

減肥 4號方이 비만이 유도된 생쥐에 미치는 영향

황재필, 윤일지

대전대학교 한의과대학 한방재활의학과 교실

The Anti-obesity Effects of Gambi-bang 4(減肥 4號方) on Obesity-induced Mice

Jae-Pil Hwang, Il-Ji Yoon

Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objectives: This study was performed to investigate the anti-obesity effects of Gambi-bang 4 (GBB4) on obesity-induced mice.

Methods: C57BL/6 mice were divided into four groups (normal, high fat diet with control, high fat diet with Reductil, high fat diet with GBB4 extract) and fed for 8 weeks. We observed body weight change, the weight change of the adipocytes in body, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides, serum leptin level, expression of β 3AR and leptin genes in 3T3-L1 adipocytes and adipose tissue, and histological changes of adipose tissue and liver cells.

Results:

1. Compared with the control group, the GBB4 group was significantly lower in body weight, weight of adipocytes, and amount of glucose.
2. The GBB4 group was significantly lower in the amount of total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides, and HDL-cholesterol compared with the control.
3. Compared with the control group, the GBB4 group was significantly lower in the amount of serum leptin.
4. The GBB4 group was significantly higher in the revelation of β 3AR and leptin in 3T3-L1 adipocytes and primary adipose cells compared with the control.
5. Compared with the control group, the GBB4 group was smaller in the size of adipocytes in adipose tissue and the adipose vacuoles in liver tissue were decreased.

Conclusions: These results suggested that GBB4 has inhibitory effects on obesity. GBB4 might be applied in treatment of obesity, so further studies analyzing its effects are needed.

Key Words : GBB4 (Gambi-bang 4), obesity, mouse, gene, adipocyte.

서론

비만이란 대사 장애로 인해 지방이 체내에 과잉 축적된 상태를 말하는 것이며, 신체활동과 성장에 필요한 에너지를 초과하여 섭취된 칼로리가 중성 지방의 형태로 지방조직에 과잉 축적된 열량 불균형을

의미한다¹⁾.

비만은 선진국에서 가장 흔한 영양질환 중 하나로 최근 우리나라에서도 경제성장 및 생활수준의 향상과 더불어 식생활의 서구화에 의하여 비만관련 유병률이 증가하고 있으며²⁾, 2005 국민건강영양조사에 의하면 대한비만학회 기준(BMI \geq 25)에 의한 비

• Received : 13 July 2009 • Revised : 7 September 2009 • Accepted : 12 October 2009
• Correspondence to : 윤일지(Il-ji Yoon)
충북 청주시 상당구 용담동 173-9번지 대전대학교 부속 청주한방병원 한방재활의학과 교실
Tel : +82-43-229-3729, Fax : +82-43-253-8757, E-mail : Koyij@dju.ac.kr

만 유병률은 1995, 1998, 2001, 2005년에 각각 20.5, 26.3, 29.6, 31.7%로 이환 환자의 수가 점차 증가하고 있다³⁾.

이러한 비만은 유전적 요인, 갑상선 기능저하증이나 쿠싱 증후군 등의 일부 내분비 질환에 의한 호르몬 요인, 사회문화적 요소나 식생활 유형 등의 환경적 요인, 스테로이드제 등의 약물남용 등으로 발생할 수 있으며⁴⁾, 기전은 필요 이상의 에너지를 섭취하는 경우와 섭취한 만큼의 열량을 제대로 소모하지 못해 에너지로 축적되는 경우로 구별할 수 있다⁵⁾.

한의학에서는 비만의 형상에 대하여 《靈樞·逆順肥瘦篇》⁶⁾ “年質壯大 血氣充孕 膚革堅固…肥人也”, 《靈樞·衛氣失常篇》⁶⁾에 “膈肉堅 皮緩者肥”라고 표현하였으며, 《素問·通評虛實論》⁶⁾에 “肥貴人 膏粱之質也”라 하여 비만의 원인을 膏粱한 飲食의 過服으로 언급한 이래 先天稟賦, 過食肥甘厚味, 久臥久坐, 外感濕邪, 內傷七情 등으로 인한 氣滯, 痰濁, 水濕 및 血瘀 등을 비만의 주 원인으로 보고 있다⁷⁾.

비만은 한의학적 변증에 따라 脾虛水濕型, 痰飲型, 陽虛兼水濕型, 食積型, 肝鬱型, 瘀血型으로 나누어 치료할 수 있으며⁸⁾, 문 등⁹⁾의 연구에 따르면 비만 환자 중 痰飲과 脾虛로 변증되는 환자의 비율이 높다고 한다.

비만 치료에 대한 연구는 麻黃¹⁰⁾, 蒼朮¹¹⁾, 薏苡仁¹¹⁾, 吳茱萸¹²⁾, 茵陳¹³⁾ 등의 단미제와 太陰調胃湯¹⁴⁾,

調胃升清湯¹⁵⁾, 體減薏苡仁湯¹⁶⁾, 防風通聖散¹⁷⁾ 등의 처방의 연구가 이루어 졌으며, 단미제로는 麻黃⁸⁾이, 처방 중에서는 四象處方^{11,12)}의 빈도가 높은¹⁸⁾ 실정으로 임상적으로 辨證施治하는 처방은 부족한 실정이다.

이에 저자는 脾虛濕痰型 비만에 활용하기 위하여 체질량과 체지방 감소에 효과적인 麻黃¹⁰⁾과 체중조절과 triglyceride, total cholesterol, free fatty acid의 감소 효과가 있는 蒼朮, 薏苡仁¹¹⁾ 을 군약으로, 利水之劑 등을 가하여 減肥 4號方을 구성한 후, 본 처방의 비만에 대한 효과를 규명하고자 고지방 사료로 비만을 유도한 생쥐를 대상으로 체중 및 혈액학적 변화, 비만 유전자의 발현, 조직학적인 변화 등을 관찰한 결과 유의한 성적으로 얻었기에 보고하는 바이다.

실험

1. 재료

1) 동물 및 사료

실험동물은 다물사이언스(Daejeon, Korea)에서 분양받은 8주령의 C57BL/6 생쥐(female, 24마리, 20~24 g)를 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22.0±2℃, 1일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였

Table 1. The Prescription of *Gambi-bang* (GGBB4)

Herbal name	Scientific Name	Amount(g)
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	20
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	20
蒼朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	20
白茯苓	<i>Poria</i>	6
豬苓	<i>Polyporus</i>	6
木通	<i>Akebiae Caulis</i>	6
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	6
麥門冬	<i>Liriopeis Tuber</i>	6
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	6
石膏	<i>Gypsum Fibrosum</i>	6
Total amount		102

다. 실험기간 동안 식이는 일반 고형사료(삼양사), 고지방사료(Bioserv, USA)를 사용하였고, 물은 충분히 공급하였다.

2) 약제

본 실험에 사용한 減肥 4號方(이하 GBB4)의 구성 약제는 대전대학교부속 대전한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

2. 방법

1) 검액의 조제

열탕추출기에 GBB4 처방 2첩과 증류수 1,300 ml을 넣어 2시간 30분 동안 가열 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 22.5 g의 분말을 얻었다. 얻어진 분말은 냉동고에서 보관하며 필요한 농도로 distilled water에 희석하여 사용하였다.

2) 사료의 식이와 검액의 투여

생쥐 6마리를 1군으로 하여 일반 사료군(정상군), 고지방 사료군(대조군), Reductil 투여군(양성대조군, 이하 RDT), 減肥 4號方 투여군(실험군, 이하 GBB4)으로 나누어 자유식이 하였다. 정상군을 제외한 실험군의 몸무게가 자유식이 8주 때에 평균 26 g 이 되었다. 이때부터 정상군과 대조군은 증류수를, RDT 투여군은 사람의 임상 복용량 기준인¹⁹⁾ 10 mg/kg의 농도로, GBB4 투여군은 성인 60 kg을 기준으로 생쥐무게를 환산하여 하루 330 mg/kg의 농도로 물에 타서 8주 동안 매일 경구 투여하였다.

3) 체중 측정 및 식이량 측정

7일 간격으로 동물의 체중과 식이 섭취량을 0.1 g 단위까지 측정하였다.

4) 간무게 및 지방조직의 측정

체혈 후 간을 절취하여 수분을 제거하고 정밀저

울(satorius., USA)을 이용하여 0.001 g단위까지 측정하였다. 지방조직은 복강 내의 지방을 최대한 절취한 후 지방체 조직의 무게를 정밀저울을 이용하여 측정하였다.

5) 혈액학적 분석

(1) 채혈 및 혈청 분리

Ether로 마취하여 심장 천자법으로 혈액을 채취한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다.

(2) Glucose 검사

Glucose 활성도는 JSCC UV method의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다.

(3) Cholesterol 함량 측정

Total cholesterol의 함량은 enzymatic colorimetry method의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였고, HDL-cholesterol과 LDL-cholesterol은 direct enzymatic assay를 이용하여 측정하였다.

(4) Triglyceride 함량 측정

Triglyceride 함량은 enzymatic colorimetry method의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다.

6) 지방 체세포 내 비만 세포 발현량 분석

(1) In vitro

지방세포로 분화된 3T3-L1 세포를 2% 우테아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에 1 mg/ml의 collagenase IV를 가한 용액에 넣고, 37°C, shaking 배양기에서 30분 동안 분해하여 지방 체세포를 분리하였다. 분리된 지방 체세포는 배지로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 여기에 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 3일간 24 well plate에 지방 체세포(1×10^5 cells)를 배양한 후 여기에 GBB4 (100, 50) μ g/ml를 처리하여 8시간 배양한 후 RNAzolB를 사용하여 total RNA를 추출하였다.

(2) In vivo

① 지방세포 분리 배양 및 leptin 측정

생쥐를 경추 탈골로 치사시킨 후 복강 내 지방세포를 분리하였다. 조직을 잘게 절편 한 후 2% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에 1 mg/ml의 collagenase IV를 가한 용액에 넣고 37°C, shaking 배양기에서 30분 동안 5회 이상 조직을 분해하여 지방세포를 분리하였다. 분리된 지방세포는 배지로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이들 세포들로부터 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 지방세포를 10% FBS-DMEM 배지에 48시간 배양하였다.

배양액 내 leptin의 생성량은 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 각 well에 배양 상등액 100 μ l씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 다음 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② 지방세포 내 leptin과 β 3AR

(β3-adrenergic receptor gene) 발현량 조사

생쥐를 경추 탈골로 치사시킨 후 복강 내의 지방세포를 떼어내어 액체 질소를 이용하여 균질화하였다. RNAzolB 500 μ l씩 첨가하여 세포막을 터트린 후, RNAzolB의 1/10 양에 해당하는 CHCl₃ (chloroform)을 넣고, 15초간 vortex로 혼합한 후, 얼음에서 15분간 방치하였다. 4°C 13,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 취하여 동량의 iso-propanol과 혼합하여 다시 15분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 1 ml의 70% EtOH을 넣고 washing한 후 상온에서 건조시켰다. 추출한 total RNA는 diethylpyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75°C에서 5분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmol / 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 37°C 항온 수조에서 1시간 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

합성된 cDNA 중 1 μ l를 사용하여 20 μ l의 PCR 반응액(10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 7.5 mM 4NTPS, 20 pmol sense, antisense primers, 2 units Taq polymerase)을 제조하였다. PCR 반응액은 turbo thermocycler system을 사용하여 pre-denaturation 3분, denaturation 94°C, 1분 ; annealing 55°C, 1분 ; extension 72°C, 1분 패턴으로 30회 반복하였다. 각 primer의 특성에 따라서 annealing 온도를 변화시켰으며 반응 산물은 1% agarose gel에서 전기 영동하여 분석하였다.

7) 조직검사

Ether로 마취하여 심장 천자를 통해 혈액을 채혈하고 흉부 및 복강을 절개하여 liver와 adipose tissue를 적출하였다.

각 실험군 별로 적출한 조직은 10% 중성 포르말린에 48시간 고정하여 고정이 완료된 각 조직들은 흐르는 수돗물에서 12시간 수세하여 조직 내 고정액을 완전 제거하였다. 조직의 탈수를 위해 60%에서부터 100% 알코올에 이르기까지 농도 상승 순으로 통상의 방법에 따라 탈수하고, xylene에 투명과정을 거친 다음 파라핀 블럭을 제작하였다. 제작된 블럭은 박절기(microtome)를 이용하여 3~4 μ m 두

개로 절편을 만들어 탈 파라핀 및 함수과정을 거친 다음 hematoxyline 과 eosin(H&E) 일반 염색을 실시하여 광학현미경상에서 관찰 및 사진 촬영 하였다.

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 10.0 for windows의 Student's t-test를 사용하여 통계처리 하였으며, $p < 0.05$ 이하에서 유의성을 검정하였다.

성 적

1. 세포독성에 미치는 영향

hFCs에서는 정상군의 세포생존율은 100 ± 1.4 (%)로 나타난 반면, GBB4의 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서는 각각 85.8 ± 2.4 , 87.4 ± 4.3 , 90.4 ± 6.4 , 94.0 ± 3.5 , 101.4 ± 2.7 로 나타났다.

2. 체중 변화에 미치는 영향

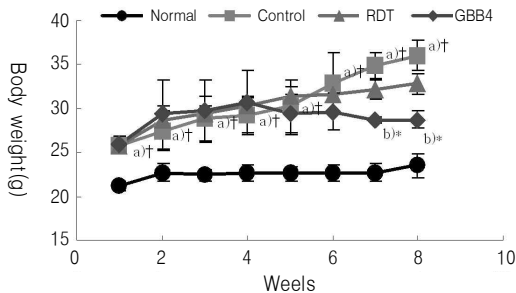


Fig. 1. Effect of GBB4 extract on the body weight change in obese mice fed high-fat diet

Time course of food intake was measured for body weight change on seven interval day. All mice were conducted one for free-diet and not supplemented diet mice control group.

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg)

The results are represent the mean±S.E.

a) Statistically significant value compared with normal group(† $p < 0.01$)

b) Statistically significant value compared with control group(* $p < 0.05$)

대조군의 체중 변화는 지속적인 증가하여, 8주째에는 36.0 ± 1.7 g으로 나타났다. RDT 투여군은 8주째에 32.8 ± 1.2 g으로 나타났으며, GBB4 투여군은 7주째에 28.8 ± 0.4 , 8주째에 28.8 ± 1.1 g으로 나타나 7주째부터 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 체중 감소를 보였다(Fig. 1).

3. 간 무게에 미치는 영향

정상군은 1.10 ± 0.20 g, 대조군이 1.34 ± 0.1 g으로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 증가하였고, RDT 투여군은 1.22 ± 0.19 g, GBB4 투여군은 1.13 ± 0.15 g으로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 2).

4. 체내 adipocyte 무게에 미치는 영향

정상군이 0.30 ± 0.11 g, 대조군이 3.69 ± 0.37 g으로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 유의성($p < 0.001$) 있게 증가하였고, RDT 투여군은 3.36 ± 0.61 g으로, GBB4 투여군은 1.59 ± 0.01 g으로 나타나 대조군에 비하여 GBB4 투여군에서 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다(Fig. 3).

5. Glucose 변화에 미치는 영향

정상군이 154.5 ± 12.0 mg/dl, 대조군이 270.5 ± 53.0 mg/dl로 유의성($p < 0.05$) 있게 증가한 반면, RDT 투

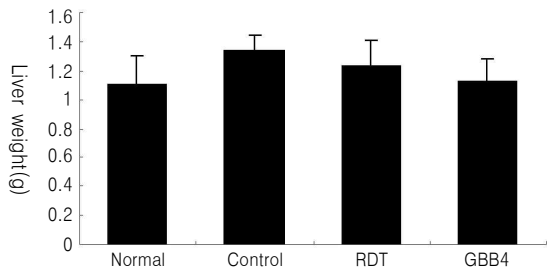


Fig. 2. Effect of GBB4 extract on the liver weight in obese mice fed high-fat diet

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg), The results are represent the mean±S.E.

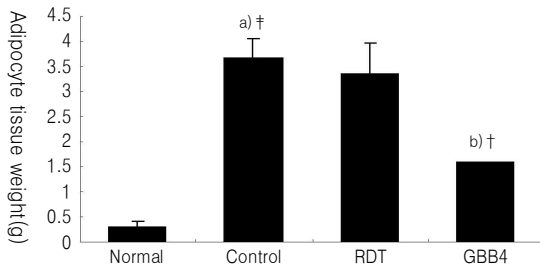


Fig. 3. Effect of GBB4 extract on the adipose tissue weight in obese mice fed high-fat diet

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg)
The results are represent the mean±S.E.
a) Statistically significant value compared with normal group(†p<0.001)
b) Statistically significant value compared with control group(†p<0.01)

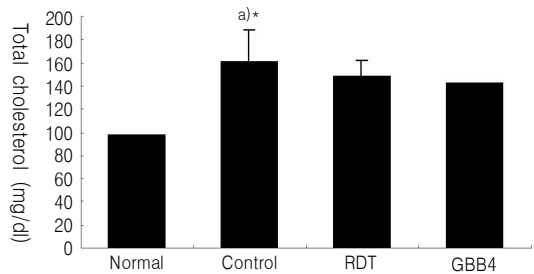


Fig. 5. Effects of GBB4 extract on the total cholesterol level in obese mice fed high-fat diet

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg)
The results are represent the mean±S.E.
a) Statistically significant value compared with normal group(*p<0.05)

여군은 189.0±11.3 mg/dl, GBB4 투여군은 198.0±1.4 mg/dl 으로 대조군에 비하여 유의성(p<0.05) 있게 감소하였다(Fig. 4).

6. Total cholesterol 변화에 미치는 영향

정상군이 97.5±0.7 mg/dl, 대조군은 161.0±28.3 mg/dl로 나타나 정상군에 비하여 유의성(p<0.05) 있

게 증가하였다. 이에 비해 RDT 투여군은 148.5±13.4 mg/dl, GBB4 투여군에서는 143.0±0.0 mg/dl으로 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 5).

7. LDL-Cholesterol 변화에 미치는 영향

정상군이 9.8±0.1 mg/dl, 대조군이 24.6±1.1 mg/dl로 나타나 정상군에 비하여 유의성(p<0.001) 있게 증가하였으며, RDT 투여군은 18.3±1.9 mg/dl, GBB4

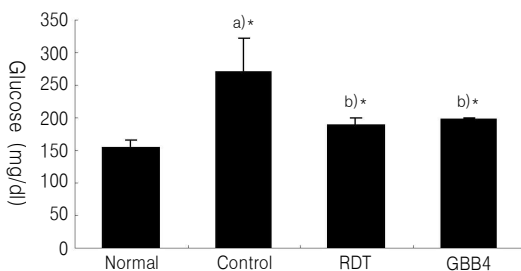


Fig. 4. Effects of GBB4 extract on the glucose level in obese mice fed high-fat diet

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg), The results are represent the mean±S.E.
a) Statistically significant value compared with normal group(*p<0.05)
b) Statistically significant value compared with control group(*p<0.05)

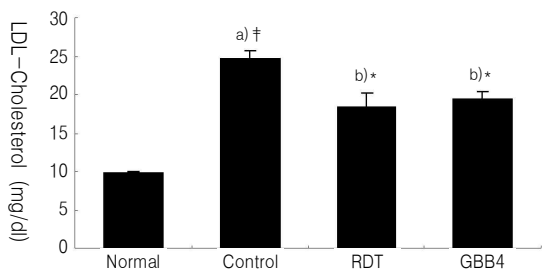


Fig. 6. Effects of GBB4 extract on the LDL-cholesterol level in obese mice fed high-fat diet

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg)
The results are represent the mean±S.E.
a) Statistically significant value compared with normal group(†p<0.001)
b) Statistically significant value compared with control group(*p<0.05)

투여군은 19.4 ± 1.0 mg/dl 으로 나타나 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였다(Fig. 6).

8. HDL-Cholesterol 변화에 미치는 영향

정상군은 56.2 ± 0.4 mg/dl, 대조군은 76.2 ± 0.6 mg/dl 로 대조군이 정상군보다 유의성($p < 0.01$) 있게 증가하였으며, RDT 투여군은 89.7 ± 3.7 mg/dl, GBB4 투여군은 87.1 ± 4.3 mg/dl 로 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다(Fig. 7).

9. Triglyceride 변화에 미치는 영향

정상군이 26.5 ± 0.7 mg/dl, 대조군이 42.0 ± 2.8 mg/dl로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 유의성($p < 0.01$) 있게 증가하였으며, RDT 투여군은 24.5 ± 2.1 mg/dl, GBB4 투여군은 24.5 ± 2.1 mg/dl로 대조군에 비하여 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다(Fig. 8).

10. 혈청 내 leptin 변화에 미치는 영향

정상군이 0.09 ± 0.02 OD, 대조군이 1.91 ± 0.32 OD 로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 유의성($p < 0.001$) 있게 증가하였으며, RDT 투여군은 1.97 ± 0.06 OD, GBB4 투여군은 1.56 ± 0.14 OD로 대조군에 비하여

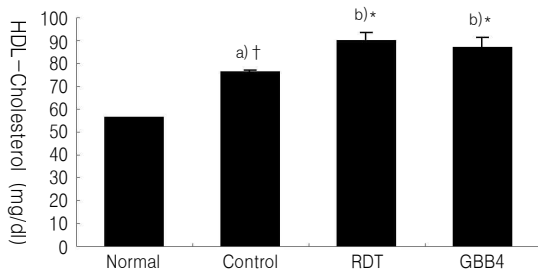


Fig. 7. Effects of GBB4 extract on the HDL-cholesterol level in obese mice fed high-fat diet
 Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg)
 The results are represent the mean±S.E.
 a) Statistically significant value compared with normal group(† $p < 0.01$)
 b) Statistically significant value compared with control group(* $p < 0.05$)

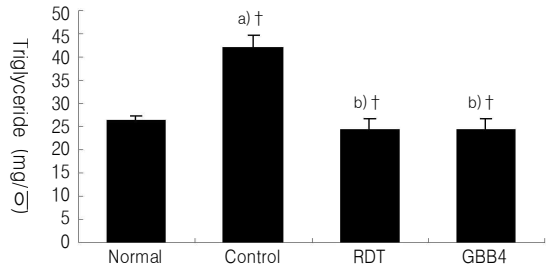


Fig. 8. Effects of GBB4 extract on the triglyceride level in obese mice fed high-fat diet
 Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg)
 The results are represent the mean±S.E.
 a) Statistically significant value compared with normal group(† $p < 0.01$)
 b) Statistically significant value compared with control group(† $p < 0.01$)

GBB4 투여군에서 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 9).

11. 3T3-L1 adipocytes에서 유전자 발현에 미치는 영향

1) $\beta 3AR$ 발현에 미치는 영향

정상군이 0.75 ± 0.14 RQ, 대조군이 1.01 ± 0.01 RQ

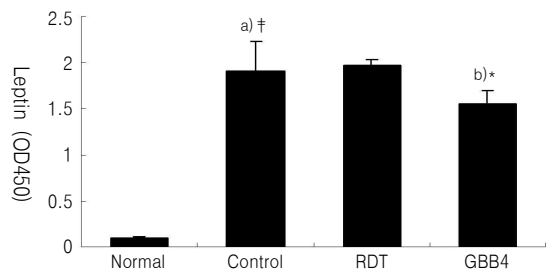


Fig. 9. Effects of GBB4 extract on the leptin level in obese mice fed high-fat diet
 Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg)
 The results are represent the mean±S.E.
 Statistically significant value compared with normal group(† $p < 0.001$)
 Statistically significant value compared with control group(* $p < 0.05$)

로 나타났으며, GBB4 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군은 각각 2.03 ± 0.19 RQ와 1.60 ± 0.12 RQ로 나타나 대조군에 비하여 유의성($p < 0.001$, $p < 0.01$) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 10).

2) Leptin 발현에 미치는 영향

정상군이 0.27 ± 0.07 RQ, 대조군이 1.00 ± 0.02 RQ로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 유의성($p < 0.001$) 있는 증가하였으며, GBB4 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군은 각각 0.56 ± 0.07 RQ와 0.71 ± 0.04 RQ로 나타나 대조군에 비하여 유의성($p < 0.01$, $p < 0.05$) 있게 감소하였다(Fig. 11).

12. Primary adipose cell 에서의 유전자 발현에 미치는 영향

1) $\beta 3\text{AR}$ 발현에 미치는 영향

정상군이 2.05 ± 0.13 RQ로, 대조군이 1.02 ± 0.03 RQ로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하였으며, RDT 투여군에서 5.20 ± 0.33 RQ, GBB4 투여군에서 5.11 ± 0.51 RQ로 나타나 대조군에 비하여 유의성($p < 0.001$) 있게 증가하였다(Fig. 12).

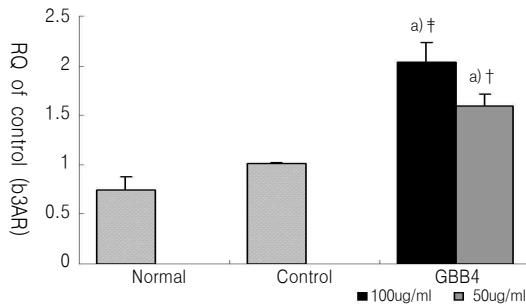


Fig. 10. Effects of GBB4 extract on the $\beta 3\text{AR}$ mRNA gene expression in 3T3-L1 adipocytes

Real-time-PCR of $\beta 3\text{AR}$ and GAPDH relative in co-cultured 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were isolated mRNA and RQ of $\beta 3\text{AR}$ mRNA expression for analyzed by real-time PCR.

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, GBB4 : High fat diet and GBB4(100, 50 $\mu\text{g/ml}$)

The results are expressed the mean \pm S.E.

a) Statistically significant value compared with control group ($\dagger p < 0.001$, $\ddagger p < 0.01$)

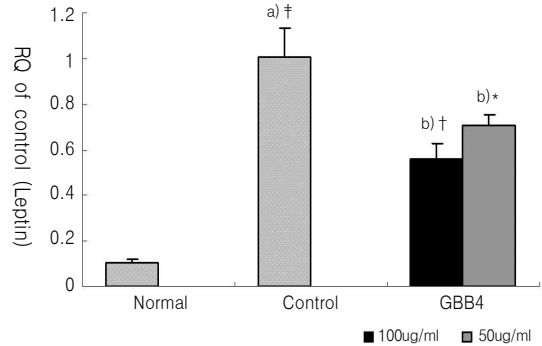


Fig. 11. Effects of GBB4 extract on the leptin mRNA gene expression in 3T3-L1 adipocytes

Real-time-PCR of leptin and GAPDH relative in co-cultured 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were isolated mRNA and RQ of leptin mRNA expression for analyzed by real-time PCR.

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, GBB4 : High fat diet and GBB4(100, 50 $\mu\text{g/ml}$)

The results are expressed the mean \pm S.E.

a) Statistically significant value compared with normal group ($\ddagger p < 0.001$)

b) Statistically significant value compared with control group ($\dagger p < 0.01$, $* p < 0.05$)

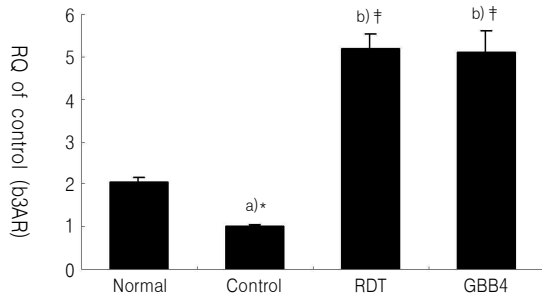


Fig. 12. Effects of GBB4 on the $\beta 3\text{AR}$ mRNA gene expression in adipose tissue in normal and obese mice fed high-fat diet

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg)

The results are represent the mean \pm S.E.

a) Statistically significant value compared with normal group ($* p < 0.05$)

b) Statistically significant value compared with control group ($\ddagger p < 0.001$)

2) Leptin 발현에 미치는 영향

정상군이 0.13±0.01 RQ로, 대조군이 1.01±0.01 RQ로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 유의성(p<0.001) 있게 증가하였으며, RDT 투여군에서 0.28±0.06 RQ, GBB4 투여군에서 0.37±0.07 RQ로 나타나 대조군에 비하여 유의성(p<0.001, p<0.01) 있게 감소하였다(Fig. 13).

13. 조직학적 변화

1) 지방조직에 미치는 영향

정상 adipose tissue에 비하여 고지방식으로 비만을 유도한 대조군은 adipocytes의 크기가 커졌으며, RDT 투여군과 GBB4 투여군에서는 대조군에 비하여 adipocytes의 크기가 작아졌다(Fig. 14).

2) 간조직에 미치는 영향

정상군에서는 간세포의 핵은 크고 대체로 둥글고 세포의 중앙에 위치하고 있으며, 간세포 사이사이에 쿠퍼세포도 전체적으로 고르게 퍼져 있다. 고지방식으로 비만을 유도한 대조군에서는 핵주위에 지방 공포가 관찰되고 공포로 인해 세포질안의 핵이 주변으로 밀려져 있듯이 보이고, 세포질 안에 여러 가지

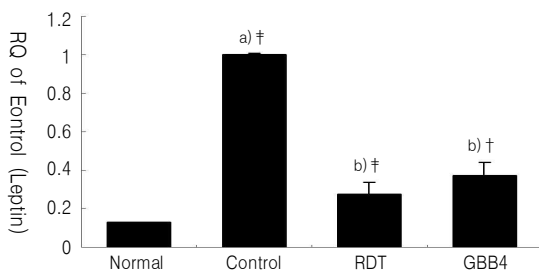


Fig. 13. Effects of GBB4 on the leptin mRNA gene expression in adipose tissue in normal and obese mice fed high-fat diet

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg)

The results are represent the mean±S.E.

a) Statistically significant value compared with normal group(‡p<0.001)

b) Statistically significant value compared with control group(‡p<0.001, †p<0.01)

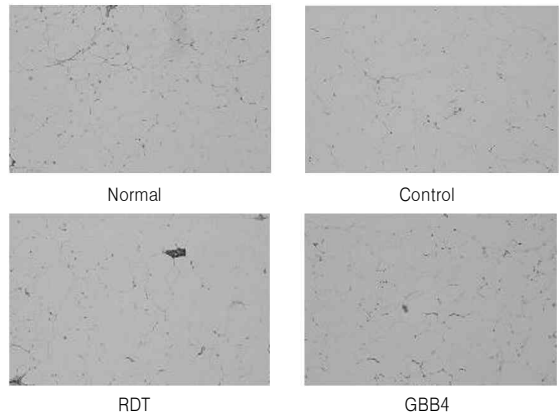


Fig. 14. Histological analysis of adipose tissue of normal and in obese mice fed high-fat diet

Adipose tissue were isolated from normal and in obese mice fed high-fat diet. mice. They were sacrificed, adipose was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope (Nikon, ×100).

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg)

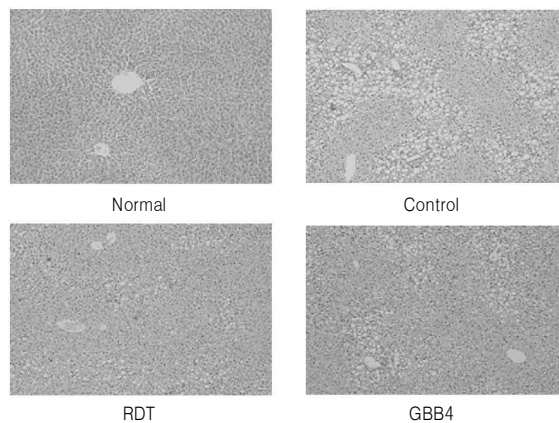


Fig. 15. Histological analysis of liver tissue of normal and in obese mice fed high-fat diet

Liver tissue were isolated from normal and obese mice fed high-fat diet. They were sacrificed, liver was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope (Nikon, ×100).

Normal : Normal diet group, Control : High fat diet group, RDT : High fat diet and Reductil(10 mg/kg), GBB4 : High fat diet and GBB4(330 mg/kg)

크기의 지방 공포가 관찰 되었으며, 또한 정상군에서 관찰되던 쿠퍼세포는 감소함을 볼 수 있다. 이에 반해 GBB4 투여군에서는 간세포 내 지방공포의 증가로 정상적인 간세포의 크기보다 커져있지만, 핵이 밀려있지 않으며, 대조군에 비하여 세포질간의 지방공포의 감소를 보였다(Fig. 15).

고 찰

최근 경제성장, 국민소득 향상과 더불어 식생활이 서구화됨에 따라 비만의 유병율이 점차 증가하고 있으며, 따라서 점차 심각한 보건 문제로 인식되고 있다. 특히 1995~2000년 사이에 한국인의 비만 유병률은 급격히 증가하고, 소아와 더불어 20~30대 연령층의 비만 인구가 매년 큰 폭으로 상승하여 적극적인 대처가 필요한 상황이다^{3,20}.

‘체내의 지방 조직량이 과잉으로 증가된 상태’라고 정의되고 있는 비만은²¹ 대사 장애로 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 말하는 것으로, 신체에 필요한 에너지보다 많은 칼로리가 축적되어 발생한다¹.

비만의 원인에 대하여 정확히 알려진 것은 없으나 운동부족이나 음식섭취 과잉 외에도 나이와 출산, 시상하부 손상으로 인한 식욕 및 신진대사와 자율신경의 조절장애, 약물, 유전, 사회경제적 원인 등으로 인하여 발생하며²², 일반적으로 지방조직의 형태에 따른 증식형, 비대형과 혼합형, 지방조직의 체내분포에 의한 내장지방형과 피하지방형, 비만의 시작 연령에 의한 소아, 사춘기, 중년, 노년의 비만 그리고 원인에 의한 원발성, 속발성 등의 기준으로 분류한다²³.

비만으로 인한 문제점으로는 Diehle²⁴이 언급한 용모손상(disfigurement), 불편감(discomfort), 비능률(disability), 질병(disease), 죽음(death)의 ‘5D 현상’ 외에도 고혈압, 동맥경화, 심근경색 등의 심혈관계 이상, 신장 장애, 당뇨병, 폐질환 등의 전신의 만성 질환에 대한 발생 빈도를 증가시킨다는 데 있다. 통계적으로 25~34세 젊은 연령대의 심한 비만환자 중 남자의 경우 사망률이 정상군에 비하여 12배 정

도 높게 나타나고, 주로 심혈관계 질환으로 인하여 사망한다고 한다²⁵.

한의학에서는 비만의 원인에 대하여 《素問·通評虛實論》⁶에서 “肥貴人 膏粱之質也”라 하여 처음 비만의 원인을 고량후미한 음식의 과식으로 언급하였으며, 張²⁶은 “肥者, 味厚助陽, 故生能熱”이라 하여 비만의 원인을 고량후미와 기허, 습체로 보았고, 李²⁷는 “脾胃俱實, 則能食而肥, 脾胃俱虛, 則不能食而瘦, 或少食而肥”, “人肥必氣結而肺盛, 肺金克肝木, 枯痰盛” 라하여 비만이 비위와 담음과 관련이 있음을 언급하였으며, 朱²⁸는 “肥人氣虛生痰 寒生濕 濕生痰 故肥多寒濕이라하여 기허습담이 원인이라고 하였다. 陣²⁹은 “肥人多痰, 乃氣虛也, 虛則氣不能運行, 故痰生之”를 이라 하여 비만과 기허, 담음의 관계에 대하여 설명하였으며, 《東醫寶鑑》³⁰에는 비만의 원인을 담음과 기허로 보고, 그 증상에 있어 담음이 있으면 장위에서 漉漉有聲하고, 기허하면 식사를 하면 갑자기 살이 찌는 차이가 있다고 하였다.

최근 비만 치료에 대한 사회적 관심이 높아짐에 따라 비만에 관련된 연구들이 다각도에서 활발하게 진행되고 있다. 서양의학에서는 비만세포의 생리나 유전학 등 기초과학 연구나 실험적 연구는 비교적 적은 반면에 주로 비만의 행동적 측면 및 예방, 소아 비만, 비만의 역학과 건강에 미치는 영향에 관한 연구들이 많이 이루어지고 있으며³¹, 한의학에서는 1990년대에는 주로 사상 처방^{32,33}과 五苓散³⁴, 防己黃芪湯³⁵ 등의 처방 효과에 대한 연구가 많이 이루어졌으며, 2000년 이후부터는 주로 四象處方 중 태음인 처방인 太陰調胃湯¹⁵, 調胃升清湯¹⁶과 體減薏苡仁湯¹⁶, 防風通聖散¹⁷ 등 다양한 처방의 비만치료 효과에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다¹⁸.

서양의학에서는 비만에 사용하는 치료법은 일반적으로 식사요법, 운동요법, 행동수정요법, 약물요법 등으로 고도 비만의 경우 약물요법, 수술요법 등을 사용한다³⁶. 약물요법의 경우 크게 지방축적을 억제하는 것과 지방 이용을 자극하는 것으로 나눌 수 있는데, 현재 미국 FDA에서 비만치료 약물로 승인을 받은 Sibutramine(Reductil)과 Orlistat(Xenical) 등은

열 발생을 일으키거나, 식이지방의 흡수를 저해하여 체중감량의 효과를 나타내지만 구갈, 불면, 기름변, 변실금, 복통 등의 부작용을 가지고 있다¹⁾. 본 실험에서 양성대조군으로 사용된 Sibutramine(Reductil)은 식욕억제제로서 체중감소의 효과가 복용기간 동안 지속되기는 하나 장기간 복용 시 우울증 및 고혈압, 당뇨 등의 부작용을 초래하거나 약물복용을 중단할 경우 요요현상 등의 부작용을 유발하기에³⁷⁾, 보다 효과적인 체중감량 뿐 아니라 부작용을 줄이기 위한 한약의 연구가 필요할 것을 생각되고 있다.

이에 저자는 임상적으로 脾虛濕痰型 비만에 활용하고자 減肥 4號方을 구성하여 실험적으로 연구하였으며, 본 처방은 麻黃, 薏苡仁, 蒼朮, 白茯苓, 豬苓, 木通, 澤瀉, 麥門冬, 天門冬, 石膏로 구성된다. 처방중 麻黃은 發汗散寒, 宣肺平喘, 利水消腫하고, 薏苡仁은 健脾滲濕, 除痺止瀉, 清熱排膿하고, 蒼朮은 燥濕健脾, 去風散寒하는 약물로 비만에 대한 효과^{10,11)}가 알려져 있으며 發散, 除濕과 健脾의 효능을 가진 세 약물을 군약을 하였다. 白茯苓은 利水滲濕, 健脾寧心하고, 豬苓은 利水滲濕하고, 木通은 行水, 通利血脈하고, 澤瀉는 利水滲濕, 泄熱하는 약물로 利水滲濕하여 체내의 정체된 濕痰을 제거하고자 하였다. 麥門冬은 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津하고, 天門冬은 滋陰, 潤燥, 清肺, 降火하는 약물로 益胃生津, 清熱하여 利水효과로 인하여 체내의 진액이 고갈되는 것을 막고자 하였으며, 石膏는 清熱, 除煩止瀉하는 약물로 濕痰이 울체되어 발생할 수 있는 열을 방지하고자 하였다³⁸⁾.

다만 마황의 경우, 미국 식품의약국(FDA)에서 주성분인 ephedrine이 함유된 건강 보조제들에 대하여 떨림증, 두통, 뇌졸중, 심근경색, 가슴통증, 발작, 불면증, 등 800여건의 부작용을 보고하여 사용제한을 권유하였으나 이에 대한 증거 불충분으로 기각된 사례 등을 미루어 볼 때 이에 대한 안정성 검사도 또한 필요하리라 보인다. 본 논문에서는 첩당 20g의 양을 사용하였는데, 최근 최³⁹⁾ 및 장⁴⁰⁾의 논문에서 2주간의 경구 투여 시 5000mg/kg, 4주간의 경구 투여 시 2000mg/Kg까지 사용 시 이상이 없었다는 보

고 있어 충분히 처방할 수 있는 양이라 생각하였고, 안정성 확인을 위한 실험도 시행하였다.

그리하여, GBB4의 비만에 대한 효과를 검토하고자 고지방 사료의 섭취로 유발된 비만생쥐를 이용하여 체중과 간 무게의 변화, 혈액학적 변화, 비만 유전자의 발현, 조직학적인 변화 등을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

먼저 GBB4의 투약에 의한 hFCs에서의 세포독성을 관찰한 결과, 대조군의 세포생존율 100±1.4 (%)로 나타난 반면, GBB4의 500, 250, 125, 62.5, 31.25 (μg/ml) 농도에서는 각각 85.8±2.4, 87.4±4.3, 90.4±6.4, 94.0±3.5, 101.4±2.7로 나타났으며 대조군과의 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않아 약물로서 사용이 적합함을 알 수 있다.

GBB4이 체중에 미치는 영향을 보면 정상군의 체중 변화는 8주째에 23.5±1.3 g으로 큰 변화가 없었고, 대조군은 지속적인 증가하여 8주째에는 36.0±1.7 g이 되었다. 이에 비해 RDT 투여군과 GBB4 투여군은 3주째까지 동일한 양상으로 증가하였으나 RDT 투여군은 이후 지속적으로 증가하여 8주째에는 32.8±1.2 g이 되었고, GBB4 투여군은 4주째부터 체중이 감소, 7주째부터 유의성 있는 체중감소를 보여 GBB4이 체중조절에 효과적임을 알 수 있으며 복용 4주 이상이 지난 후 부터 체중조절 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

고지방식이를 지속할 경우 지방조직으로부터의 지방 이동이 증가되어 간에 침착되므로 간의 중량이 증가하게 되는데⁴¹⁾, 본 실험에서는 각 군의 간 무게를 측정해본 결과, 정상군이 1.10±0.20 g, 대조군이 1.34±0.1 g으로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 증가하였으나, RDT 투여군은 1.22±0.19 g으로, GBB4 투여군은 1.13±0.15 g으로 나타나 대조군에 비하여 감소하여(Fig. 2), 통계적 유의성은 보이지 않았으나, GBB4 투여를 통하여 간조직으로의 지질 침착이 호전되었음을 알 수 있었다.

Adipocyte는 지방세포로 체내 에너지 항상성 유지를 위하여 중성지방의 저장과 필요한 곳으로의 공급을 담당하며, 체지방 조절 기능을 가지고 있는

leptin 등의 신호 전달 물질과 호르몬을 생성, 분비함으로써 체내 에너지 대사를 능동적으로 조절해나가는 역할을 하는 세포로 체중변화와 비만의 지표로서 의미가 있다^{21,42)}. 체내 adipocyte 무게를 측정해본 결과, 정상군이 0.30 ± 0.11 g, 대조군이 3.69 ± 0.37 g으로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, RDT 투여군이 3.36 ± 0.61 g, GBB4 투여군은 1.59 ± 0.01 g으로 나타나 대조군에 비하여 GBB4 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였으며, RDT 투여군에 비하여도 상대적으로 양호한 결과를 보이고 있다. 이를 볼 때, GBB4이 고지방식이로 인한 지방세포의 증가를 효과적으로 억제하고 있으며, Reductil보다 효과적임을 알 수 있었다(Fig. 3).

혈중 glucose는 혈액에서 당의 공급과 소비로 조절되는⁴³⁾ 인체의 중요한 에너지원으로 자율신경과 각종 호르몬이 밀접하게 관련되어 조절된다⁴⁴⁾. 임상적으로 고혈당은 당뇨병, 비만, 갑상선 기능항진증, 췌장질환, 뇌출혈, 임신 등으로 발생한다⁴⁵⁾.

본 실험에서 혈중 glucose의 변화는 정상군이 154.5 ± 12.0 mg/dl, 대조군이 270.5 ± 53.0 mg/dl로 나타난 반면, RDT 투여군은 189.0 ± 11.3 mg/dl, GBB4 투여군은 198.0 ± 1.4 mg/dl로 유의성 있게 감소하여(Fig. 4), 위의 결과로 유추하여 볼 때 GBB4이 glucose의 세포내 유입 및 glycogen의 합성을 촉진하여 glucose의 합량을 감소시키는 것으로 생각되며, 이는 비만으로 인한 고혈당에도 GBB4이 효과적이라는 것을 보여주는 결과라 할 수 있다.

또한 본 실험에서는 비만 정도에 의한 혈청 지질의 변화를 관찰하고자, 혈청 중 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride의 변화를 측정하였다.

Total cholesterol은 혈청 수치가 높은 경우 동맥경화증, 뇌혈관 질환, 내분비계 질환, 소화기계 질환, 암종의 증가, 허혈성 심질환을 일으키는 독립적인 원인이 되기도 하는 지질로, 비만에서는 주로 LDL-cholesterol과 더불어 증가한다⁴⁶⁾. 그러나 LDL-cholesterol은 연령을 고려하면 정상인 경우도 있기 때문에 특이성이 다소 떨어지나, total cholesterol 함량은 비만

에서 유의한 의미를 가지고 있다⁴⁵⁾.

본 실험에서 total cholesterol은 정상군이 97.5 ± 0.7 mg/dl로 나타난 반면, 대조군은 161.0 ± 28.3 mg/dl로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, 이에 비해 RDT 투여군은 148.5 ± 13.4 mg/dl, GBB4 투여군에서는 143.0 ± 0.0 mg/dl로 대조군에 비하여 감소를 나타내 GBB4이 total cholesterol의 조절에 효과적으로 볼 수 있으나 유의성은 보이지 않았다(Fig. 5).

지단백질에 의한 지질의 수송에 LDL-cholesterol과 HDL-cholesterol이 관여한다. HDL-cholesterol에 의한 cholesterol의 제거보다 LDL-cholesterol로부터의 cholesterol 섭취가 많을 때, 동맥의 혈관내막에서 지방 선조의 형태로 비정상적인 지질침착이 일어나므로 죽상경화증이 발생한다. 따라서 LDL-cholesterol의 혈장 내 농도 증가는 비정상적인 지질 침착형성과 죽상경화증의 발생 위험 인자이며, 반대로 HDL-cholesterol은 이로부터 조직을 보호하는 인자로서의 의미를 가지고 있다⁴⁶⁾. 양 등⁴¹⁾은 비만지수가 높으면 혈청 중 HDL-cholesterol 함량이 감소되므로 HDL-cholesterol의 변화는 비만 여부를 판별할 수 있는 중요한 근거가 된다고 하였다.

LDL-Cholesterol 변화는 정상군이 9.8 ± 0.1 mg/dl, 대조군이 24.6 ± 1.1 mg/dl로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, RDT 투여군은 18.3 ± 1.9 mg/dl, GBB4 투여군은 19.4 ± 1.0 mg/dl로 나타나 유의성 있게 감소하였고(Fig. 6), HDL-Cholesterol은 정상군이 56.2 ± 0.4 mg/dl, 대조군이 76.2 ± 0.6 mg/dl로 나타나 대조군이 정상군보다 유의성 있게 증가하였고, RDT 투여군은 89.7 ± 3.7 mg/dl, GBB4 투여군은 87.1 ± 4.3 mg/dl로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 7).

그러므로 GBB4는 비만에 대한 치료 뿐 아니라 비만으로 인한 동맥경화증 또한 예방할 수 있는 것을 생각된다. 다만 HDL-cholesterol의 경우 비만에서 HDL-cholesterol의 수치가 감소하는 것이 일반적이거나 대조군에서는 실험기간이 8주로 짧아 total cholesterol과 같이 상승한 것으로 사료된다.

Triglyceride은 대사 에너지원의 주공급원으로 지방조직에 저장되어 있다가 필요한 경우 지방산으로 유리되어 생체의 에너지 공급원으로 분해되는 것으로⁴⁷⁾, triglyceride의 증가는 임상적으로 죽상경화증, 관상동맥질환 등과 밀접한 관계가 있으며, 비만지수가 높으면 혈청 중 triglyceride 함량이 증가하는 것으로 밝혀져 혈청 중 triglyceride의 변화는 total cholesterol과 더불어 비만의 유무를 판단할 수 있는 근거가 된다^{41,49,54)}.

본 실험에서 triglyceride 변화는 정상군이 26.5 ± 0.7 mg/dl, 대조군이 42.0 ± 2.8 mg/dl로 나타나 대조군이 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, RDT 투여군은 24.5 ± 2.1 mg/dl, GBB4 투여군은 24.5 ± 2.1 mg/dl로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하여 GBB4가 비만에 효과적임을 알 수 있다(Fig. 8).

위의 혈액학적 분석 결과를 볼 때 GBB4은 비만의 치료에 유의하게 사용될 수 있을 뿐 아니라, 비만으로 인한 당뇨병, 고지혈증, 죽상경화증 등의 대사증후군에도 효과적임을 알 수 있다.

Leptin이란 식품섭취와 에너지 균형의 변화를 통하여 체지방을 조절하는 기능을 가지고 있어²¹⁾, 영양 상태에 비례하여 지방세포의 비만 유전자에서 생성 분비되어 뇌의 시상하부에 있는 포만중추를 자극하는 식욕조절 인자로, 발열 반응과 활동량을 증가시키고 섭취량을 감소시켜 체중 및 식욕을 조절함으로써 비만을 억제하고, 체중과 체지방량을 감소시키는 역할을 한다^{49,50)}. Fredrich 등⁵¹⁾과 Masuzaki 등⁵²⁾의 연구에 따르면 고지방식이로 비만을 유도한 후의 혈중 leptin 농도는 증가하고, 절식을 하면 증가된 혈중 농도는 다시 감소함으로써 지방조직이 많을수록 순환하는 leptin의 양이 많아진다는 상관성이 증명되어 혈청 leptin은 비만의 지표로서 의미를 가지고 있다²¹⁾.

혈청 내 leptin 변화는 정상군이 0.09 ± 0.02 OD, 대조군이 1.91 ± 0.32 OD로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있게 증가하였으며, RDT 투여군은 1.97 ± 0.06 OD, GBB4 투여군은 1.56 ± 0.14 OD로 나타나 대조군에 비하여 GBB4 투여군에서 유의성

있게 감소하여(Fig. 9), GBB4가 수용체의 활성화, 또는 민감도를 증가시켜 leptin의 작용을 활성화 시킨 것으로 이해할 수 있다.

β 3AR는 주로 갈색지방세포에 존재하며, 피하지방보다 내장지방 조직에서 더 많이 발견되는 유전자로 아드레날린성 신호에 의해 활성화 되어 세포내 c-AMP가 증가하여 지방분해와 열 발생을 일으키고, 유전자 변이 발생 시 비만을 유발할 수도 있다고 알려져 있으며⁵³⁾, ob mRNA의 발현을 억제하고, 지방세포의 크기나 분포 및 비만 방지 호르몬으로 알려진 leptin의 분비에 관여하기 때문에 비만을 조절하는 유전자로 알려져 있다^{21,52)}.

3T3-L1 adipocytes에서 유전자를 발현시켜 보았을 때, β 3AR 발현은 정상군이 0.75 ± 0.14 RQ, 대조군이 1.01 ± 0.01 RQ로 나타난 것에 비하여, GBB4 100, 50 μ g/ml 농도 투여군은 각각 2.03 ± 0.19 RQ와 1.60 ± 0.12 RQ로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며(Fig. 10), leptin 발현은 정상군이 0.27 ± 0.07 RQ, 대조군이 1.00 ± 0.02 RQ로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 증가를 나타낸 것에 비하여, GBB4 100, 50 μ g/ml 농도 투여군은 각각 0.56 ± 0.07 RQ와 0.71 ± 0.04 RQ로 나타나 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

Adipose tissue에서 비만유전자로 알려진 β 3AR mRNA 유전자 발현은 정상군이 2.05 ± 0.13 RQ로, 대조군이 1.02 ± 0.03 RQ로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, RDT 투여군에서 5.20 ± 0.33 RQ, GBB4 투여군에서 5.11 ± 0.51 RQ로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며(Fig. 12), leptin mRNA 유전자 발현은 정상군이 0.13 ± 0.01 RQ로, 대조군이 1.01 ± 0.01 RQ로 나타나 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, RDT 투여군에서 0.28 ± 0.06 RQ, GBB4 투여군에서 0.37 ± 0.07 RQ로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 13).

위의 실험결과를 볼 때, GBB4은 3T3-L1 adipocytes 과 adipose tissue에서 β 3AR의 발현을 증가시키고, leptin의 발현을 감소시킴으로서 지방대사에 관여하

여 비만치료에 농도 의존적으로 효과적임을 알 수 있다.

지방조직은 지방을 포함하는 지방세포와 기질로 구성되며 기질 내에 지방세포의 전구체가 존재한다. 지방조직은 지방세포의 크기가 커지거나 지방세포의 수가 많아지면서 증가하게 되는데, 지방세포는 비만한 쥐나 고지방사료를 섭취한 쥐에서 수나 크기가 증가한다^{45,54}.

본 실험에서 adipocyte의 크기를 비교하여 보면 정상 adipose tissue에 비하여 고지방식으로 비만을 유도한 대조군은 adipocytes의 크기가 증가하였으며, RDT 투여군과 GBB4 투여군에서는 대조군에 비하여 크기가 감소하였는데(Fig. 14), 이는 GBB4 투여가 비만으로 인한 지방 세포의 크기 증가를 억제하는 효과가 있는 것으로 생각해 볼 수 있다.

또한 간의 조직학적 변화를 살펴보면 정상군에서는 간세포의 핵은 크고 대체로 둥글고 세포의 중앙에 위치하고 있으며, 간세포 사이사이에 쿠퍼세포도 전체적으로 고르게 퍼져 있으나, 고지방식으로 비만을 유도한 대조군에서는 핵주위에 지방 공포가 관찰되고 공포로 인해 세포질안의 핵이 주변으로 밀려져 있는 것처럼 보이고, 세포질 안에 여러 가지 크기의 지방 공포가 관찰 되었으며, 또한 정상군에서 관찰되던 쿠퍼세포는 현저히 감소되었음을 알 수 있다. 이에 반해 GBB4 투여군에서는 간세포 내 지방공포의 증가로 정상적인 간세포의 크기보다 커져있지만, 핵이 밀려있지 않고 대조군에 비해 지방공포가 감소하여(Fig. 15), 고지방 사료로 비만을 유발한 생쥐에게 GBB4을 투여하여 커진 간조직의 지방공포에서 정상군과 유사한 지방공포의 형태로 간 조직 내의 효과적인 변화가 일어난 것으로 생각된다.

이상의 결과를 살펴보면 고지방 사료의 섭취로 유도된 비만 생쥐에서 減肥4號方을 투여하여 체중의 변화, 혈액학적 지표, 비만유전자의 발현, 조직학적인 변화를 관찰하여 비만치료에 유의성 있는 성적을 얻었으나 다만, 실험의 개체가 각 6마리로 많지 않았던 점과 약물투여 기간이 8주로 짧은 점이 본 연구의 제한점으로 생각되며 향후 이러한 문제점을

보안한 연구와 임상에의 활용이 병행되어야 할 것으로 생각한다.

결론

減肥 4號方이 비만에 미치는 영향을 알아보고자, 고지방 사료의 식이로 비만이 유발된 생쥐를 이용하여 체중의 변화, 혈액학적 변화, 비만에 관여하는 유전자의 발현, 조직학적인 변화 등을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중, 체내 adipocyte 중량, Glucose은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.
2. 대조군에 비하여 Total cholesterol은 감소하였으며, LDL-cholesterol 와 triglyceride는 유의성 있게 감소하였고, HDL-cholesterol은 유의성 있게 증가하였다.
3. 혈청 내 leptin은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.
4. 3T3-L1 adipocytes와 Primary adipose cell에서 β 3AR 발현은 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, leptin 발현은 유의성 있게 감소하였다.
5. 대조군에 비하여 Adipocytes의 크기는 작아졌으며, 간 조직은 지방공포가 감소하였다.

이상의 결과에서 減肥 4號方은 비만 유전자의 발현 변화를 유도하여 체중감소, 혈청 중의 비만지표 및 조직학적 구조 등을 유의하게 변화시켜 비만을 억제함을 실험적으로 규명한 것으로, 향후 추가적인 연구를 통하여 임상에의 활용이 기대된다.

참고문헌

1. The Korean Academy of Oriental Rehabilitation Medicine. Oriental Rehabilitation Medicine. Seoul, Koonja. 2005:384-96.
2. Medicine Education Training Institute. Family Practice. Seoul, Publishing department of Seoul University. 2003:1011.

3. Ministry of Health and Welfare. Medical Examination Research. 2005 Korean National Health Examination Nutrition Survey. 2006:38-44.
4. Misra A. High prevalence of diabetes, obesity and dyslipidemia in urban slum population of northern India, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002;26(9):1281.
5. Park HS. Pathophysiology of obesity and energy control for obesity treatment. *The Journal of the Korean Academy of Family Medicine.* 2001;22(8):1287-95.
6. 楊維傑. 黃帝內經釋解. Seoul, Seongbosa. 1980: 235-43,303-9,412-8.
7. Lee SJ, Kim SH. Literatural Study on Concept of Obesity and Diagnosed and Treatment. Institute of Oriental Medicine Daejeon University. 1998:523.
8. Shin HD. Obesity in Oriental Medicine Mechanism and Treatment. Proceedings of the EASDL Conference. 2005:1-15.
9. Moon JS, Kang BK, Choi SM, Ryu EK. A Study of Syndrome Index Differentiation in Obesity. *Journal of Korean oriental association for study of obesity.* 2007;7(1):55-69.
10. Yeo JJ, Hyung CL, Yang CS, Jeong SI, Seo ES, Jang IS. Effects of Mahuang for Weight Loss in Healthy Adults : A Double-Blind, Controlled, Randomized, Clinical Trial . *Journal of Korean oriental Medicine.* 2007;28(1):63-71.
11. Youn DH, Kang JD, Joo JS, Chae WS, Na CS. Effects of herbal acupuncture(*Atratyloides japonica*, *Coix lachrymajobi*, *Ephedra sinica*, *Atratyloides japonica* mixed with *Coix lachrymajobi* and *Ephedra sinica* mixed with Green tea) at Pungnyung (ST40) and Umnungchon(SP9) in obese Rats induced by high fat diet. *Journal of Korean Institute of Herbal Acupuncture.* 2004;7(1):87-100.
12. Kim SJ, Kim HJ, Ko BP, Kim HD, Kim JA, Park JM, et al. Effect of *Ephedra Sinica* and *Evodia Rutaecarpa* on Resting Metabolic Rate in Obese Premenopausal Women during Low-calorie Diet: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Korean oriental association for study of obesity.* 2004;4(1):45-54.
13. Cho KH, Seo BI, Lee ES, Park JH. The effects of *Artemisiae Iwayomogi Herba* on rats fed high fat diet . *Korean journal of herbology.* 2003;18(3):57-67.
14. Jang YJ, Cho JH, Song BJ. Effect of *Taeyumjowee-Tang* and Electroacupuncture Combined-therapy on. *Journal of Korean oriental association for study of obesity.* 2001;1(1):1-11.
15. Shin MS, Choi JB. The Effects of *Choweseungchengtang* and *Choweseungchengtanggamypang* on the Change of Weight and Serum in Mice Fed High Fat Diet. *J Oriental Rehab Med.* 2002;12(1):157-66.
16. Kim KS, Kim SM. Effect of *Chegamuiyiin-tang* and Electro-lipolysis Acupuncture on the Reduction of Body Fat. *Journal of Korean oriental association for study of obesity.* 2002;2(1):3-24.
17. Bae JH, Chung SH, Lee JS, Kim SS, Shin HD. Clinical Study on the Efficacy of *Yanghae* (Bangpung tongseoung -san) in the Treatment of obesity. *J Oriental Rehab Med.* 2003;13(1):37-46.
18. Hwang MJ, Song MY, Shin HD. Literature Review of Herbal Medicines on Treatment of Obesity Since 2000;Mainly about *Ephedra Herba*. *Journal of Korean oriental association for study of obesity.* 2007;7(1):39-54.
19. Jung YS, Choi SB, Kim H, Shin SS. The effects *GyeongshinhaeGihwan 1(GGT1)* has on the hGHTg (human growth hormone transgenic) obese male rats' body weight and their amount of feed intake. *Kor. J. Herbology.* 2006;21(1):1-7.
20. Kim TH, Yoo K. Obesity and Fatty Liver Disease. *Journal of Korean Internal Medicine.* 2005;48(4):347-9.
21. Korean Society for the Study of Obesity. Clinic

- obesity(2). Seoul, Korean Medical Book Publishing company. 2001:41-7,76-81,151-2.
22. Sung YS. Considerable Causes of Obesity. Journal of the Korean Society of Biological Therapies in Psychiatry. 2002;8(2):218-24.
 23. Korean endocrine Society. Recent advances in internal medicine. Seoul, Medical Publishing company. 1995:97-109.
 24. Diehle HS, Darlynple W. Healthful Living: Obesity and Digestive disorders and disease. 9th ed. New York. McGraw-Hill. 1973:434-5.
 25. The Korean Academy of Oriental Rehabilitation Medicine. Oriental Rehabilitation Medicine. Seoul, Soewondang. 1995:571-81.
 26. 張介賓. 張氏類經. Seoul, Seongbosa. 1982:586.
 27. 李東垣. 東垣醫書十種(脾胃論). Seoul, Daesung Publishing company. 1983:70.
 28. 朱震亨. 丹溪心法附餘(上). Seoul, Daesung Publishing company. 1982:889.
 29. 陳士鐸. 石室秘錄. Seoul, Hanglimseowon. 1988:76.
 30. 許浚. 東醫寶鑑. Seoul, Namsandang. 1992:477.
 31. Tak YJ, Lee YS, Lee JS, Kang JH. The Trend of Obesity-related Researches in Korea: from 1984 to 2002. Journal of Korean oriental association for study of Obesity. 2004;13(1):1-13.
 32. Youn BJ. Experimental Studies on the Effects of Taeumin Chungpaesagan-tang. Journal of Constitutional Medicine. 1990;2(1):135-47.
 33. Park JH, Jeon BH, Kim KY. Effects of Ryangk-eogsanwhatang on the Adipocyte induced by Gold thioglucose in the Rat. Journal of Korean oriental Medicine. 1996;17(2):145-60.
 34. Lim HH, Lee JS, Kim SS, Shin HD. Effects of Oryungsan on the histological change in liver and epididymal fat and the biochemical changes of lipid metabolism and urine home changes in obese rats induced by fat diet. J Oriental Rehab Med. 1998;8(2):16-22.
 35. Song YS. Effects of Bangkihwangkitang(防己黃芪湯), Bangkihwangkitang with Lycii fructus and Lycii fructus on the Weight of Obese Rats. J Oriental Rehab Med. 1991;1(1):25-42.
 36. Chae YH. Obesity. Seoul, Shin Won Book. 2004:15-44.
 37. Padwal RS, Majumdar SR. Drug treatment for obesity: orlistat, sibutramine and rimonabant, Lancet. 2007;369:71-7.
 38. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. Seoul, Young Lim Sa. 1991:121-3,160,289-90,302-7,315,588-90.
 39. Chang MS, Sim KJ, Oh JH, Yoon JW, Choi MJ, Kim DR, et al. Acute Oral Toxicity of Ephedrae Herba in SD Rats. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(4):722-725.
 40. Choi DG, Shim KJ, Choi BJ, Park ST, Chang MS, Park SK. Subacute Oral Toxicity of Ephedrae Herba Extract in SD Rats. Kor. J. Herbology. 2008;23(4):1-7.
 41. Yang JH, Kim SS, Lee JS, Chung SH. The Study for the Prohibitive Effect of SBY-III on Obesity Formation. J Oriental Rehab Med. 2004;14(2):55-74.
 42. Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus : novel peptide for new pathwars. Cell. 1998;92:437-40.
 43. Lee GN, Gun OH. Clinical pathology file(third). Seoul: Medical Pub. 2003:125-30,169-85,334-7,367-70.
 44. Lee SU, Jeong YS, Gun OH, Song KS. Laboratory Methods in Clinical Pathology. Seoul: Yonsei Pub. 2000:224-30,262-6,303-9.
 45. Harrison Translate History Committee. Harrison's internal medicine. Seoul: Pub MIP. 2006:456-63.
 46. Kim HJ, Kim CW, Kim KC, Jeon IS, Seo HG. The relationship between serum cholesterol level and dietary patern. The Journal of Family Practice. 1996;17(10):861-8.
 47. Korean Society of clinical pathology. Clinical pathology. Seoul: Korea Medical Bokk. 2001:63-4.

48. Tulenko TN, summer AE. The physiology of lipoproteins. *J Nucl Cardiol.* 2002;9(6):638-49.
49. Behme MT. Leptin : Product of the obese gene. *Nutr Today.* 1996;31:138-41.
50. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive leptin concentration in normal weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1996;334:292-5.
51. Fredrich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice, Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Med.* 1995;1(12):1311-4.
52. Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Kawada T, Fushiki T, Nakao K. Augmented expression of the obese gene in the adipose tissue from rats fed high-fat diet. *Biochem Biophys.* 1999;140:35-42.
53. Clement K, Vaisse C, Manning B, Basdevant A, GuyGrand B, Ruix J, Silver KD, Shuldiner AR, Froguel P, Sroberg AD. Genetic variation in the β -adrenergic receptor and increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *New Engl J med.* 1995;333:352-4.
54. Han JS, Han YB. The Effect of High Fat Diet and Dietary Fiber on Adipocyte of Epididymal Fat Pads in Rats . *The Korean journal nutrition.* 1994;27(2):118-26.