

암컷 hGHTg 비만 쥐에서 輕身解脂丸 (GGT1)에 의한 비만관련 유전자 mRNA 발현의 변화

윤기현 · 윤미정¹ · 김 훈² · 신순식*

동의대학교 한의과대학 방제학교실 · 한의학연구소, 1: 목원대학교 생명과학부, 2: 동의대학교 한의과대학 의사학교실 · 한의학연구소

Changes in mRNA Expression of Obesity-related Genes by GyeongshinhaeGihwan 1(GGT1) in hGHTg (human growth hormone transgenic) obese Female Rats

Ki Hyeon Yoon, Michung Yoon¹, Hoon Kim², Soon Shik Shin*

Department of Formulaomics, College of Oriental Medicine & Korea Institute of Oriental Medicine, Dongeui University,

1: Department of Life Sciences, Mokwon University,

2: Department of Medical History, College of Oriental Medicine & Korea Institute of Oriental Medicine, Dongeui University

To investigate the effect of GyeongshinhaeGihwan 1(GGT1) frequently used as an anti-obesity herbal medicine in oriental medicine on the expression of obesity-related genes, we measured the changes in mRNA levels of these genes by GGT1 in human growth hormone transgenic (hGHTg) obese female rats, and these effects by GGT1 were compared with those of reductil (RD), an anti-obesity drug approved by FDA. Rats received once daily oral administrations of autoclaved water, RD, or GGT1 for 8 weeks. At the end of study, rats were sacrificed and tissues were harvested. Total RNA from adipose tissue, liver and kidney was prepared and the mRNA levels for LPL (lipoprotein lipase), PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor-gamma), PPAR δ (peroxisome proliferator activated receptor-delta), leptin, TNF α (tumor necrosis factor-alpha), and internal standard G3PDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were analyzed by RT-PCR. Compared with control group, PPAR γ mRNA levels of liver and kidney were decreased in both RD and GGT1 groups, and the effects were more prominent in GGT1 group than in RD group, suggesting that GGT1 is effective in the inhibition of lipid storage by decreasing the PPAR γ expression. PPAR δ mRNA levels of adipose tissue were increased by RD and GGT1 compared with DW, and the magnitude of increase were higher in GGT1 group than in RD group, indicating that GGT1 stimulates fatty acid oxidation and energy metabolism by activating PPAR δ expression. GGT1 group had higher concentrations of serum leptin, a well-known inhibitor of appetite, than control and RD groups. However, The mRNA levels of leptin, LPL, and TNF α were not changed by GGT1. These results indicate that GGT1 can prevent obesity in hGHTg obese female rats by down-regulating and up-regulating the mRNA expression of PPAR γ and PPAR δ , respectively, and that this anti-obesity effects were more pronounced in GGT1 group compared with RD group. In addition, GGT1 seems to inhibit obesity by increasing the circulating leptin levels.

Key words : female hGHTg rats, GyeongshinhaeGihwan 1, leptin, obesity-related gene, PPAR δ , PPAR γ , reductil

서 론

輕身解脂丸 (GyeongshinhaeGihwan 1, GGT1)은 太陰人의 調

理肺元湯¹⁾加減方으로 임상에서 항비만제로 다수 활용되고 있다. 그럼에도 불구하고 이 경신해지환의 작용기전에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

비만은 에너지섭취와 에너지소비의 불균형으로 에너지섭취가 에너지소비보다 클때 일어난다. 여기에는 음식섭취, 물질대사, 열생성이 비만유발에 중요한 지표로서 관련되어 있으며, 특

* 교신저자 : 신순식, 부산시 부산진구 진리1로 100 동의대학교 한의과대학

· E-mail : ssshin@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7414

· 접수 : 2006/02/12 · 수정 : 2006/03/04 · 채택 : 2006/04/01

이들을 조절하는데는 여기에 관련된 유전자가 많은 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 항비만효과를 입증하는 방법 중에 하나는 비만유전자 발현을 측정하여 알아내는 법이다²⁾. 특히 여성의 비만은 남성과 다른 경향을 나타내며, 이러한 현상에는 성호르몬을 비롯한 다양한 인자들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 실제로 폐경 후의 여성이나 난소를 제거한 동물의 경우 음식물 섭취가 촉진되고, 몸무게와 복부지방이 증가된다. 반대로 난소 스테로이드 호르몬을 투여하면 음식물 섭취와 몸무게가 감소되며, 성 스테로이드가 지방조직에 직접 작용하여 지방조직과 몸무게의 감소를 유도할 수 있음을 보여준다^{3,4)}.

본 연구에서는 형질전환 비만모델 hGHTg 암컷 쥐 (human growth hormone transgenic rat)를 이용하여 GGT1의 항비만효과가 어느 비만유전자와 관련되어 있는지를 알아보고, 또한 norepinephrine과 serotonin의 재흡수를 억제하여 항비만효과를 나타내는 약물로서 미국 FDA에서 승인된 reductil (리덕틸, RD)과는 어떤 차별된 효과가 있는지를 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질은 미국 FDA에서 승인된 양약제제인 RD와 한약제제인 GGT1을 사용하였고, 대조물질은 autoclaved water (멸균수)를 사용하였다. RD는 동의료원에서 처방을 받아 일반약국에서 구입하였고, GGT1은 『東醫壽世保元』의 調理肺元湯(1)을 加減한 처방으로 화립제약(한국)에서 구입하고 동의대학교 한의과 대학 방제학교실에서 정선한 뒤 분말하여 실험에 사용하였다. 투여량은 사람을 기준으로 RD (10mg/60kg 체중)와 GGT1 (3.2g/60kg 체중)을 체중의 kg당 용량별로 경구투여하였다.

Table 1. The composition of GGT1

	Ingredient	%
麥門冬	<i>Liriopeis Tuber</i>	21.28
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	21.28
薏苡仁	<i>Cocis Semen</i>	21.28
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	10.64
蘿蔔子	<i>Raphani Semen</i>	10.64
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	8.50
大黃	<i>Rhei Rhizoma</i>	3.19
海藻	<i>Sargassum</i>	3.19
	Total amounts	100

2. 실험동물

공시동물로서는 사람성장호르몬 (human growth hormone, hGH)을 도입하여 생산된 형질전환 비만동물모델인 16주령의 암컷 쥐 (Wistar-imamichi rat strain) 12마리를 사용하였다. 각 그룹 당 4마리를 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 군 (group) 분리를 실시하여 실험에 사용하였다.

사육환경은 온도 21±2℃, 습도 55±5%, 환기 횟수 15~17회/hour, 조도 150~300 lux, 그리고 조명은 12시간 명암 (점등: 06:00, 소등: 18:00)으로 조정하여 실험 기간동안 일정하게 SPF (specific pathogen free) 상태로 유지하였다. 고휘사료 (Harlan,

U.S.A.)와 물은 자유 급이와 급수를 시켰으며, 부검 및 조직수집 전 12시간동안 절식시켰다.

3. 실험군 및 투여방법

군 (group)당 4마리 암컷 (female)을 공시하였으며, RD는 10mg/day/0.4ml/human 용량으로, GGT1은 3.2g/day/0.4ml/human의 용량으로 경구투여하였다 (Table 2). 대조군은 0.4ml의 멸균수를 경구투여하였으며, 실험군 (RD, GGT1)은 각 군별 체중에 상응하게 약물을 0.4ml에 희석하여 경구투여하였다.

Table 2. Experimental groups

Group	Number of Head	Sex	Dose (mg/kg BW)
Control	4	Female	0
RD	4	Female	0.008
GGT1	4	Female	26

RD, reductil; GGT1, GyeongshinhaeGihwan 1

4. RT-PCR

GGT1이 비만과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 GGT1에 의한 비만관련 유전자 발현의 변화를 관찰하였다. 대조군과 약물군 (RD, GGT1)의 각 조직 (adipose tissue, liver, kidney)으로부터 total RNA를 추출하였고 (Invitrogen, U.S.A.), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통하여 비만과 관련된 유전자, 즉 lipoprotein lipase (LPL), peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ), peroxisome proliferator activated receptor δ (PPAR δ), leptin 및 tumor necrosis factor α (TNF α)의 mRNA 수준을 측정하였다. 또한, 모든 조직으로부터 발현되는 house keeping gene인 G3PDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 internal standard로 사용하여 유전자의 발현정도를 비교분석하였다. Complementary DNA를 합성하기 위하여 2 ug total RNA를 0.5 ug reverse primer와 혼합 후 70℃에서 5분간 반응시켰다. Ice에서 냉각시킨 후 200 units Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT), 25 units ribonuclease 억제제, 4종류의 10 mM dNTP, M-MLV reaction buffer를 총 volume 25 ul에서 혼합하였으며, 42℃에서 1시간 반응시켰다 (promega, U.S.A.). 이후 RT 반응물 5 ul과 각각의 primer (Table 3)를 사용하여 PCR을 수행하였다.

Table 3. Sequences of primer used for RT-PCR

		sequence
LPL	forward	5'-CGCGCTCTAGTCCTCTGACG-3'
	reverse	5'-TTCTTCCTCCAGCCAGTTGA-3'
PPAR γ	forward	5'-CCACTCGCATTCTTTGACA-3'
	reverse	5'-TCAGCTGGTCGATATCACTG-3'
PPAR δ	forward	5'-CACAGACCTCTCCAGAATT-3'
	reverse	5'-CGGGCCCTCTTTTGGTCAT-3'
Leptin	forward	5'-GAGGAAATGTGCTGGAGAC-3'
	reverse	5'-CTGGTGGCCITTTGAAACTTC-3'
TNF α	forward	5'-CACGCTCTTCTGTCTACTGA-3'
	reverse	5'-GCTGACTTTCTCCTGGTATG-3'
G3PDH	forward	5'-ATGTTCCAGTATGACTCCAC-3'
	reverse	5'-GCCAAAGTTGTCATGGATGA-3'

PCR을 위해 5 ul RT 반응물, 4종류의 10 mM dNTP, 0.5 ug reverse와 forward primer, 1 unit Taq polymerase (Solgent, Korea) 및 buffer를 혼합하였고, 최종 volume을 50 ul 로 맞추어 TaKaRa PCR Thermal Cycler (Japan)에서 PCR를 수행하였다. 반응조건은 94℃에서 5분간 변성 (denaturation) 시킨 후, 94℃에서 1분 변성, 61℃에서 1분 혼성화 (annealing), 그리고 72℃에서 1분 30초 합성을 한 cycle로 하여 35 사이클을 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 10분 반응시켰다. 또한, 혼성화 과정은 LPL은 61℃, PPAR γ 는 63℃, PPAR δ 는 63℃, leptin은 62℃, TNF α 는 62℃, G3PDH는 61℃에서 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하고 EtBr로 염색한 후 사진촬영하였다.

본 실험은 식품의약품안전청이 발간한 『독성·약리·병리 시험 표준작업지침서』(II)의 「비만유전자 발현 측정법을 이용한 항비만물질 효력검색법」²⁾에 따라 실험을 진행하였다.

5. 혈중 leptin 농도의 측정

렙틴 농도의 측정은 상품화된 분석용 kit (Wako, Co., Ltd., Japan)를 이용하여 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 법에 의해 정해진 protocol에 따라 분석하였다.

결 과

1. 지방조직에서 비만관련 유전자의 발현양상

지방분해효소인 LPL mRNA 발현은 대조군과 약물투여군 (GGT1, RD)에서 유의차 없이 발현되었으며, white adipose tissue의 지방저장에 관여하는 수용체인 PPAR γ mRNA 발현도 대조군과 약물투여군에서 유의차 없이 발현되었다 (Fig. 1).

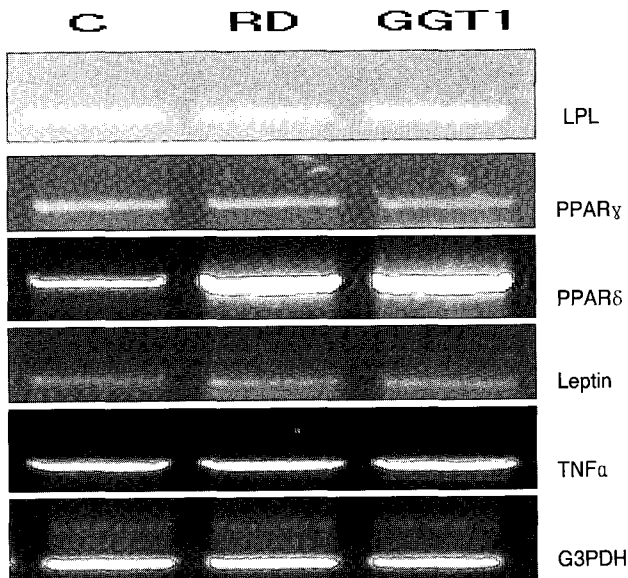


Fig. 1. Regulation of obesity-related gene expression by GGT1 in adipose tissue of hGHTg obese female rats. RD, Reductil; GGT1, GyeongshinhaeGihwan 1

그러나 지방산분해를 촉진함으로써 에너지대사를 조절하는 수용체인 PPAR δ 의 mRNA 발현은 대조군에 비하여 약물투여군

에서 높게 발현되는 것으로 관찰되었다. 성숙한 지방세포의 표지 유전자인 leptin과 TNF α 의 mRNA 발현은 대조군과 약물투여군에서 유의차 없이 발현되는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 GGT1은 지방조직에서 PPAR δ 의 유전자 발현을 증가시킴으로써 지방산분해 촉진 및 비만조절에 관여할 수 있으리라 생각된다.

2. 간장에서 비만관련 유전자의 발현양상

지방조직에서의 GGT1 효과와 달리, PPAR γ mRNA 발현은 대조군보다 약물투여군에서 훨씬 더 낮게 발현되었고, RD와 비교하여 GGT1에 의해 더 낮게 발현하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2). 그러나 PPAR δ mRNA 발현은 대조군과 약물투여군에서 유의차가 나타나지 않았다. 따라서 GGT1은 간장에서 PPAR γ 유전자 발현을 감소시킴으로써 비만의 지표인 지방저장을 억제할 것으로 보인다.



Fig. 2. Regulation of obesity-related gene expression by GGT1 in the liver of hGHTg obese female rats. RD, Reductil; GGT1, GyeongshinhaeGihwan 1

3. 신장에서 비만관련 유전자의 발현양상

신장의 LPL mRNA 발현은 대조군과 약물투여군에서 유의차가 나타나지 않았다 (Fig. 3). 지방저장에 관여하는 수용체인 PPAR γ mRNA 발현은 다른 군보다 GGT1군에서 가장 적게 발현하는 것으로 관찰되었으며, 지방산분해를 촉진하는 수용체인 PPAR δ mRNA 발현은 대조군과 약물투여군에서 유의차가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 간장에서의 효과와 유사하게 GGT1에 의한 PPAR γ 발현감소가 지방저장 억제에 기여할 수 있음을 시사한다.

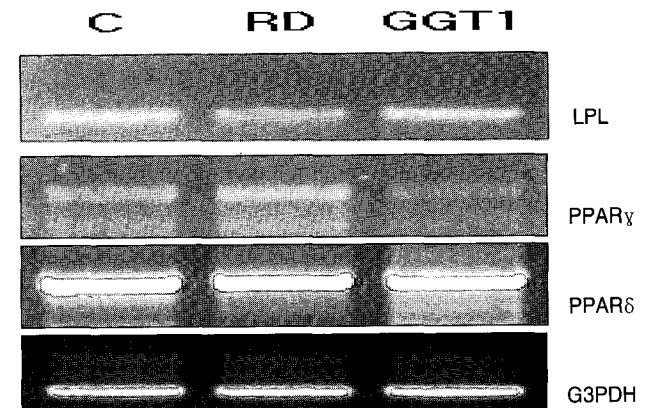


Fig. 3. Regulation of obesity-related gene expression by GGT1 in the kidney of hGHTg obese female rats. RD, Reductil; GGT1, GyeongshinhaeGihwan 1

4. 혈중 leptin 농도의 변화

식욕억제호르몬인 혈중 leptin 농도는 대조군과 비교하여 약물투여군에서 높았으며, GGT1이 RD보다 혈중 leptin 농도를 더욱 증가시켰다. 이러한 결과는 GGT1이 식욕억제를 통해 비만을 조절할 수 있음을 보여준다.

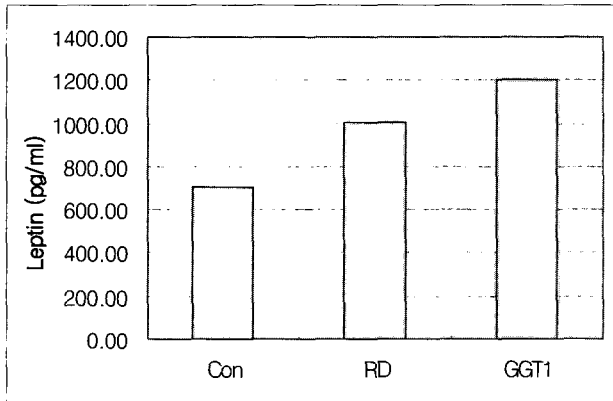


Fig. 4. Changes in serum leptin levels by GGT1 in hGHTg obese female rats. Con, control; RD, Reducilli; GGT1, GyeongshinhaeGihwan 1

고 찰

GGT1이 비만과 관련이 있는지를 알아보고, 현재 비만치료제로 사용되고 있는 RD와는 어떤 차별된 효과를 나타내는지 조사하기 위하여 암컷 형질전환 비만 쥐 (hGHTg rat)를 사용하여 비만관련 유전자 발현의 변화를 관찰하였다. 대조군과 약물군 (GGT1, RD)의 각 조직 (adipose tissue, liver, kidney)으로부터 total RNA를 추출하고, RT-PCR을 통하여 비만과 관련된 유전자, 즉 지방분해효소인 LPL, 지방저장에 관여하는 PPAR γ , 지방산산화를 촉진시키는 PPAR δ , 성숙한 지방세포의 marker인 leptin과 TNF α 의 mRNA 발현을 측정하였으며, G3PDH를 internal standard로 사용하여 발현정도를 비교분석하였다.

지방분해효소인 LPL mRNA는 대조군, RD군과 GGT1군의 지방조직, 신장에서 모두 유의차가 나타나지 않아 약물치료군에 의해 별다른 영향을 받지 않았다.

PPAR γ 는 지방조직에서 다량으로 발현하여 지방세포의 분화과정 중 초기단계에 그 발현이 증가되며, C/EBP α 와 함께 지방전구세포에서 지방세포로의 분화에 있어 가장 핵심적인 기능을 담당한다고 알려져 있다⁵⁾. 본 실험에서 PPAR γ mRNA 발현은 지방조직의 대조군, RD군과 GGT1군에서는 유의차가 나타나지 않았으나, 간장과 신장에서는 약물투여군이 대조군에 비하여 낮게 발현되었으며, 특히 GGT1군이 RD군보다 더 낮게 발현되었음을 알 수 있었다. 따라서 PPAR γ 의 발현이 낮으면 지방세포의 분화 및 지방저장이 억제되기 때문에 약물투여군이 대조군에 비하여 지방축적이 감소되고, 약물투여군 중 GGT1군에서 RD군보다 지방저장이 더욱 감소되었음을 시사한다.

PPAR δ 는 현재까지 거의 모든 조직에서 발현되는 것으로 보고되었으며 지방산에 의해 활성화되는 핵 수용체로 보고되었다⁶⁾. PPAR δ 의 합성 리간드인 GW501516은 비만을 나타내는 실험

원숭이에서 혈중 지단백과 중성지방 수치를 낮추는 역할을 하며,⁷⁾ 특히 비만동물모델에서 PPAR δ 의 활성화에 의한 HDL-cholesterol 수치상승은 PPAR α 의 리간드로 알려진 fibrate에 의한 상승효과보다 훨씬 높게 나타났다. PPAR δ 에 관한 최근의 다수연구에서 PPAR δ 는 태반형성, 비만, 결장암, 당뇨 등과의 연관성이 보고되고 있다⁷⁾. 본 실험에서 PPAR δ mRNA는 대조군, RD군과 GGT1군의 간장과 신장에서는 모두 유의차가 나타나지 않았으나, 지방조직에서는 약물투여군이 대조군에 비하여 현저히 높게 발현되었다. 따라서 PPAR δ 의 발현이 높으면 지방산분해가 촉진됨으로써 에너지소비를 증가되므로 RD군과 더불어 GGT1군이 지방조직 PPAR δ 의 발현을 증가시켜 비만억제에 관여함을 보여준다.

지방조직이 증가되면 지방조직을 구성하는 성숙한 지방세포로부터 leptin 발현이 증가되며, 이들이 시상하부에 작용하여 식욕을 촉진하는 neuropeptide Y (NPY)/aguti related protein (AgRP) neuron을 억제하고 식욕을 억제하는 proopiomelanocortin (POMC) neuron은 촉진하여 음식섭취를 줄인다. 반대로 지방조직이 감소하면 leptin과 insulin의 발현이 억제되어 식욕을 촉진하는 NPY/AgRP neuron이 활성화되고 식욕을 억제하는 POMC neuron은 억제되어 음식섭취를 증가시킨다.^{8,9)} 본 실험에서 leptin mRNA 발현은 대조군, RD군과 GGT1군의 지방조직에서는 유의차가 나타나지 않았으나, 혈중 leptin 농도는 대조군 및 RD군과 비교하여 GGT1군에서 더 높게 나타나 GGT1이 leptin의 수준을 증가시켜 식욕조절에 관여하고 있음을 알 수 있다.

Leptin과 유사하게 TNF α 는 성숙한 지방세포에서 발현이 높고 비만일때 그 발현이 증가되는 것으로 알려져 있으며¹⁰⁻¹²⁾, 심혈관질환의 위험도를 높여 항비만효과를 평가하는데 유용한 지표로 이용되고 있다. 본 실험에서 TNF α mRNA 농도는 대조군, RD군과 GGT1군의 지방조직에서 유의차가 나타나지 않아 GGT1에 의한 비만조절에 TNF α 유전자 발현이 별다른 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

결 론

GGT1이 비만과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 비만관련 유전자들의 발현을 측정하였다. 대조군, RD군 및 GGT1군의 지방조직, 간장, 신장으로부터 total RNA를 추출하고, RT-PCR을 이용하여 비만과 관련된 유전자의 mRNA 변화를 비교분석하였다.

PPAR γ mRNA는 간장과 신장에서 대조군에 비하여 약물투여군에서 낮게 발현되었으며, 특히 GGT1군이 RD군보다 더 낮게 발현됨으로써 GGT1이 지방저장 억제에 효과적임을 시사한다. PPAR δ mRNA는 지방조직에서 RD군과 GGT1군이 대조군에 비하여 높게 발현되어 RD와 더불어 GGT1이 지방산분해 및 에너지소비를 촉진하는 것으로 보인다. Leptin은 지방조직에서 대조군과 약물투여군 간에 유의차가 나타나지 않았으나, 혈중 leptin 농도는 대조군 및 RD군과 비교하여 GGT1군에서 더 높게 나타남으로써 GGT1이 leptin의 혈중 농도를 증가시켜 식욕을 억제함을 보여준다. LPL mRNA와 TNF α mRNA는 대조군, RD군

과 GGT1군의 각 조직에서 모두 유의차가 나타나지 않아 GGT1에 의해 별다른 영향을 받지 않음을 알 수 있다.

그러므로 GGT1은 간장과 신장조직의 PPAR γ mRNA 수준을 감소시키고 지방조직에서 PPAR δ mRNA 수준을 증가시킴으로써 비만억제에 관여하며, 현재 비만치료제로 사용되는 RD과 비교하여 그 효과가 더 큰 것으로 보인다. 또한 단백질 수준에서는 혈중 leptin 농도를 증가시켜 비만억제 효과를 나타내는 것으로 생각된다. 이러한 결과들은 수컷 비만 쥐에서 보여준 GGT1의 효과와 매우 유사한 것으로 나타났으며, GGT1에 의한 비만관련 유전자발현의 조절은 성(性)과 무관함을 시사한다.

참고문헌

1. 李濟馬 著. 東醫壽世保元. 重版印刷. 서울, 행림출판, p 123, 1993.
2. 국립독성연구소. 독성·약리·병리 시험 표준작업지침서(II). 서울, 식품의약품안전청, pp 351-354, 1999.
3. Mystlowski P, Schwartz MW.. Gonadal steroids and energy homeostasis in the leptin era. Nutrition 16, 937-946, 2000.
4. Geary, N., Asarian, L. Estradiol increases glucagon's satiating potency in ovariectomized rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 281, R1290-1294, 2001.
5. Rosen, E.D. et al. PPAR is required for differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. Mol Cell 4, 611-617, 1999.
6. Oliver, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 6102-6106, 1999.
7. Winegar, D.A. Effects of fenofibrate on lipid parameters in obese rhesus monkeys. J. Lipid. Res. 42, 1543-1551, 2001.
8. Michael, W., Schwartz Stephen C. Woods, Daniel Porte Jr, Randy J. Seeley and Denis G. Baskin. Central nervous system control of food intake. NATURE 404, 661-671, 2000.
9. J.M. Friedman. Obesity in the new millennium. NATURE 404, 632-634, 2000.
10. Fahumiya Samad et al. Tumor necrosis factor α is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 6902-6907, 1999.
11. Enzo Nisoli et al. Tumor necrosis factor α mediates apoptosis of brown adipocytes and defective brown adipocyte function in obesity. PNAS 97, 8033-8038, 2000.
12. Park, H.S., Park, J.Y., Yu, R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. Diabetes Res Clin Pract. 69(1):29-35, 2005.