

곽향과 금전초 추출물이 Palmitic acid로 유발된 비알코올성 지방간 세포 모델에 미치는 영향

이혜인, 김영광, 임현찬, 이다은, 김은지, 문영호
동신대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of Agastachis Herba Extract and Lysimachiae Herba Extract on the Experimental Cellular Model of NFLDs Induced by Palmitic Acid

Hye-in Lee, Young-kwang Kim, Hyeon-chan Lim, Da-eun Lee, Eun-ji Kim, Young-ho Moon
Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

ABSTRACT

Objectives: This study was performed to investigate the effects of two herbal medicines, Agastachis Herba and Lysimachiae Herba, on a cellular model of non-alcoholic fatty liver diseases (NFLDs).

Methods: HepG2 cells were treated with palmitic acid and with various concentrations of Agastachis Herba (AH) or Lysimachiae Herba (LH) extract in water. The lipotoxicity was assessed using EZ-cytox, and the lipoapoptosis was assessed using cell death detection ELISA. Intracellular lipids were measured by oil red O staining. The efficacy of AH and LH on sterol regulatory element-binding transcription factor-1c (SREBP-1c), fatty acid synthase (FAS), and acetyl-CoA carboxylase (ACC) in HepG2 cells was measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: Both AH and LH extracts increased lipoapoptosis and decreased lipotoxicity and levels of SREBP-1c, ACC, and FAS (SREBP-1c, ACC, and FAS are factors in lipid synthesis). In the oil red O staining experiment, both extracts also reduced intracellular lipid accumulation; in this instance, LH's efficacy was superior to that of AH.

Conclusions: According to the results, both AH and LH are likely to contribute to non-alcoholic fatty liver disease, as both interfere with lipid synthesis.

Key words: Agastachis Herba, Lysimachiae Herba, NAFLD

1. 서론

비알코올성 지방간 질환(Non-alcoholic fatty liver disease, 이하 NFLDs)은 비만, 당뇨, 고중성지방혈

증 등의 대사 질환에 의해 발생한 경우로, 음주, 바이러스, 약물, 자가면역질환, α 1-antitrypsin 부족, 윌슨병 등의 선형질환에 의해 발생한 경우를 배제한 질환이다¹.

비알코올성 지방간 질환은 전세계적으로는 30% 이상의 유병률을 보이는 질환으로 2013년 한국에서의 유병률은 16~33%였으며 빠르게 증가하는 추세이다²⁻⁴. 또한 비알코올성 지방간 질환에 염증이 동반되는 경우, 10~50%의 환자에서 간경변이 발생하며, 진행성 간섬유화, 간부전, 간세포암 등의

· 투고일: 2018.03.28, 심사일: 2018.06.24, 게재확정일: 2018.06.28
· 교신저자: 문영호 전라남도 목포시 상동 834번지
동신대학교 목포한방병원 한방내과
TEL: 061-280-7902 FAX: 061-280-7788
E-mail: doc4you@hanmail.net
· 이 논문은 2018년도 동신대학 대학원 한의학 석사학위 논문임.

질환으로 진행되는 경우가 있다는 사실이 밝혀진 후 비알코올성 지방간 질환 치료에 관한 관심이 높아지고 있다^{1,3,4}.

현재 비알코올성 지방간 질환을 치료하기 위해 urosodeoxycholic acid(UDCA) 등의 세포 보호제, vitamin E 등의 항산화제, thiazolidinedione, biguanide 등의 인슐린 감수성 제제와 항고지혈증제를 사용하고 있으나 승인된 공식 치료제는 아직 없다^{1,5,6}. 특히 예후가 좋지 않은 비알코올성 지방간염 치료에 초점을 맞추어 130여개의 임상시험이 진행되고 있으나, 그 중 5개가 3상 임상 시험이며 대부분 전 임상 혹은 초기 임상 시험의 단계이다⁶.

비알코올성 지방간 질환은 한의학적으로는 濕痰의 停滯를 그 원인으로 본다⁷. 최근 국내에서는 濕痰을 제거하는 효능이 있는 곤포, 적소두 등의 단일 약제와 KH청간탕 등의 복합 처방이 비알코올성 지방간 질환에 미치는 영향에 관한 논문이 보고되었다⁸⁻¹⁰.

藿香은 芳香化濕, 開胃止嘔의 효능이 있으며¹¹ 비대된 지방세포와 간의 지방 침착을 회복시키면서, 식욕억제 단백질인 leptin의 혈중 농도를 유지시키고 지방합성인자인 PPAR- γ 를 감소시키는 효능이 보고되었다¹². 또한 곽향의 간세포 보호효과¹³, 곽향 추출물의 염증성세포활성물질 억제효과¹⁴에 관한 연구가 보고되었다. 金錢草는 清熱利濕, 通淋의 효능이 있으며¹¹ 손상된 간대사활성기능 보호 효과가 있고, 금전초의 메탄올 추출물은 혈중 총 콜레스테롤과 중성지방을 감소시킨다고 보고되었다¹⁵. 또한 금전초 추출물의 혈당 강하 효과¹⁶, 금전초 추출물이 고지방식으로 유발한 비만 흰쥐에 미치는 영향¹⁷에 관한 연구도 보고되었다.

이에 저자는 palmitic acid를 이용해 유도한 비알코올성 지방간 세포 모델에 곽향과 금전초의 추출물을 처리하여 lipotoxicity, lipoapoptosis, 세포내 지방의 축적과 합성에 미치는 영향을 관찰해 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에서 사용된 약제는 곽향(藿香, 학명 : *Agastacherugosa*, 향약명 : *Agastachis Herba*)과 금전초(金錢草, 학명 : *Lysimachiachristinae*, 향약명 : *Lysimachiae Herba*)로 동신대학교 부속 순천향방병원에서 구입하여 사용하였다. 곽향과 금전초 각 100 g을 증류수 1,000 ml로 2시간 동안 가열하여 전탕한 다음 추출액을 3,000 rpm하에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻고 이를 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하고, 동결건조기에서 -84 °C 상태로 24시간 건조하였다. 수득율은 곽향 8.2 g(수득율 8.2%)과 금전초 9.2 g(수득율 9.2%)이다. 곽향 추출물은 AH로, 금전초 추출물은 LH로 표기하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

인간 간암 세포주(Human hepatocellular carcinoma cell line) HepG2 cell은 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였으며, 10% FBS(Gibco, USA), 1% Anti-biotic Anti-mycotic(Sigma, USA)을 포함한 DMEM media(Gibco, USA)를 사용하여, 37 °C, 5% CO₂ 유지되는 조건에서 배양하였다.

2) 지방증(Steatosis) 유발

지방증을 유발하기 위해 palmitic acid(sigma, USA, 이하 PA로 표기)를 isopropanol에 50 mM이 되도록 녹인 다음, 1%의 bovine serum albumin(BSA)를 함유한 DMEM 배지에 conjugation 시켜 사용하였다.

3) cell viability assay

Cell viability를 확인하기 위해 Ez-cytox(Daeil Lab, Korea)을 활용하였다. 먼저 HepG2 cell을 24 well에 5×10⁴ cells/well 만큼 나누어 seeding하여 48 시간 동안 배양 한 후 0.5 mM palmitic acid로 지

방증을 유도시킨 후 시료를 농도별로 처리한 후 Ez-cytox를 처리한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) RT-PCR

(1) Total RNA 분리

Total RNA 분리를 위해 배양된 cell에서 배지를 제거한 후 TRIZOL reagent(Gibco-BRL, USA)를 처리하여 cell을 모으고, chloroform(Sigma, USA)을 가하여 흔들어서 잘 혼합한 후 실온에서 5분간 RNA를 침전시키고 난 다음 4 °C, 13,200 rpm에서 5분간 원심분리한다.

원심분리로 얻어진 상층액과 500 µl의 isopropanol (Sigma, USA)을 첨가하여 실온상태에서 5분간 방치한 후 RNA pellet을 얻기 위하여 4 °C, 13,200 rpm에서 5분간 원심분리한다. 그리고 원심분리로 생긴 pellet에 냉장 보관된 70% ethanol과 함께 DEPC-treated water(Biosolution, Korea)를 넣고 4 °C, 13,200 rpm에서 5분간 원심분리 후 pellet만 남기고 모두 제거한다. 남은 ethanol은 실온에서 10분간 방치시켜 건조시킨 다음 DEPC-treated water에 녹여 Biophotometer (Eppendorf, Germany)에서 260 nm에서 OD260 값을 읽어 RNA의 순도 농도를 정량하고 total RNA는 사용 시까지 -20 °C에서 보관하였다.

(2) RT-PCR에 의한 측정

분리된 total RNA 1 µg를 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)를 이용하여 50 µl cDNA를 합성하여 PCR 증폭을 위한 template로 사용하였다.

Polymerase chain reaction은 cDNA, sense primer, antisense primer, DEPC-treated water를 PCR premix (Bioneer, Korea)에 넣었고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)에서 cDNA를 증폭하였다.

실험에 사용된 primer 종류와 sequences는 Table 1과 같다.

이렇게 증폭된 RT-PCR 산물은 1.5% agarose gel 을 통해 전기영동 후 Gel Imaging system(Davinch-K, Korea)에서 PCR product를 확인하였다.

Table 1. Primer Sequence of each Gene Detected in RT-PCR

Genes	Primer sequences
SREBP-1c	5'-CCATGCTGGAAGTATGATGGAG-3'
	5'-CTGAACTGTGTGACCCAGCC-3'
FAS	5'-TGGTCACGGACGATGACCGTCG-3'
	5'-GCGGCAGTACCCATTCCCCGC-3'
ACC	5'-CGACATGCTCGGCCTCATAG-3'
	5'-GCCAGAAGCCCCAAGAAAC-3'
GAPDH	5'-TCCTCCTGTTTCGACAGTCAGCCG-3'
	5'-ACAGTTTCCCGAGGGCCAT-3'

5) Lipotoxicity 측정

시료가 HepG2 cell의 세포자멸에 미치는 영향을 측정하기 위해 cell death detection ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하였다. HepG2 세포를 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 부착시킨 후 PA 및 시료를 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후 0.2 ml의 용해완충액(lysis buffer)을 첨가하여 30분간 방치하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 제조사의 지시에 따라 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6) Oil Red O staining

HepG2 cell의 중성지방 생성량을 확인하기 위해 intracytoplasmic lipids를 측정하는데 적합한 Oil Red O를 활용하여 염색하였다. 6-well plates에 3×10⁵ cells/well에 분주하여 24시간 동안 부착시킨 후 PA 및 한약재를 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간이 지난 후 PBS로 2회 세척하고 10% formalin으로 10분간 고정하였으며, 60% isopropanol과 증류수로 세척하는 과정까지 거친 뒤 plate를 완전히 말려 isopropanol에 용해시킨 Oil Red O 염색약을 처리하였다. 20분 동안 incubation 한 다음 증류수를 이용하여 여러 번 세척하였고, 염색 정도 확인을 위해 200 배율 위상차 현미경으로 관찰하였다.

3. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 IBM SPSS Statistics 22 program을 사용하여 시행하였다. 실험군과 대조군 간의 통계적 유의성 검증은 one-way ANOVA를 시행하였으며 통계적으로 유의한 경우 사후검정은 Turkey 방법을 시행하였고 p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

III. 결 과

1. AH 및 LH가 Cell viability에 미치는 영향

AH와 LH가 HepG2 cell에 대해 세포독성을 나타내는 농도 범위를 측정하기 위하여 넓은 범위에서 다양한 농도로 시료를 처리한 후 Ez-cytox를 통해 세포 생존율을 측정하였으며, 세포생존율은 아무런 농도를 투여하지 않았을 때인 0 mg/ml을 기저치 100%로 환산하여 표시하였다. AH는 0.7 mg/ml에서부터 유의성 있게 세포 생존율이 떨어졌고 농도 의존적으로 세포생존율이 감소하였으며 LH는 1.0 mg/ml에서 세포생존율이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1).

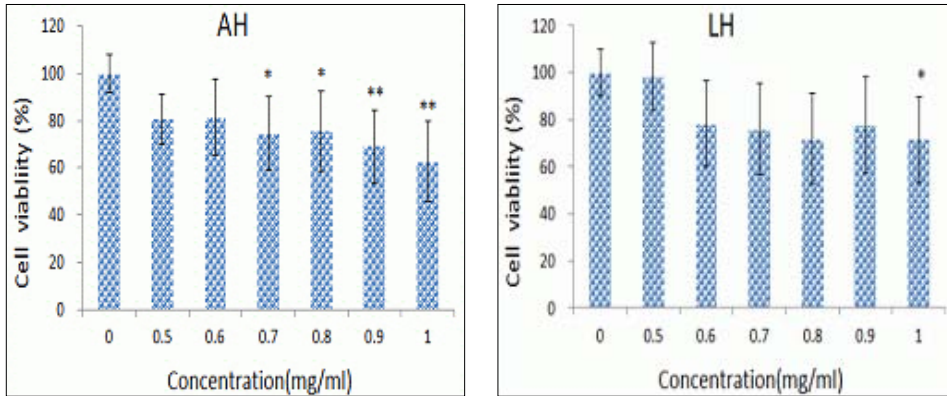


Fig. 1. The effect of AH and LH on cell viability of HepG2.

Cell viability of HepG2 were measured using EZ-cytox. Values are represented as mean±SD (n=8).

* : statistically significance compared with 0 mg group (* : P<0.05)

** : statistically significance compared with 0 mg group (** : P<0.01)

2. AH 및 LH가 lipotoxicity에 미치는 영향

AH와 LH가 지방산에 의해 유발된 세포 손상에 미치는 영향을 측정하기 위하여 HepG2 cell에 0.5 mM의 palmitic acid로 지방증을 유발한 후 AH와 LH를 각각 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml를 처리하여 세포 생존율을 측정하였다. 측정 결과 AH는 대조군에 비해 0.125 mg/ml 농도와 0.25 mg/ml 농도에서 모

두 유의성 있게 세포 손상이 완화되는 결과가 관찰되었다. LH는 대조군에 비해 0.125 mg/ml 농도와 0.25 mg/ml 농도에서 모두 유의성 있게 세포 손상이 완화되었으며, 오히려 0.25 mg/ml 보다 0.125 mg/ml 농도에서 유의성 있게 세포 손상이 완화되었다(Fig. 2).

곽향과 금전초 추출물이 Palmitic acid로 유발된 비알코올성 지방간 세포 모델에 미치는 영향

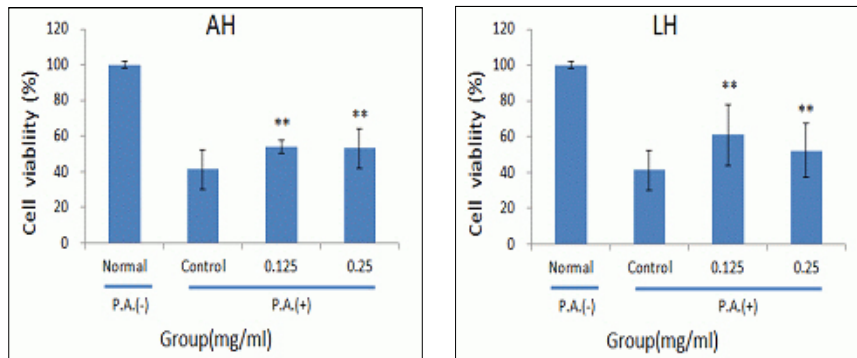


Fig. 2. The effect of AH and LH on palmitic acid induced lipotoxicity in HepG2 cells.

P.A. (-) : palmitic acid untreated group, P.A. (+) : palmitic acid 50 0.5 mM treated group, Normal : palmitic acid and herb extract both untreated group, Control : palmitic acid treated and herb extract untreated group, 0.125 : palmitic acid and herb extract 0.125 mg/ml both treated group, 0.25 : palmitic acid and herb extract 0.25 mg/ml both treated group. Values are represented as mean±SD (n=8).

** : statistically significance compared with control group (** : P<0.01)

3. AH 및 LH가 lipoapoptosis에 미치는 영향

AH와 LH가 지방 세포 자멸에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 HepG2 cell에 0.5 mM의 palmitic acid로 지방증을 유발한 후 cell death detection ELISA kit를 이용하여 세포자멸을 관찰하였다. 측정 결과 AH는 대조군에 비해 0.125 mg/ml농도와

0.25 mg/ml 농도에서 모두 유의성 있게 세포자멸이 증가하였음을 관찰할 수 있었다. LH는 대조군에 비해 0.125 mg/ml농도와 0.25 mg/ml 농도에서 모두 유의성 있게 세포자멸이 증가하였으며 농도 의존적으로 세포 자멸이 증가하였다(Fig. 3).

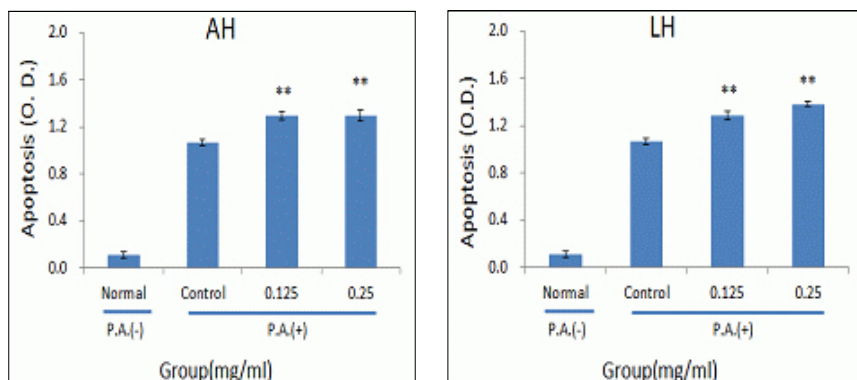


Fig. 3. The effect of AH and LH on palmitic acid induced lipoapoptosis in HepG2 cells.

P.A. (-) : palmitic acid untreated group, P.A. (+) : palmitic acid 50 0.5 mM treated group, Normal : palmitic acid and herb extract both untreated group, Control : palmitic acid treated and herb extract untreated group, 0.125 : palmitic acid and herb extract 0.125 mg/ml both treated group, 0.25 : palmitic acid and herb extract 0.25 mg/ml both treated group. Values are represented as mean±SD (n=8).

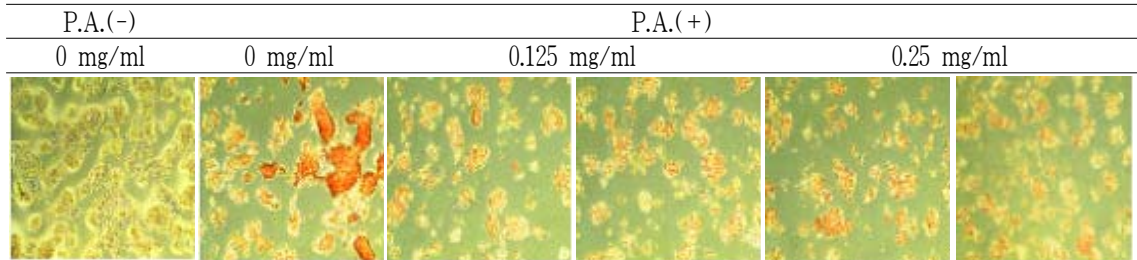
** : statistically significance compared with control group (** : P<0.01)

4. AH 및 LH가 세포 지방 축적에 미치는 영향

AH와 LH가 세포 내 지방축적 감소에 미치는 효과를 확인하기 위하여 HepG2 cell에 0.5 mM의 palmitic acid로 지방증을 유발한 후 0.125 mg/ml와 0.25 mg/ml 농도의 AH와 LH를 각각 처리하여 관

찰한 결과, AH와 LH의 모든 실험군이대조군에 비해 지방의 축적이 감소한 것을 확인하였다. 특히 LH 0.125 mg/ml와 0.25 mg/ml를 투여한 군에서 지방의 축적이 확연하게 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 4).

A) AH



B) LH

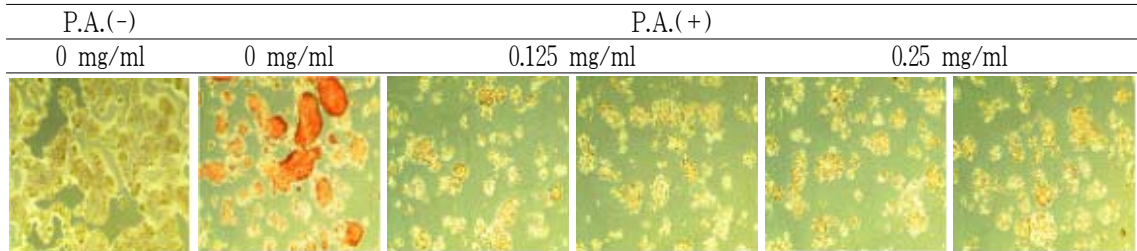


Fig. 4. The effect of AH and LH on lipid accumulation of HepG2 cells by oil red O stain.

5. AH 및 LH가 SREBP-1c 발현에 미치는 영향

AH와 LH가 lipogenesis에 관여하는 주요인자인 SREBP-1c에 미치는 영향을 측정하기 위해 RT-PCR을 이용하여 SREBP-1c mRNA 발현을 측정하였

다. 측정 결과 대조군의 mRNA level에 비해 AH 0.125 mg/ml, AH 0.25 mg/ml, LH 0.125 mg/ml, LH 0.25 mg/ml 농도에서 모두 유의성 있게 mRNA level이 감소하였다(Fig. 5).

곽향과 금전초 추출물이 Palmitic acid로 유발된 비알코올성 지방간 세포 모델에 미치는 영향

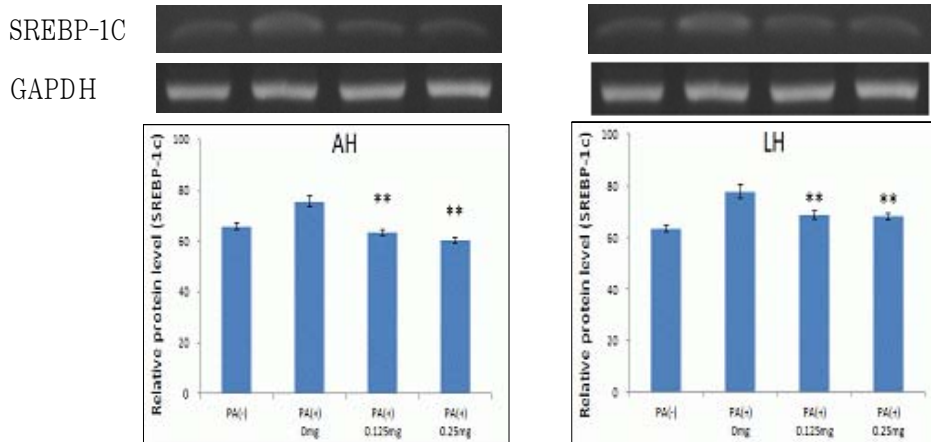


Fig. 5. The effect of AH and LH on SREBP-1c in HepG2 cells.

The SREBP-1c mRNA level was measured by RT-PCR. P.A. (-) : palmitic acid untreated group. P.A. (+) : palmitic acid 50 0.5 mM treated group. Values are represented as mean±SD (n=3).
 ** : statistically significance compared with PA (+) 0 mg group (** : P<0.01).

6. AH 및 LH가 ACC에 미치는 영향

AH와 LH가 lipogenesis에 관여하는 주요인자인 ACC에 미치는 영향을 측정하기 위해 RT-PCR을 이용하여 ACC mRNA 발현을 측정하였다. 측정 결과 대조군의 mRNA level에 비해 AH 0.125 mg/ml,

AH 0.25 mg/ml, LH 0.125 mg/ml, LH 0.25 mg/ml 농도에서 모두 유의성 있게 mRNA level이 감소하였으며, AH 투여군에서는 농도 의존적인 감소가 나타났다(Fig. 6).

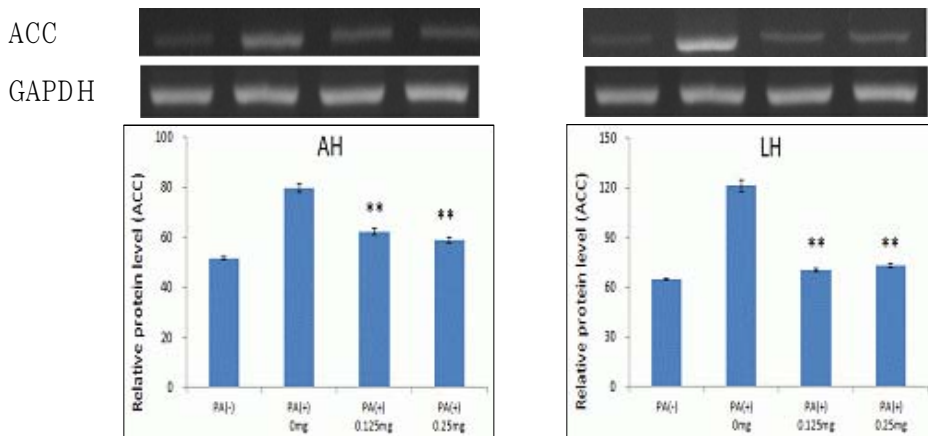


Fig. 6. The effect of AH and LH on ACC in HepG2 cells.

The ACC mRNA level was measured by RT-PCR. P.A. (-) : palmitic acid untreated group. P.A. (+) : palmitic acid 50 0.5 mM treated group. Values are represented as mean±SD (n=3).
 ** : statistically significance compared with PA (+) 0 mg group (** : P<0.01).

7. AH 및 LH가 FAS에 미치는 영향

AH와 LH가 lipogenesis에 관여하는 주요인자인 FAS에 미치는 영향을 측정하기 위해 RT-PCR을 이용하여 FAS mRNA 발현을 측정하였다. 측정 결과 대조군의 mRNA level에 비해 AH 0.125 mg/ml,

AH 0.25 mg/ml, LH 0.125 mg/ml, LH 0.25 mg/ml 농도에서 모두 유의성 있게 mRNA level이 감소하였으며, LH 투여군에서는 농도 의존적인 감소가 나타났다(Fig. 7).

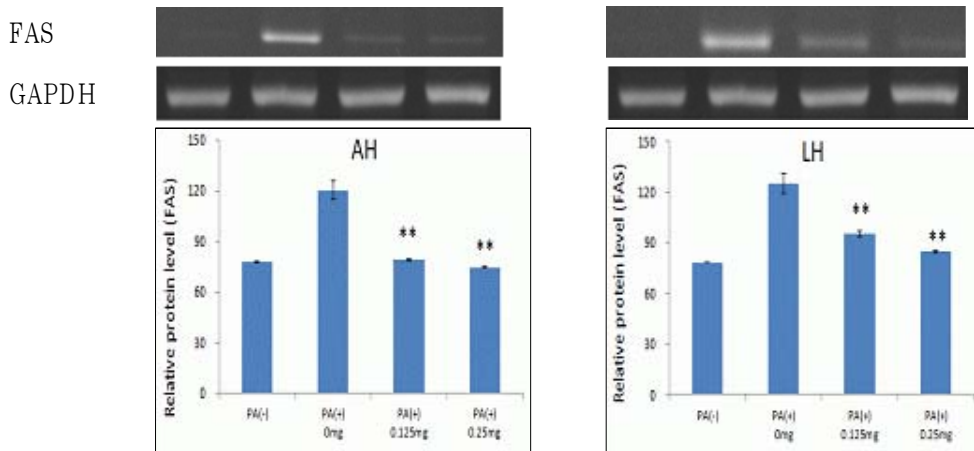


Fig. 7. The effect of AH and LH on FAS in HepG2 cells.

The FAS mRNA level was measured by RT-PCR. P.A. (-) : palmitic acid untreated group, P.A. (+) : palmitic acid 50 0.5 mM treated group. Values are represented as mean±SD (n=3).
** : statistically significance compared with PA (+) 0 mg group (** : P<0.01).

IV. 고 찰

비알코올성 지방간 질환은 피로 및 권태감, 소화기 증상, 우상복부의 불쾌감 혹은 동통 등의 비특이적 증상이 나타나며, 무증상인 경우도 많다¹⁸. 혈액검사 상으로는 AST, ALT, ALP의 경미한 증가가 나타나나 80%의 환자에서는 정상 소견이 나와²⁵ 질환 발생 후 발견하기까지 시간이 소요되고 다른 질환을 검사하다 우연히 발견되는 경우도 많다.

비알코올성 지방간 질환은 조직학적 소견에 따라 단순 지방성 변화, 소엽성 염증을 동반한 지방성 변화, 풍선모양 간세포(ballooned hepatocyte)가 있는 경우, 말로리체(mallory's body) 혹은 섬유화가 있는 경우의 4가지로 분류된다. 소엽성 염증, 풍

선모양 간세포(ballooned hepatocyte)나 말로리체(mallory's body), 섬유화가 있는 경우는 지방간에 염증이 동반되는 경우로, 간경변, 간암 등으로 발전하기도 한다¹. 발견이 쉽지 않다는 점과 더불어 예후가 좋지 않은 질환으로 발전할 수 있다는 점으로 인해 비알코올성 지방간 질환이 점차 주목받는 추세이다.

현재까지 비알코올성 지방간 질환의 공인된 치료제가 없어 식이요법과 운동을 통한 체중 감량이 가장 효과적이고 중요한 치료법으로 알려져 있으나, 체중감량을 시작한 환자 중 50% 이하의 환자만이 목표 체중 도달에 성공하였고, 치료에 성공한 환자 중에서도 일정 시간이 지나면 다시 본래 체중으로 돌아가는 경우가 발생하는 등 치료의 지속

성이 떨어져 공인된 치료제 개발이 절실히 요구되는 상황이다¹⁹.

최근 한의학계에서도 비알코올성 지방간 질환에 주목하여 비알코올성 지방간 세포 모델에서 곤포의 효능과 기전 연구⁸, 적소두가 비알코올성 지방간 질환 세포 모델에 미치는 효과⁹, Palmitate로 유발된 비알코올성 지방간 모델에 대한 KH청간탕의 효과 연구¹⁰ 등 다양한 약재와 처방을 이용한 연구가 진행되고 있다.

藿香은 芳香化濕藥으로 性は 微溫하고 味는 辛하며 芳香化濕, 和中止嘔, 發表解暑의 효능이 있다¹¹. 최근 연구에서는 항산화 효능이 있어 소화기 질환과 당뇨, 간염에 효과가 있으며 항염증 효과도 가지고 있다고 보고되었다²⁰⁻²². 또한 지방합성 인자 조절 및 식이 섭취 감소를 통한 곽향의 항비만 효능¹², 비만아 9례에 대한 곽향정기산가미방의 치료 효과에 대한 임상적 고찰²³ 등의 논문이 보고되었다. 金錢草는 性は 微寒하고 味는 甘鹹하여 利尿痛淋, 利膽排石, 利濕退黃, 清熱解毒의 효능이 있다¹¹. 최근 연구에서는 金錢草가 항균작용과 담즙분비 촉진 효능이 있으며 금전초 메탄올 추출물이 Total cholesterol, Triglyceride를 감소시켜 고지혈증에 효과적이며 진통·소염 효과가 있다고 보고되었다^{15,24}.

비알코올성 지방간 질환은 지방의 과다 축적이 원인이 된 것으로 한의학적으로는 濕痰이 그 원인이다⁷. 따라서 비알코올성 지방간 질환 치료에 체내의 濕痰을 제거하는 효능이 있는 藿香과 金錢草를 활용할 수 있을 것으로 생각하고 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서는 HepG2 cell에 palmitic acid를 처리하여 비알코올성 지방간 세포 모델을 배양하여 사용하였다. 지방간 세포에 미치는 곽향과 금전초의 효능을 알아보기 위해 세포 모델에 곽향 추출물(AH)과 금전초 추출물(LH)을 농도별로 처리한 후 각 추출물이 lipotoxicity, lipoapoptosis, 세포 내의 지방 축적, 지방 합성에 미치는 영향을 관찰하였다.

HepG2 cell에 AH와 LH를 다양한 농도로 처리한 후, Ez-cytox로 세포 생존율을 측정하였을 때 AH가 0.5 mg/ml에서 유의성 있는 세포 독성을 보여 0.5 mg/ml 이하의 농도로 실험을 진행하였다.

배양된 비알코올성 지방간 세포 모델에 농도 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml의 AH와 LH를 처리한 후 Ez-cytox로 lipotoxicity를 측정하였을 때 대조군 41.09, AH 0.125 mg/ml 투여군 53.97, AH 0.25 mg/ml 투여군 52.94, LH 0.125 mg/ml 투여군 60.98, LH 0.25 mg/ml 투여군 51.98로 두 추출물이 모든 농도에서 유의하게 lipotoxicity를 완화시켰다.

Cell death detection ELISA로 lipoapoptosis를 측정하였을 때 대조군 1.064, AH 0.125 mg/ml 투여군 1.294, AH 0.25 mg/ml 투여군 1.294, LH 0.125 mg/ml 투여군 1.282, LH 0.25 mg/ml 투여군 1.382로 두 추출물이 모든 농도에서 유의하게 lipoapoptosis를 증가시켰다.

Oil red O staining을 통해 AH와 LH가 처리된 경우 지방 축적이 유의하게 감소하는 것을 확인하였으며, LH를 투여했을 때 지방 축적이 좀 더 확연하게 감소하였기에 LH가 AH에 비해 지방 축적을 더 감소시킬 수 있다는 가능성을 확인하였다.

SREBP-1c는 주요 전사 활성 인자(transcription factor)로 간에서 ACC, FAS 등의 지질 합성 효소를 발현시킨다²⁵. 포도당은 산화과정을 거쳐 최종적으로 acetyl-CoA로 분해되며, acetyl-CoA는 ACC에 의해 malonyl-CoA로 변화한다. 이 때 FAS에 의해 acetyl-CoA와 malonyl-CoA가 축합반응을 일으켜 지방 합성이 이루어진다¹⁶. 따라서 SREBP-1c가 증가하면 ACC, FAS 등의 효소가 활성화되어 간세포의 지방 합성이 증가한다. 지방간 세포 모델에 농도 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml의 AH와 LH를 처리한 후 RT-PCR을 시행하여 SREBP-1c, ACC, FAS를 측정하였다.

SREBP-1c를 측정하였을 때 AH는 대조군 75.7, 0.125 mg/ml 투여군 63.5, 0.25 mg/ml 투여군 60.4이었으며, LH는 대조군 77.7, 0.125 mg/ml 투여군

68.7, 0.25 mg/ml 투여군 68.0으로 두 추출물은 모든 농도에서 SREBP-1c를 유의하게 감소시켰다.

ACC를 측정하였을 때 AH는 대조군 79.6, 0.125 mg/ml 투여군 62.3, 0.25 mg/ml 투여군 58.9이었으며, LH는 대조군 121.3, 0.125 mg/ml 투여군 70.5, 0.25 mg/ml 투여군 73.1으로 두 추출물은 모든 농도에서 ACC를 유의하게 감소시켰다.

FAS를 측정하였을 때 AH는 대조군 120.5, 0.125 mg/ml 투여군 79.2, 0.25 mg/ml 투여군 74.9이었으며, LH는 대조군 125.0, 0.125 mg/ml 투여군 95.3, 0.25 mg/ml 투여군 84.6으로 두 추출물은 모든 농도에서 FAS를 유의하게 감소시켰다.

종합하면 AH와 LH는 SREBP-1c를 감소시킴으로써 ACC, FAS의 활성화를 억제하여 lipotoxicity, lipoapoptosis 등의 효과를 나타낸 것으로 추론할 수 있다. 본 연구는 세포 단위 실험이므로 보다 정확한 정보를 얻기 위해 향후 지속적인 동물 실험 및 임상 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

곽향 추출물(AH)과 금전초 추출물(LH)이 비알코올성 지방간 질환에 미치는 영향을 관찰하기 위해 palmitic acid로 지방증(steatosis)을 유도한 HepG2 cell에 다양한 농도의 AH와 LH를 처치하여 lipotoxicity, lipoapoptosis, 세포 내의 지방 축적, 지방 합성을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. AH와 LH는 palmitic acid에 의해 발생한 lipotoxicity를 완화시켰다.
2. AH와 LH는 palmitic acid에 의해 발생한 lipoapoptosis를 증가시켰다.
3. AH와 LH는 세포 내 지방 축적을 유의하게 감소시켰다.
4. AH와 LH는 지질 합성의 주요 인자인 SREBP-1c와 ACC, FAS를 유의하게 억제시켰다.

참고문헌

1. Department of Internal Medicine, Medical school of Seoul University. 2005 recent Advances in Internal Medicine. Seoul: Korean Medical book Publishing; 2005, p. 138-49.
2. Foster C, Mistry NF, Peddi PF, Sharma S. The Washington Manual of Medical Therapeutics. 33rd edition. Seoul: Shinheung Medscience; 2012, p. 711-3.
3. Rhee EJ. Clinical Characteristics of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Based on Analyses from the Kangbuk Samsung Health Study. *J Korean Diabetes* 2017;18(2):82-7.
4. The Korean Association for the Study of the Liver. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Guidelines. 1st edition. Seoul: Jin Publishing; 2013, p. 1.
5. Jo JH, Ju JH, Jang JW. Road Map Clinical Internal Medicine. 1st edition. Seoul: Panmun Education; 2012, p. 80.
6. Kim W. Treatment Options in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Korean J Gastroenterol* 2017;69(6):353-8.
7. Department of Liver Internal Medicine, College of Korean Medicine. Liver Internal Medicine. 5th edition. Seoul: Nado Publishing; 2013, p. 102-15, 321-28.
8. 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. *J Int Korean Med* 2014; 35(2):175-83.
9. Jang YS, Seo JY, Kwun MJ, Kwon JN, Lee I, Hong JW, et al. Effect of Phaseolus angularis Seed on Experimental Cellular Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Korean J Oriental Physiology*

- & *Pathology* 2013;27(6):802-8.
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):109-20.
 11. Kim IR, Kim HC, Park SJ, Park YG, Park JH, Seo BI, et al. Herbal medicine. 2nd edition. Seoul: Younglim Publishing; 2010, p. 335-6, 370-1.
 12. Kim YM, Kim MH, Yang WM. Effects of *Agastache rugosa* on Obesity Via Inhibition of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma and Reduction of Food Intake. *J Korean Med Obes Res* 2015;15(2):104-10.
 13. Jang MH, Byun SH, Seo HL. Hepatoprotective effect of *Teucrium veronicoides*. *J East-West Medicines* 2015;40(1):1-12.
 14. Bae GS, Park HJ, Kim DY, Seo SW, Park KB, Kim BJ, et al. Inhibitory Effect of Extract of *Teucrium veronicoides* on the Production of Inflammatory Cytokines. *J Korea Herbology* 2008;23(3):119-25.
 15. Kim MS, Kim KO, Kim KS, Park SY, Yang SJ, Wei TS, et al. Effects of *Lysimachiae* Herbal extracts on Hyperlipidemic mice. *J Korean Herbal Formula Study* 2015;23(1):91-9.
 16. Kim OK. Antidiabetic Effect of *Glechoma hederacea* LINNAEUS in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Korea J Pharmacogn* 2004; 35(4):300-8.
 17. Lee HG, Byun JS, Buyn SH, Kim SC. The Effects of *Glechomalongituba* on Rats Fed High Diet. *J Korean Oriental Medical Prescription* 2002;10(1):61-72.
 18. Choi WC. Nonalcoholic fatty liver. *Inje Medical Journal* 2002;23(2):217-24.
 19. Park SH. Pharmacologic Therapy for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Korean J Med* 2014;86(4):425-9.
 20. Salah KB, Mahjoub MA, Chaumont JP, Michel L, Millet-Clerc J, Chraeif I, et al. Chemical composition and in vitro antifungal and antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of *teucriumsavagei* Le Houerou. *Natl Prod Res* 2006;20(12):1089-97.
 21. Esmaeili MA, Yazdanparast R. Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *J Ethnopharmacol* 2004;95(1):27-30.
 22. Suleiman MS, Abdul-Ghani AS, Al-khalil S, Amin R. Effect of *Teucrium polium* boiled leaf extract on intestinal motility and blood pressure. *J Ethnopharmacol* 1988;22(1):111-6.
 23. Shin DG, Kim DK, Lee JY. A Clinical Study on the Effects of Gwakhyangjunggi-san gamibag on 9 Obese Children. *J Pediatrics of Korean Medicine* 2001;15(1):183-94.
 24. Choi JW, Park JC, Lee CK. Biologic Activities of *Lysimachiae Herba* II-Analgesic and antiinflammatory effects of ethyl acetate fraction and a phenyl propanoid component. *Natural Product Sciences* 1997;3(2):135-40.
 25. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene(SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2000;14(22):2819-30.