

Original Article

고지방식이를 급여한 마우스의 간과 HepG2 세포에서 TJGB의 효과에 대한 연구

김희영^{1,#}, 박예진^{2,3}, 안효진^{1,3*}

¹경희대학교 약학대학 천연물융합신약개발학과

²상지대학교 한의과대학 한방재활의학과

³경희대학교 약학대학 한약학과

Effect of TJGB on the liver of high-fat diet-fed mice and the viability of HepG2 cells

Hee-Young Kim^{1,#}, Yea-Jin Park^{2,3}, and Hyo-Jin An^{1,3*}

¹Department of Integrated Drug Development and Natural Products, Graduate School, Kyung Hee University

²Department of Rehabilitative Medicine of Korean Medicine and Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Sangji University

³Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University

Objectives: This study was performed to investigate the effect of TJGB on the liver of high-fat diet (HFD)-fed mice and the cell viability of HepG2 cells.

Methods: After a week adaptation, 8-week-old C57BL/6N mice were fed with a 45% HFD or normal diet for 3 weeks. For the next 9 weeks, the mice were divided into 6 groups: normal diet group; HFD group; HFD plus orlistat group; HFD plus Ephedra sinica Stapf (ES) group; HFD plus low dose of TJGB group; HFD plus high dose of TJGB group. To estimate the effect of TJGB in the liver of HFD-fed mice, the protein expressions of phospho-acetyl-CoA carboxylase (p-ACC) and liver X Receptor (LXR) were determined by Western blot assay. The cell viability of ES and TJG was also evaluated in HepG2 cells.

Results: The administration of TJGB had little effect on the protein expressions of p-ACC and LXR in the liver of HFD-fed mice. And the cytotoxicity was showed above 7.8 μ g/mL in HepG2 cells.

Conclusion: Further research is needed to evaluate the mechanism of TJGB on hepatic steatosis and cytotoxicity in HepG2 cells.

Keywords : High-fat diet, HepG2 cells, Obesity, Liver, TJGB

* Corresponding author: Hyo-Jin An, Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea

· Tel : +82-2-961-2237 · E-mail : hjan@khu.ac.kr

First author: Hee-Young Kim, Department of Integrated Drug Development and Natural Products, Graduate School, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea

· Tel : +82-2-961-0482 · E-mail : heeyoung31@khu.ac.kr

· Received : 07 June 2023 · Revised : 17 Jun 2023 · Accepted : 29 Jun 2023

서 론

비만은 인체에 과도한 지방이 축적되는 것을 특징으로 하는 질병이다. 비만의 원인으로 는 유전이나 환경, 생활 습관, 사회적 요인 등을 꼽을 수 있으며 기본적으로는 칼로리 섭취량이 소비량을 초과하여 에너지가 불균형을 이룰 때 발생한다¹⁾.

비만 환자의 경우 지방 조직의 크기가 증가하면 유리 지방산이 혈류로 더 많이 방출되고, 이러한 지방산은 간세포 내 지질 축적으로 이어질 수 있다. 간의 과도한 지방 축적은 염증 반응을 유발하고 비알코올성 지방간염으로 발전될 가능성이 높아진다²⁾. 이러한 염증 반응은 인슐린 저항성을 증가시키며 그에 따라 췌장은 더 많은 인슐린을 생산하게 된다. 높은 인슐린 수치는 간의 지방 축적을 촉진하고 비알코올성 지방간 질환이 심화되는 악순환으로 이어지게 된다³⁾.

태음조위탕(太陰調胃湯)은 이제마의 동의수세보원(東醫壽世保元)에 기록되어 있는 처방으로 사상의학에 근거해 태음인의 표한증(表寒證)을 치료하는데 사용된다. 의이인(薏苡仁), 건율(乾栗) 각 세 돈, 나복자(蘿蔔子) 두 돈, 오미자(五味子), 맥문동(麥門冬), 석창포(石菖蒲), 길경(桔梗), 마황(麻黃) 각 한 돈으로 구성되며 위완수한표한병(胃腕受寒表寒病)을 치료한다. 태음조위탕은 원전에서 활용되는 주치(主治)보다 폭넓게 대사증후군⁴⁾ 및 산화적 손상⁵⁾ 등에 연구가 되고 있으며, 혈중 Leptin 및 Resistin의 농도를 억제하고, Ghrelin의 농도를 증가시키는 기전을 통한 항비만 효과는 연구된 바 있다⁶⁾. 본 연구에서는 비만 환자의 간 지방증에 효과적인 처방을 개발하고 그 효과를 확인하기 위해 태음조위탕 가감방을 사용하였다.

본 연구에서는 TJGB를 이용하여 고지방식이로 유도한 비만 마우스 모델의 간에서의 효과를 확인하고자 하였다. 이를 통해 TJGB가

비만 환자의 간에 미치는 영향을 분석하고 그 기전을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. TJGB의 조제

TJGB 구성 약재는 나눔제약 (서울, 대한민국)으로부터 입수하였으며 99° C 열수에서 3시간 추출하였다. 추출물은 회전 증발기를 이용하여 농축 후 동결건조 되었다. 분말은 물에 용해하여 *in vivo* 또는 *in vitro* 분석을 수행하였다.

2. 시약

Orlistat는 Tokyo Chemical Inc.(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 또한, 45% HFD (D-12451)는 Research Diets (New Brunswick, NJ, USA)에서 구입하였다. Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase 항체 (#3661)는 Cell signaling technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, LXR α/β (sc-13068) 및 β -actin (sc-47778) 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체는 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA)에서 구입하였다.

3. 실험 동물

8주령 C57BL/6N 마우스 (20 ± 2 g)는 대한 바이오링크 (대전, 대한민국)를 통해 입수하였다. 42마리의 실험 동물들은 온도 22 ± 2 ° C, 습도 55 ± 9%의 환경에서 사육되었으며, 1주일 간의 적응 기간을 거친 후 실험을 시작하였다. 정상 식이군 (CON)을 제외한 모든 동물에 45% 고지방식이를 3주간 급여하여 비만을 유도하였다. 4주 차부터 실험 동물을 무작위로 5개 군(군당 n=6-8, 케이지당 3-4마리)으로 분리하였으며 실험군의 구성은 고지방식이군, 고지방식이+Orlistat (20 mg/kg) 경구투여

군, 고지방식이+마황 (225 mg/kg) 경구투여군, 고지방식이+TJGB 경구투여군 (125 또는 250 mg/kg)로 설정하여 9주동안 매일 약물을 투여하였다. 음수와 식이는 자유롭게 급여하였으며 체중과 음식 섭취량은 매주 기록하였다. 12주간의 실험 기간이 끝난 후 모든 동물은 12시간 동안 금식시켜 쥘레틸 50 (20 mg/kg)을 복강투여로 마취하고 경추 탈구로 안락사하였다. 실험 동물로부터 간을 적출하여 -80° C에서 보관하였다. 동물 실험은 2019년 상지대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다 (Reg. no. 2019-9)

4. 웨스턴 블롯 분석

웨스턴 블롯 분석은 이전에 연구된 방법(예를 따라 시행하였다⁷). 실험 동물로부터 분리된 간 조직은 PRO-PREP® 용액(Intron Biotechnology, 경기도, 대한민국)을 이용하여 단백질을 추출하였다. Loading하고자 하는 단백질 sample을 SDS sample buffer와 섞어준 후, 99° C에서 4분간 heating하였다. SDS-PAGE gel을 이용하여 정량화된 간 단백질 (20–30 μ g)을 로딩하여 크기에 따라 분리하였다. Polyvinylidene fluoride membrane에 2시간 동안 transfer한 뒤, 1차 항체 (p-ACC (1:1000), liver-X-receptor (LXR) α/β (1:1000), β -actin (1:2500))와 함께 12~18 시간 동안 2–8° C에서 반응시켰다. 2차 항체는 실온에서 2시간 동안 처리되었다. 단백질 밴드는 Enhanced chemiluminescence (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA)을 처리하여 형광 발현을 확인하였다.

5. HepG2 세포 배양

인간 간암 세포주 HepG2 (No. 88065)는 한국세포주은행(KCLB, 서울, 대한민국)를 통해 입수하였다. 세포는 37° C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS를 포함하는 MEM 배지를 이용하여 배양하였다.

6. MTT 분석

HepG2 세포를 1 x 10⁴ 농도로 96 well plate에 seeding하였다. 인큐베이터에 배양하여 플레이트에 부착된 것을 확인 한 후, 24시간 동안 마황 (0–500 μ g/ml) 또는 TJGB (0–500 μ g/ml)을 처리하였다. 그 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 용액 (5 mg/mL)을 4시간 동안 처리하였다. 상층액은 제거하고 보라색의 formazan 생성물을 DMSO에 용해시켜 540nm에서의 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정은 Epoch microplate spectrometer (Biotek, Winooski, VT, USA)을 이용하였다.

7. 통계 분석

실험 데이터는 3회 실험의 평균 \pm 표준 편차로 나타내었다. 통계적으로 유의미한 값은 ANOVA와 Dunnett's post hoc test를 이용하여 분석하였고, p-value < 0.05를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 통계 분석은 SPSS 통계 분석 소프트웨어 (version 19.0, IBM SPSS, Armonk, NY, USA)를 이용하였다.

결 과

1. 마우스 간에서 TJGB의 p-ACC의 발현에 대한 효과

TJGB의 p-ACC의 단백질 발현에 대한 효과를 확인하기 위해 간 조직에서의 웨스턴 블롯 분석을 시행하였다. 고지방식이 처리군에서 p-ACC의 발현이 감소할 것으로 기대되었으나 눈에 띄는 차이는 나타나지 않았다. 마황의 투여는 p-ACC의 유의미한 증가를 나타내지 않았다. 저농도의 TJGB 처리군의 p-ACC는 일반식이군 대비 강하게 발현되는 것을 확인하였다.

2. 마우스 간에서 TJGB의 LXR의 발현에 대한 효과

LXR의 단백질 발현은 고지방식이군에서 눈에 띄는 증가를 나타내지는 않았다. 마황의 처

리에 의해서 LXR의 발현은 감소하는 것을 확인하였다. TJGB 처리군에서는 고지방 식이군 대비하여 LXR의 감소가 확인되지는 않았다.

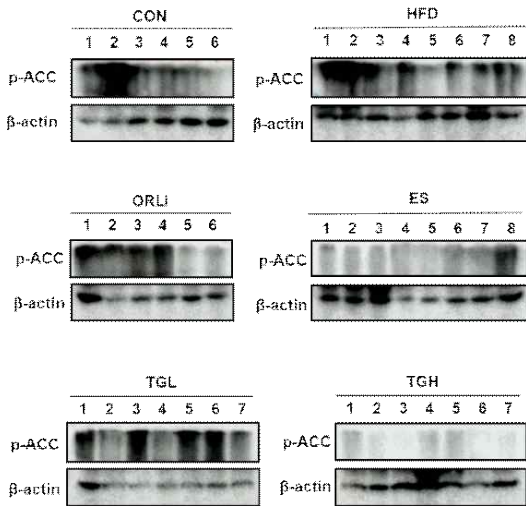


Figure 1. Effect of TJGB on p-ACC expression in the liver of HFD-induced obese mice. The protein expressions of p-ACC and β -actin were assessed via western blotting analysis

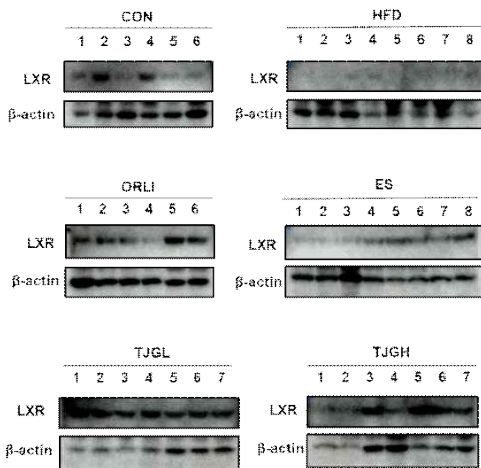


Figure 2. Effect of TJGB on LXR expression in the liver of HFD-induced obese mice. The protein expressions of LXR and β -actin were assessed via western blotting analysis

3. HepG2 세포의 TJGB에 대한 세포 생존률 분석

HepG2 세포에서 7.8 μ g/ml 이상의 농도로 TJGB를 처리했을 때 유의미한 세포 생존율의 감소가 나타났다. 7.8 μ g/ml TJGB 처리의 경우 26.4 %의 감소를 보였으며, 500 μ g/ml TJGB 처리의 경우에는 61.7 %의 감소를 보였다. 반면 마황의 경우 125 μ g/ml 이하의 농도에서 HepG2 세포 증식을 유발하였으며 250 μ g/ml 이상의 농도에서 세포 생존율이 약 27 % 감소하였다.

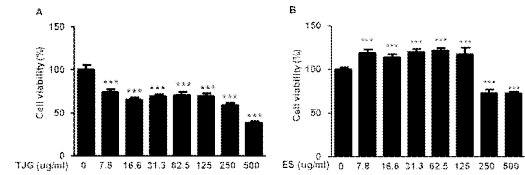


Figure 3. Cell viability of TJGB and ES on HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 0–500 μ g/mL of TJG and ES for 24h. The values were expressed as mean \pm SD. *** p < 0.001 vs. the control group.

고 찰

본 연구는 TJGB를 고지방식이 급여 마우스에 처리하여 간에 미치는 효과를 알아보기 위하여 진행되었다. 마황은 신진대사 촉진을 통해 체지방 감소를 돕는 역할을 한다고 보고되었으며, 또한 항산화 효과⁸⁾를 가지고 있어 산화적 손상을 줄일 수 있으며, 이는 비만과 지질 대사에 응용되고 있다. 따라서, TJGB의 비만으로 유도한 지방간에 대한 보호 효능을 조사하고 더불어 마황과 TJGB의 효능을 비교해 보고자, p-ACC, LXR 인자를 확인하였고, 인간 간암 세포 HepG2에서의 세포생존률을 확인하였다.

Acetyl-CoA carboxylase (ACC)는 인산화를 통해 비활성화되어 지방산 합성을 억제하는 인자이다⁹⁾. ACC는 acetyl-CoA를 malonyl-CoA 전환시키는 역할을 하며 malonyl-CoA 증가를 통해 지방산 β -산화의 핵심효소인 carnitine

palmitoyl transferase-1 (CPT-1)의 활성을 억제하여 지방 합성을 촉진할 수 있다¹⁰⁾. TJGB의 간에서 지방산 β -산화에 대한 효과를 알아보기 위하여 p-ACC의 발현을 확인해보았으나 고지방식이군 대비 약물 처리군에서의 눈에 띄는 증가는 확인할 수 없었다. 또한 LXR은 콜레스테롤과 지질 합성을 조절하는 중요한 인자로¹¹⁾, 본 논문에서 확인해보았으나 TJGB의 처리에 의해 간에서의 발현의 감소를 확인할 수는 없었다. 따라서 TJGB의 고지방식이 급여 마우스의 간에 대한 효과는 p-ACC와 LXR의 상위 인자들의 활성화를 확인해 볼 필요가 있다. 특히, p-AMPK/AMPK, LKB1, CAMK 등의 인자가 영향을 끼칠 수 있을 것으로 사료된다.

또한 HepG2 세포에서의 TJGB과 마황의 세포 생존률을 확인하였다. TJGB의 주 구성약재는 마황이나, HepG2 세포에 마황만을 처리했을 때는 저농도에서 세포가 증식하여 TJGB의 세포 독성과는 다른 경향성을 확인할 수 있었다(Figure 3).

마황의 구성 비율에 따른 세포 독성의 변화에 대한 추가적인 연구가 필요하며, 구성 약재 중 석창포에 함유된 asarone이 간손상을 나타낸다는 보고¹²⁾가 있어, TJGB에서의 asarone 함유 여부 및 함량에 대한 분석이 필요할 것으로 사료된다.

태음조위탕은 임상에서 이미 비만 치료로 많이 사용되는 처방으로 다양한 가감방이 사용되고 있는 바, 항비만 효과에 대한 많은 연구가 필요한 실정이다. 추후 *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 TJGB의 기전과 독성에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결론

고지방식이를 먹인 마우스의 간에서 TJGB의 투여는 p-ACC와 LXR의 단백질 발현에 영향을 거의 미치지 않았다. 또한 HepG2 세포에서 7.8 μ g/mL 이상에서 세포 독성을 나타냈다. 따라서 p-ACC와 LXR이 아닌 다른 경로에

서 TJGB의 효과에 대한 연구가 필요할 것이며, TJGB의 세포독성 기전에 대한 추가적인 연구가 필수적이다.

감사의 말씀

N/A

이해관계

The authors declare no conflict of interest.

참고문헌

- 1) Safaei M, Sundararajan EA, Driss M, Boulila W, Shapi'i A. A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. *Computers in biology and medicine*. 2021 Sep;136:104754. PubMed PMID: 34426171.
- 2) Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism: clinical and experimental*. 2019 Mar;92:82-97. PubMed PMID: 30502373.
- 3) Gutierrez-Cuevas J, Santos A, Armendariz-Borunda J. Pathophysiological Molecular Mechanisms of Obesity: A Link between MAFLD and NASH with Cardiovascular Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2021 Oct 27;22(21). PubMed PMID: 34769060. Pubmed Central PMCID: 8583943.
- 4) Lee SW, Yoo JH, Lee SK, Keum KS, Ryu DG, Kwon KB. Taeyumjoweeatang Affects

Body Weight and Obesity-related Genes in Mice. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM. 2009 Sep;6 Suppl 1(Suppl 1):81-6. PubMed PMID: 19745015. Pubmed Central PMCID: 2741625.

- 5) Park YJ, Lee GS, Cheon SY, Cha YY, An HJ. The anti-obesity effects of Tongbi-san in a high-fat diet-induced obese mouse model. BMC complementary and alternative medicine. 2019 Jan 3;19(1):1. PubMed PMID: 30606178. Pubmed Central PMCID: 6319014.
- 6) Lane MD, Wolfgang M, Cha SH, Dai Y. Regulation of food intake and energy expenditure by hypothalamic malonyl-CoA. International journal of obesity. 2008 Sep;32 Suppl 4:S49-54. PubMed PMID: 18719599.
- 7) Kim MK, Kim SH, Yu HS, Park HG, Kang UG, Ahn YM, et al. The effect of clozapine on the AMPK-ACC-CPT1 pathway in the rat frontal cortex. The international journal of neuropsychopharmacology. 2012 Aug;15(7):907-17. PubMed PMID: 21733226.
- 8) Bilotta MT, Petillo S, Santoni A, Cippitelli M. Liver X Receptors: Regulators of Cholesterol Metabolism, Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. Frontiers in immunology. 2020;11:584303. PubMed PMID: 33224146. Pubmed Central PMCID: 7670053.