (평균±평균오차). 유의성 분석은 ANOVA 검정을 실시하였으며 Bonferroni의 다중범위 검정법으로 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

III. 결 과

1. 처방별 세포독성

서각지황탕, 통규활혈탕, 혈부축어탕의 각각의 수율은 14.62%, 21.27%, 20.02%였다. 각 처방에 대한 3T3-L1 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 CCK-8 assay를 진행하였다. 그 결과, 모든 처방에서 1000 μ g/mL이 세포 독성이 없음을 확인하였다 (Fig. 2). 이후 모든 실험에서의 시료처리는 62.5, 125, 250, 500 μ g/mL로 처리하여 효능을 검색하였다.

Fig 2. Viability of Seogakjihwang-tang (SGT), Tonggyuhawlhyl-tang (THT), Hyulbuchukeo-tang (HCT) in 3T3-L1 cells. The cells were treated with herbal formula extraction from 10 $\mu\text{g/mL}$ to 1000 $\mu\text{g/mL}$ for 48 hr. Viability was measured by CCK-8 kit. The data are mean values of three experiments mean $\pm$ SEM

2. 지방전구세포의 지방 축적 효과

서각지황탕, 통규활혈탕, 혈부축어탕의 지방 축적에 대한 효과를 보기 위해 3T3-L1 지방전구세포의 lipid droplet 생성에 대한 효능확인을 위하여 지방전구세포를 분화 유도 후 lipid droplet만 특이적으로 염색하는 Oil-red-O 염색법을 실시하였다. MDI를 이용한 지방전구세포에 양성대조군인

SB203580을 처리하였을 때, 약 50~70%까지 지방구 생성이 억제되는 것을 확인하였다. 서각지황탕은 250 $\mu\text{g/mL}$ 에서 40%, 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 64%까지 지방구 생성이 억제되었다. 통규활혈탕은 모든 농도에서 약 70%의 지방구 생성억제 효과가 있었다. 혈부축어탕은 모든 농도에서 약 60%의 지방구 생성억제 효과를 확인하였다. (Fig. 3)

Fig 3. Inhibitory effect of the lipid accumulation for Seogakjihwang-tang (SGT), Tonggyuhawlhyl-tang (THT), Hyulbuchukeo-tang (HCT) on MDI-induced 3T3-L1 adipocytes. (A) Fat droplets were measured by Oil red O staining and observed using microscope (at X100). (B) The absorbance of lipid accumulation which was Oil Red O dye was dissolved in DMSO (530nm). The data are mean values of three experiments mean $\pm$ SEM; ## P <0.01 compared with control, * P <0.05; ** P <0.01 compared with the MDI.

3. 중성지방 억제 효과

서각지황탕, 통규활혈탕, 혈부축어탕에 대한 중성지방 생성에 대한 효과를 검색하였다. MDI로 3T3-L1의 지방전구세포를 분화했을 때 정상군에 비해 MDI 처리군이 4~10배정도 증가하였다. 동시에 양성대조군이 SB203085 처리 시 중성지방의 생성이 60~70% 감소되었다. 서각지황탕 처리군은 농도 의존적으로 중성지방량의 분비를 억제하며 특히 500 $\mu\text{g/mL}$

15.19 $\pm$ 6.00 μm (73%)까지 억제하였다. 통규활혈탕 처리군 역시 농도 의존적으로 중성지방의 분비가 억제된 것을 확인하였다. 통규활혈탕 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 87.52 $\pm$ 6.72 μm (50%), 125 $\mu\text{g/mL}$ 에서 79.88 $\pm$ 7.49 μm (57%), 250 $\mu\text{g/mL}$ 에서 73.71 $\pm$ 4.35 μm (63%), 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 72.83 $\pm$ 3.97 μm (64%)를 분비하였다. 혈부축어탕은 최고농도인 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 83.70 $\pm$ 0.59 μm (54%)로 다른 약제에 비해 중

성지방 억제효과가 낮았다. 또한, 각 처방의 IC₅₀를 구해보면 서각지황탕은 280.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 통규활혈탕은 52.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 혈부축어탕은 313.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 세가지 처방 중 통규활혈탕의 중성지방 분비 억제 효과가 가장 우수하였다 (Fig. 4).

4. Leptin 분비 억제 효과

지방세포 분화 억제를 확인하기 위하여 분화된 지방전구세포의 상층액에서 leptin의 분비량을 측정하였다. MDI 분화 시 대조군에 비해 유도군이 15배 이상 leptin이 증가한 것을 확인하였다. 또한 양성대조군인 SB203580 처리 시 leptin의 유도군 대비 약 80%의 leptin 억제 효과가 있었다.

서각지황탕을 처리하였을 때 최고 처리농도인 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 34.08 $\pm$ 3.00 pg/mL로 유도군(141.58 $\pm$ 8.70 pg/mL)에 비해 약 80%를 억제하였다. 통규활혈탕 처리군은 유도군

(156.64 $\pm$ 9.49 pg/mL)에 비해 처리한 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 79.97 $\pm$ 2.94 pg/mL (49%), 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 56.64 $\pm$ 2.22 pg/mL (65%), 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 42.20 $\pm$ 4.84 pg/mL (74%), 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 34.42 $\pm$ 1.92 pg/mL (79%)로 농도 의존적으로 leptin의 분비를 억제한 것을 확인하였다. 혈부축어탕 처리군 역시 유도군(156.64 $\pm$ 9.49 pg/mL)에 비해 처리한 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 85.53 $\pm$ 8.68 pg/mL (46%), 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 61.08 $\pm$ 6.94 pg/mL (62%), 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 53.31 $\pm$ 1.11 pg/mL (67%), 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 38.86 $\pm$ 4.01 pg/mL (76%)로 모든 농도에서 약 50% 이상의 leptin 분비를 억제하였다. 각 처방의 leptin 분비를 억제한 IC₅₀를 계산한 결과값은 서각지황탕 348.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 통규활혈탕 164.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 혈부축어탕 257.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 세 처방 중 통규활혈탕의 leptin의 감소효과가 가장 우수하였다 (Fig. 5)

Fig 4. Inhibitory effect of Seogakjihwang-tang (SGT), Tonggyuhawhyul-tang (THT), Hyulbuchukeo-tang (HCT) on triglyceride in MDI-induced 3T3-L1 adipocytes. The data are mean values of three experiments mean $\pm$ SEM; ##(0.01 compared with control, * P < 0.05; ** P < 0.01 compared with the MDI.

Fig 5. Inhibitory effect of Seogakjihwang-tang (SGT), Tonggyuhawhyul-tang (THT), Hyulbuchukeo-tang (HCT) on leptin in MDI-induced 3T3-L1 adipocytes. The data are mean values of three experiments mean $\pm$ SEM; ##(0.01 compared with control, * P < 0.05; ** P < 0.01 compared with the MDI.

IV. 고 찰

본 연구는 어혈이 지질 대사와도 밀접한 관계가 있을 것으로 고려하여 어혈 처방들의 지방전구세포 억제에 대한 효능 비교하고 어혈 처방의 anti-adipogenesis 관련 질환 치료제로의 가능성을 밝히고자 연구를 진행하였다. 특히 본 연구에서 추출한 서각지황탕, 통규활혈탕, 혈부축어탕은 어혈 관련 암이나 혈관질환에 대한 연구는 다양하게 진행하였지만 지방전구세포에 미치는 영향에 대한보고는 미비하였다. 연구 결과 세가지 처방 모두 지방전구세포의 증식, 중성지방 및 leptin의 생성 억제를 한다는 것을 확인하였다. 그 중 통규활혈탕의 활성이 다른 두 처방보다 우수함을 확인하였다. 통규활혈탕은

심혈관 관련 질환에 대한 질환 치료에 다용되고 있는데 본 연구 결과를 통하여 지방세포 증식 억제 효과가 우수함을 확인하였으며 이는 향후 대사성 질환치료에도 사용될 가능성을 제시하였다고 사료된다. 또한, 본 연구에서 선택한 세가지 어혈 처방 모두 지방세포분화를 억제하는 것으로 지방세포 증식 억제를 통해 관련 단백질의 발현 또한 억제하는 것으로 확인되었다.

어혈은 동양의학에서 전통적인 병리학적 개념으로 인체의 생리적인 기능의 정체와 관련이 있다고 알려져 있다²⁰⁾. 즉, 생리적 기능을 상실한 혈액이 체내 일정부위에 응취되어 형성한 병리적 산물로서 한편으로는 기혈유행에 영향을 미쳐 다양한 질병을 야기하는 중요 속발성 발병인자의 하나라고 알려져 있다. 어혈로 인해 혈액순환장애, 혈액점도이상 등으로 인한 병리변화상태를 포괄하고 혈관 손상 및 동맥경화 등이 어혈과 관련성이 있다고 알려져 있다²¹⁻²²⁾. 뇌경색 환자의 동맥경화에 대

한 한방적인 변증지표와의 연관성에 대한 연구 결과 동맥 경화에 대한 한방적인 변증지표 인 氣虛, 血瘀, 瘀血, 水滯로 진단을 한다고 알려져 있다. 4가지 변증 중 어혈 변증이 가장 동맥경직도와 밀접한 관계를 가지며 질환 인자들에 많은 영향을 준다는 보고가 있었다²³⁻²⁴⁾. Adipocyte differentiation은 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 과정을 의미하여 이를 통해 지방세포 수와 크기가 증가한다. 지방조직은 에너지저장 역할 뿐만 아니라 여러 호르몬들을 분비하고 지방대사 및 당대사를 포함한 신체 에너지 대사를 조절하는 역할을 수행한다²⁵⁾. 지방전구세포가 분화하는 과정에서 지방세포와 관련된 C/EBPs PPAR와 같은 전사인자들의 활성이 동반된다. 이런 전사 인자들은 지방세포증식에 영향을 주며 C/EBPs PPAR 등의 단백질 발현을 조절로 인해 지방세포 증식과 관련된 여러 기전을 설명할 수도 있다. 또한 C/EBPs PPAR 등의 발현이 증가되면 중성지방 및 지방구의 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 지방생성 억제 효과를 확인하기 위하여 지방구만을 특이적으로 염색하는 Oil-Red-O 염색을 한 결과, 모든 처방에서 지방생성 억제 효과를 확인했다. 지방구의 감소뿐만 아니라 중성지방의 생성 또한 농도 의존적으로 감소하였다. 지방세포 내의 지방구는 지질의 대사 및 조절에 중요한 역할을 하며 지방구 내에 주로 존재하는 중성지방의 분해와 이로 인한 glycerol의 유출은 세포 내 지방의 축적을 조절하는 중요한 기전으로 알려져 있다

지방대사와 관련하여 leptin은 지방세포에서 특이적으로 분비되는 호르몬과 효소로 지방세포 증가에 관한 지표로 사용된다. Leptin은 중추신경계를 통해 식욕과 체중조절을 유도하는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. Leptin 분비를 억제한다는 것은 지방축적억제에 중요한 역할을 하는 것으로 본 연구에 사용된 어혈 처방들은 모두 지방 분해를 억제하여 중성지방 및 leptin 분비 억제에 효과가 있는 것으로 사료된다. 본래 한의학에서는 고지혈증을 비롯한 지질 이상질환이 비허로 인해 발생된 습담이 기혈의 흐름을 막고 정체시켜 발생하는 것과 연관 지어 주된 연구가 이루어졌다²⁷⁾. 그러나 본 연구에서는 한의학에서 대표적 병리산물로 보는 어혈과 지방세포의 연관성에 대한 연구를 진행하였다.

본 연구에서 사용된 처방들은 지방세포분화 및 세포 내 중성지방 생성 억제를 통해 지방세포의 감소와 지방축적을 억제하는 것을 확인하였고 이 결과를 바탕으로 이 처방들은 비만 및 대사성 질환과 관련된 질환 치료제로도 사용이 가능할 것으로 사료되며 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 어혈에 쓰이는 처방인 서각지황탕, 통규활혈탕, 혈부축어탕 3종에 대한 anti-adipogenesis 효과를 확인하기 위하여 3T3-L1 세포를 이용하여 세포독성, 지방세포 분화확인, 중성지방 및 leptin 생성량에 대한 연구를 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세가지 처방 모두 3T3-L1 세포에서 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 세포독성이 없었다.

2. 모든 처방에서 대조군에 비해 지방전구세포 분화가 억제됨을 Oil-Red-O 염색을 확인하였다.
3. 모든 처방에서 대조군에 비해 중성지방 생성을 농도의존적으로 감소시켰다.
4. 3 처방 모두 대조군에 비해 leptin의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다.

위의 결과들에 의해 어혈 처방인 서각지황탕, 통규활혈탕, 혈부축어탕 3종은 anti-adipogenesis 효과가 있음을 확인하였다. 이는 기존에 사용되는 질환뿐만 아니라 비만 등 지방분화와 관련된 질환의 치료제로서의 가능성에 대한 기초적 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료되며 이에 대한 연구가 추후 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원(#16110)의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

1. Wang Y, Li C, Chang H, Lu LH, Qiu Q, Ouyang YL, Yu JD, Guo SZ, Han J, Wang W. Metabolomic profiling reveals distinct patterns of tricarboxylic acid disorders in bloodstasis syndrome associated with coronary heart disease. 2016 ; 22(8) : 597-604.
2. Ramli NS, Ismail P, Rahmat A. Red pitaya juice supplementation ameliorates energy balance homeostasis by modulating obesity-related genes in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome rats. BMC complementary and alternative medicine 2016 ; 16(1) : 243
3. Lee SA, Kwon TW, Kim MH, Son HB, Ahn L, Jang MW, Choi DJ. A case of haseache and memory disorder after traumatic brain injury treated with modified *Seogajihwang-tang*. Korean J. Orient. Int. Med. 2013 ; 34(4) : 438-46.
4. Liu J, Pei T, Mu J, Zheng C, Chen X, Huang C, Fu Y, Liang Z, Wang Y. Systems Pharmacology Uncovers the Multiple Mechanisms of Xijiao Dihuang Decoction for the Treatment of Viral Hemorrhagic Fever. Evid. Based. Complement. Alternat. Med. 2016 ; 9025036.
5. Liu YM, Zhu LL, Li R, Zhang JL, Yao SS, Zhou XB, Zeng H, Wang XB. Xijiao Dihuang Decoction and *Rehmannia glutinosa* Libosch. protect mice against lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha-induced acute liver failure. Chin. J. Integr. Med. 2015 ; doi : 10.1007/s11655-015-2141-2.
6. Zhang JL, Zeng H, Wang XB. Discussion of Chinese syndrome typing in acute hepatic failure model.

- Zhongguo, Zhong. Xi, Yi, Jie, He, Za, Zhi, 2011 ; 31(5) : 659-62.
7. Qin F, Wang C, Jin G, Hua J. Effects of Xijiao Dihuang decoction on the expressions of bcl-2, caspase-3, TNF- α and IL-6 after acute intracerebral hemorrhage in rats. Zhongguo, Zhong. Yao, Za, Zhi, 2009 ; 34(12) : 1566-9.
 8. Kim SH, Park HS, Hong MJ, Yoo JY, Lee H, Lee JA, Hur J, Kwon DY, Kim MS. Tongqiaohuoxue Decoction Ameliorates Obesity-induced Inflammation and the Prothrombotic State by Regulating Adiponectin and Plasminogen Activator Inhibitor-1. J. Ethnopharmacol, 2016 ; 192(4) : 201-9.
 9. Wang GY, Wang N, Liao HN. Effects of Muscone on the Expression of P-gp, MMP-9 on Blood-Brain Barrier Model In Vitro, Cell, Mol, Neurobiol, 2015 ; 35(8) : 1105-15.
 10. Wang N, Deng Y, Wei W, Song L, Wang Y. Serum containing Tongqiaohuoxue decoction suppresses glutamate-induced PC12 cell injury. Neural, Regen, Res, 2012 ; 7(15) : 1125-31.
 11. Liao YP, Hu ZX. Nasopharyngeal carcinoma treated by radiation therapy combined with a tongqiaohuoxue decoction. Zhong. Xi, Yi, Jie, He, Za, Zhi, 1987 ; 7(4) : 214-15.
 12. Kang JS, Park SH, Song MK, Ahn YM, Ahn SY, Lee BC. The effect of *Hyulbuchuko-tangon* a case with deep vein thrombosis (DVT) and intracranial hemorrhage (ICH). Korea J. Orient. Int. Med, 2009 ; 30(2) : 438-49.
 13. Kim HH, Bang HJ, Kang YH, Park IS, Ahn SH, Kim JT, Lee HP. Suppression of lipid accumulation of *Hyuboochuketangin* the hepatic Tissue of hyperlipidemic mice by triton WR-1339. J. of Oriental Physiology, 1999 ; 14(2) : 215-24.
 14. Yang DS, Yang SJ, Cho SH, Yeo EJ, Park KM. Clinical study of kamitongkyung-tang's effects on 3 cases of complications of post-hysterectomy. J. Oriental Obstetrics & Gynecology, 2011 ; 24(4) : 205-12.
 15. Kim Y, Seo IB, Kim SJ. Effects of Hyulboochucke-tang on the Collagenase-Induced Intracerebral Hemorrhage in Rats. J. Korean Med. Rehabil, 2016 ; 26(1) : 1-11
 16. Liu J, Zhang J, Huang L, Zhu X, Chen W, Hu P. XuefuZhuyu Tang exerts antitumor effects by inhibiting glioma cell metastasis and invasion via regulating tumor microenvironment. Onco. Targets, Ther, 2016 ; 17 (9) : 3603-12.
 17. Zhang Y, Tang Y, Guo J, Ding A, Duan J. Dose-effect relationship of traditional Chinese medicine formula for promoting blood circulation to remove stasis on ADP-induced platelet aggregation and rabbit plasma thrombin time. Zhongguo, Zhong. Yao, Za, Zhi, 2008 ; 34(21) : 2821-26.
 18. Dong HY, Yang JG, Xiao ZQ, Feng WY, Deng X, Zhang LT, Wei YX. Pro-angiogenic effects of four Chinese medicines and three herbal prescription in chicken chorioallantoic membrane model. Zhong. Yao, Cai, 2013 ; 36(8) : 1297-300.
 19. Ding Z, Gao C, Ji R, Wo X. Effects of xuefuzhuyu decoction on collagen synthesis and proliferation of cardiac fibroblasts. Zhong. Yao, Cai, 2002 ; 25(7) : 481-3.
 20. Li Y, Chen K, Shi Z. Effect of xuefu zhuyu pill on blood stasis syndrome and risk factor of atherosclerosis. Zhongguo, Zhong. Xi, Yi, Jie, He, Za, Zhi, 1988 ; 18(2) : 71-3.
 21. You S, Park B, Lee MS. Accelerated RBC senescence as a novel pathologic mechanism of blood stasis syndrome in traditional East Asian medicine. Am. J. Transl. Res, 2015 ; 7(3) : 422-9.
 22. Li YM, Chen KJ, Zhang XW. Effect of xuefuzhuyu pill on patients with carotid atherosclerosis by colour Doppler ultrasonography. Zhongguo, Zhong. Xi, Yi, Jie, He, Za, Zhi, 1997 ; 17(3) : 152-4.
 23. Shin WJ, Park YM, Jeong DW, Hong JW, Sun JJ, Lee JW, Jung WS, Park SU, Moon SK, Park JM, Ko CN, Cho KH, Kim YS, Bae HS. Relationship between arteriosclerosis and oriental medical diagnosis in ischemic stroke patients. Korean J. Orient. Int. Med, 2006 ; 27(1) : 197-207.
 24. Li SM, Xu H, Chen KJ. The diagnostic criteria of blood-stasis syndrome: considerations for standardization of pattern identification. Chin. J. Integr. Med, 2014 ; 20(7) : 483-9.
 25. Fruhbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. Methods. Mol. Biol, 2008 ; 456 : 1-22.
 26. Isaia, G C, D'Amelio, P, Di Bella S, Tamone C. Is leptin the link between fat and bone mass? J. Endocrinol. Invest, 2005 ; 28(10 suppl) : 61-5.
 27. Jang JS, Kim DH, Shin HS, Jo CH, Lee JH, Kang BK, An JJ, Jo HK, Yoo HR, Seol IC, Kim YS. The study on relationship of dampness-phlegm tongue diagnosis to hyperlipodemia in stroke patients. J. Korea Institute of Oriental Medical Diagnostics 2009 ; 13(2) : 24-33.