

*본 논문은 연구부정행위(중복게재)가 확인되어 게재가 철회된 논문임.

고지방식이 마우스 비만모델에서 감비경신환(4)에 의한 체중감량과 간 지방축적의 변화

이혜림 · 안예지 · 이희영 · 이형희¹ · 김동여¹ · 윤미정¹ · 이용태² · 신순식*

동의대학교 한의과대학 방제학교실 및 한방당뇨비만연구소, 1: 목원대학교 바이오건강학부, 2: 동의대학교 한의과대학 생리학교실

Gambigyeongsinhwan(4) Reduces Body Weight and Hepatic Lipid Accumulation in High Fat Diet-Fed Obese Male C57BL/6N Mice

Hye Rim Lee, Ye Ji Ahn, Hee Young Lee, Hyung Hee Lee¹,
Dong Yeo Kim¹, Mi Chung Yoon¹, Yong Tae Lee², Soon Shik Shin*

*Department of Formula Science and Research Institute of Korean Medicine for Diabetes and Obesity,
College of Korean Medicine, Dongeui University.*

1: Department of Life Sciences, Mokwon University, 2: Department of Oriental Physiology, College of Korean Medicine, Dongeui University

We investigated the effects of gambigyeongsinhwan(GGH)(4) on body weight and non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD) examined whether blood total cholesterol, LDL-cholesterol, free fatty acid and triglyceride levels and hepatic lipid accumulation are inhibited by it in high fat diet-fed obese male mice. 8 weeks old, high fat diet-fed obese male mice were divided into 5 groups: C57BL/6N normal, control, GGH(4)-1, GGH(4)-2 and GGH(4)-3. After mice were treated with GGH(4) for 8 weeks, we measured body weight gain, food intake, feeding efficiency ratio, fat weight, plasma ALT, leptin and lipid levels. We also did histological analysis for liver and fat on the mice. Compared with controls, GGH(4)-treated mice had lower body weight gain and adipose tissue weight, the magnitudes of which were prominent in GGH(4)-2. Compared with controls, GGH(4)-treated mice had lower feeding efficiency ratio and blood leptin level, the magnitudes of which was prominent in GGH(4)-2. Compared with controls, GGH(4)-treated mice had lower blood plasma total cholesterol, LDL-cholesterol, free fatty acid and triglyceride levels. Compared with controls, GGH(4)-2 treated mice had lower blood plasma ALT concentration. Consistent with their effects on body weight gain, the size of adipocytes were significantly decreased by GGH(4), whereas the adipocyte number per unit area was significantly increased, suggesting that GGH(4) decreased the number of large adipocytes. Hepatic lipid accumulation was decreased by GGH(4). In conclusion, these results suggest that GGH(4) exhibits anti-obesity effects through the modulation of feeding efficiency ratio and plasma obesity parameters. Moreover, it seems that GGH(4) also contributes to improve NAFLD through the regulation of plasma ALT and hepatic triglyceride accumulation.

Key words : gambigyeongsinhwan(4), GGH(4), body weight gain, NAFLD, triglyceride, ALT

서 론

비알콜성 지방간(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 전 세계적으로 만성 간질환의 가장 흔한 원인 중의 하나이며, 간질환의 다른 원인에 대한 증거가 없이 전체 간세포의 5% 이상

* 교신저자 : 신순식, 부산 부산진구 양정2동 산45-1, 동의대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2013/02/06 · 수정 : 2013/02/13 · 채택 : 2013/02/20

이 지방으로 침착되어 있고 하루 20 g 미만의 알코올을 섭취할 경우를 말한다¹⁾. 한국 성인의 NAFLD의 유병률은 2004년 11.5%에서 2010년 23.6%로 두 배 정도 증가하여 미국 및 유럽의 성인 유병률 16-25%와 유사하다²⁾. 그 발병기전이 인슐린저항성과 연관되어 있으므로 비만 인구의 95%, 당뇨병 인구의 75%에서 NAFLD를 가지고 있다³⁾. NAFLD는 대사증후군과 밀접한 연관성이 있으며 대사증후군의 각 component들과도 연관성이 다 있다^{4,5)}. 따라서 지방간 질환의 진행, 심혈관질환의 악화 등^{6,7)}에 의

한 유병률, 사망률을 억제하기 위해 비알콜성 지방간의 적절한 치료는 꼭 필요하다고 생각된다.

鬱金(*Curcuma longa* L.)은 그 氣味가 辛苦, 寒하며 그 歸經은 肝, 心, 肺, 膽이다⁸⁾. 여기에는 curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, cineole, terpinene, caryophyllene, curcumene, zingiberene, cricumol, curcoline C, turmerone, ar-turmerone, germacrone, curdione 등이 들어 있다⁹⁾. 清心解鬱의 효능이 있어 심허혈을 예방하고 혈관 확장 및 혈전형성의 예방에 관여하며, 行氣, 活血, 化痰 효능이 있어 지질대사를 개선하고 위산분비를 촉진하고 진통작용이 있으며, 利膽退黃 효능이 있어 간보호, 항염작용, 면역억제작용, 항산화작용을 하고, 그밖에 항알러지작용이 있는 것으로 알려져 있다⁸⁾.

赤楊(*Alnus japonica* Steude)은 그 氣味가 苦澁, 涼하고 그 歸經은 肺, 心, 脾經이다^{10,11)}. 여기에는 lupenon, α-amyrin, β-amyrin, glutin-5-en-3-ol, taraxerol, betulinic acid 등 triterpenoid 화합물, β-sitosterol, heptacosane, aliphatic alcohol, pyrocatechol계 탄닌 등¹¹⁾이 들어 있다. 清熱降火¹⁰⁾와 收斂止血¹²⁾의 효능이 있어 鼻衄, 便血, 外傷出血, 腸炎 및 水瀉 등¹³⁾을 치료하고, 민간에서는 酒毒이나 酒傷을 치료하는데 많이 활용한 것으로 알려져 있다¹⁴⁾.

神麴(*Massa Medicata Fermentata*)은 그 氣味가 甘辛, 溫하고 그 歸經은 脾, 胃經이다. 여기에는 yeast, amyolytic enzyme, vitamin B 복합체, ergosterol, 단백질, 지방 및 휘발유 등이 들어 있다. 消食化積과 健脾和胃의 효능이 있어 飲食停滯, 消化不良, 脘腹脹滿, 食慾不振과 嘔吐瀉痢를 치료하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

비만은 일반적으로 지질대사 불량과 식욕증진을 쉽게 동반한다는 임상적 특성을 고려하여 울금이 가지는 지질대사 개선, 식욕억제, 간의 지방대사 개선효과에 적량과 신곡이 가지는 지질대사 개선, 식욕억제와 간의 지방대사 개선효과가 추가될 경우의 이점까지도 고려하여 울금, 적량과 신곡을 배합한 비만조절 및 개선제로서 적용가능성에 의하여 체중감량에 사용될 수 있을 것으로 생각되고 임상에서도 사용되고 있는 바 이를 실험적으로 검증하고자 본 연구를 진행하였다. 본 연구에서는 8주령의 고지방식이 유발 수컷 마우스 비만모델을 이용하여 감비경신환(4)의 투여가 체중 증가량, 식이효율, 혈중 비만조절 관련 지표와 독성 지표, 지방조직의 무게는 어떻게 변화하는지, 특히 지방간의 개선에는 어떤 영향을 주는 지에 대해서 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

공시동물로서는 KOATECH(Gyeonggi province, South Korea)에서 공급한 8주령의 C57BL/6N 수컷 마우스 45마리를 사용하였다. 각 군 당 9마리를 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 군 분리를 실시하고, 이를 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. 고행사료 (Harlan, USA)와 물은 자유 급이와 급수를 시켰다.

2) 실험물질

실험물질은 울금, 적량과 신곡의 복합처방을 구성하여 減肥輕身丸(4)(gambigyeongsinhwan4, GGH(4))라고 명명하였다. GGH(4)의 95% 에탄올 추출물을 사용하여 다음과 같이 제조하였다(Table 1).

(1) GGH(4)의 조성약물은 화림제약(Busan, South Korea)에서 구입하고, 동의대학교 한의과대학 방제학교실에서 정선한 뒤 분말하였다.

(2) 분쇄한 GGH(4)(1 kg)을 95% 에탄올로 70℃에서 180분간 초음파 추출하고 No2 필터로 여과하여 농축하였다.

(3) 농축하여 35.91%의 수율을 얻었다.

대조물질은 autoclaved water(멸균수)를 사용하였다.

3) 실험군 및 투여방법

군당 9마리 수컷을 공시하였으며, GGH(4)를 125, 250, 500 mg/kg의 농도별로 8주간 경구 투여하였다(Table 2).

Table 1. The composition of GGH(4)

한약명	Ingredient	%
鬱金	Turmeric Root-tuber	60
赤楊	Japanese alder	20
神麴	Medicated Leaven	20
Total amounts		100

Table 2. Experimental groups

Group	Treatment	Number	Sex
Normal	Low fat	9	male
	High fat(45 kcal%) + GGH(4)(mg/kg BW)		
Control	water	9	male
GGH(4)-1	125	9	male
GGH(4)-2	250	9	male
GGH(4)-3	500	9	male

2. 연구방법

1) 체중 증가량 측정

GGH(4)-1, GGH(4)-2와 GGH(4)-3이 체중 증가량에는 어떤 변화를 주는지 알아보기 위하여 매주 2회 8주 동안 체중을 측정하고, 이를 근거로 하여 체중 증가량을 계산하였다.

2) 식이효율 측정

GGH(4)-1, GGH(4)-2와 GGH(4)-3이 식욕과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 체중은 매주 2회, 사료섭취량은 매주 1회 8주 동안 측정하였고, 이를 근거로 하여 식이효율을 계산하였다.

3) 혈액생화학 분석

혈액 채취는 실험시작 8주 후 12시간 절식한 뒤 diethyl ether로 마취한 다음 개복하여 복대정맥에서 혈액 1 mL을 채취하였으며, 고속원심분리기(Micro 12, Hanil, Korea)를 이용하여 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 혈장은 냉동고(-20℃)에 보관하고 혈액생화학분석기(Selectra 2, Vitalab, Netherlands)를 사용하여 aspartate aminotransferase, alanine

aminotransferase, triglyceride, total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol(HDL-cholesterol), low density lipoprotein cholesterol(LDL-cholesterol), free fatty acid, glucose, insulin과 leptin의 혈중 농도를 각각 측정하였다.

4) 동물부검

체혈한 뒤에 부검하여 생식기 주변 백색지방조직(epididymal adipose tissue, EAT), 후복벽 주변 백색지방조직(retroperitoneal adipose tissue, RAT), 사타구니 주변 피하지방조직(inguinal adipose tissue, IAT)과 갈색지방조직(brown adipose tissue, BAT)을 수집하고 이들의 무게를 측정하였다.

5) 조직의 형태학적 분석

마우스에서 분리한 조직은 10% phosphate-buffered formalin에서 하루 이상 고정하며 12시간 이상 흐르는 물에서 formalin을 세척한 후 60% ethanol에서 1시간, 70% ethanol에서 1시간, 80% ethanol에서 1시간, 90% ethanol에서 1시간, 95% ethanol에서 1시간, 100% ethanol에서 1시간 씩 단계적으로 탈수시켰다. Xylen에 1시간씩 3번의 투명과정 후 paraffin에 1시간 씩 2번 침투과정을 실시한다. 포매과정(embedding)을 거쳐 약 3 μm의 두께로 박절(paraffin-section)하여 slide 위에 조직을 얹고 건조시킨 후 hematoxylin-eosin 염색을 하였다. Slide의 물기를 없애고 mounting medium(Sigma, MO, USA)을 떨어뜨린 후 조직과 cover glass 주위에 공기가 생기지 않도록 주의하면서 cover glass를 덮어 영구보존 할 수 있도록 하였다. 조직의 사진촬영과 지방세포의 수 및 크기분석은 image analysis system(Image Pro-Plus, MD, USA)을 이용하였다.

3. 통계분석

모든 값은 mean ± standard deviation(SD)으로 표시하며, OriginLab Version 7.5(OriginLab Corporation, MA, USA)의 one way ANOVA를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 체중 증가량과 지방무게

8주후 대조군은 정상군에 비하여 몸무게가 46.08%로 크게 증가하였다. GGH(4)-1은 대조군에 비하여 체중 증가량이 감소하는 경향을 보였으나 24일째, 49일째와 마지막 날인 56일째에만 통계적인 유의성을 나타냈다(P<0.05). GGH(4)-2는 대조군에 비하여 21일째부터 통계적으로 유의하게 체중 증가량이 감소하기 시작하여(P<0.05) 24일째는 감소폭이 더 커졌으며(P<0.01) 31일째까지 감소폭이 주춤하다가(P<0.05) 35일째 감소폭이 더 커지고(P<0.01) 38일째 감소폭이 주춤하다가(P<0.05) 42일째부터 48일째까지는 감소폭이 더 커지고(P<0.01) 49일째는 감소폭이 더 커지고(P<0.001) 52일째는 감소폭이 주춤하다가(P<0.01) 마지막날인 56일째는 감소폭이 더 커졌다(P<0.001). GGH(4)-3은 대조군에 비하여 체중 증가량이 감소하는 경향을 보였으나 24일째, 45일-49일과 56일째에만 통계적인 유의성을 나타내었다(P<0.05)(Fig. 1).

이를 백분율로 환산할 경우, 대조군에 비하여 GGH(4)-1은

11.11%, GGH(4)-2는 19.68%, GGH(4)-3은 11.32%의 체중 감량효과가 있는 것으로 나타났으며, 세 농도 중 GGH(4)-2에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다. 8주 동안 약물을 투여한 뒤에 부검하여 생식기 주변 백색지방조직(epididymal adipose tissue, EAT), 후복벽 주변 백색지방조직(retroperitoneal adipose tissue, RAT), 사타구니 주변 피하지방조직(inguinal adipose tissue, IAT)과 갈색지방조직(brown adipose tissue, BAT)의 무게를 측정하였다. EAT, RAT, IAT와 BAT의 무게는 정상군에 비하여 대조군에서 통계적으로 증가하였고, 대조군에 비하여 GGH(4)-1, GGH(4)-2와 GGH(4)-3 모두에서 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났다(Fig. 2). 이를 백분율로 환산하면, EAT의 경우, 대조군에 비하여 GGH(4)-1은 14.26%, GGH(4)-2는 14.59%, GGH(4)-3은 13.12%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났고, RAT의 경우, 대조군에 비하여 GGH(4)-1은 17.88%, GGH(4)-2는 15.98%, GGH(4)-3은 16.26%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났으며, IAT의 경우, 대조군에 비하여 GGH(4)-1은 17.12%, GGH(4)-2는 16.32%, GGH(4)-3은 13.58%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났다. BAT의 경우, 대조군에 비하여 GGH(4)-1은 22.67%, GGH(4)-2는 20.52%, GGH(4)-3은 20.26%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났다. EAT, RAT, IAT와 BAT의 무게의 감소는 세 농도 중 GGH(4)-1과 GGH(4)-2에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다.

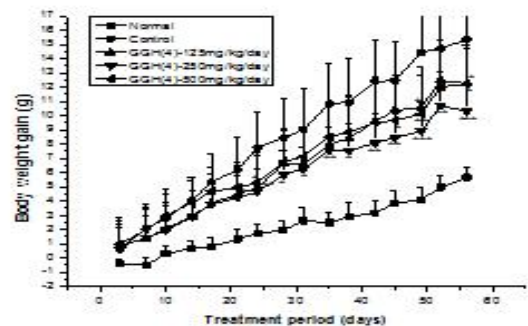


Fig. 1. Changes of body weight gain in high fat diet-fed obese mice. All values are expressed as the mean ± SD. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 significantly different from control.

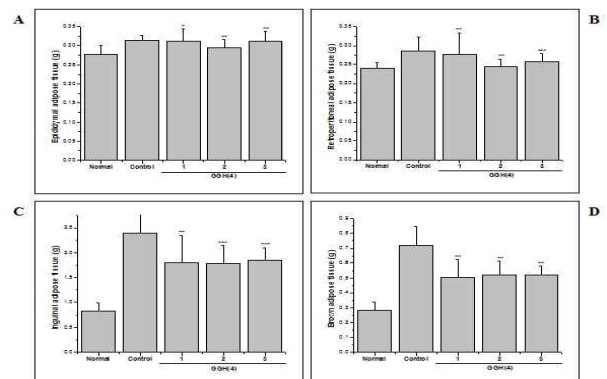


Fig. 2. Adipose tissue weights in high fat diet-fed obese mice. All values are expressed as the mean ± SD. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 significantly different from control.

2. 식이효율과 혈중 leptin 농도

식이효율은 아래의 공식에 대입시켜 최종 체중 증가량을 총 사료섭취량으로 나누어 산출하고 통계분석하였다.

$$\text{식이효율(feeding efficiency ratio: FER\%)} = \frac{\text{체중 증가량(g)}}{\text{사료섭취량(g)}} \times 100^{16,17}$$

식이효율은 대조군에서 정상군에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 것으로 나타났으며, GGH(4)-1, GGH(4)-2와 GGH(4)-3의 모두에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났으며, 세 농도 중 GGH(4)-2에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다(P<0.001, Fig. 3A). 이를 백분율로 환산할 경우, 대조군에 비하여 GGH(4)-1은 12.89%, GGH(4)-2는 19.90%, GGH(4)-3은 13.53%의 식이효율이 낮은 것으로 나타났으며, 세 농도 중 GGH(4)-2에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다. 실험시작 8주 후 혈장 내 leptin의 양을 측정한 결과, 그 값이 GGH(4)의 모든 농도에서 대조군에 비하여 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났으나 GGH(4)-1과 GGH(4)-2에서 그 정도가 큰 것으로 나타났다(Fig. 3B).

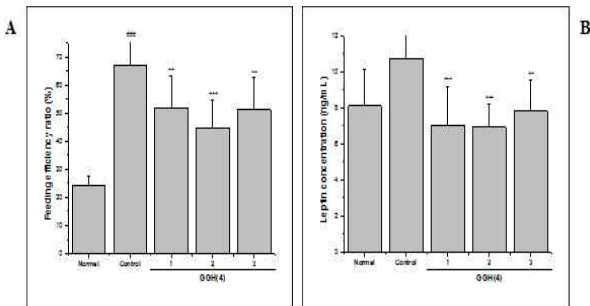


Fig. 3. Reduction of total feeding efficiency ratio(A) and fasting plasma leptin levels(B) in high fat diet-fed obese mice. All values are expressed as the mean ± SD. ** p<0.01, *** p<0.001 significantly different from control. ### p<0.001 significantly different from normal. Abbreviations as in Fig. 1.

3. 혈액생화학분석

1) 혈중 aspartate aminotransferase와 alanine aminotransferase 농도

실험시작 8주 후 혈장 내 aspartate aminotransferase와 alanine aminotransferase의 양을 측정한 결과, aspartate aminotransferase의 값은 대조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도에서 낮게 나타났으나 모두 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 4A). Alanine aminotransferase의 값은 대조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도에서 낮게 나타났으며 GGH(4)-2에서만 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났다(Fig. 4B).

2) 혈중 total cholesterol, HDL-cholesterol과 LDL -cholesterol 농도

실험시작 8주 후 혈장 내 total cholesterol, HDL-cholesterol과 LDL-cholesterol의 양을 측정한 결과, total cholesterol의 값은 대조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도 모두에서 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났다(Fig. 5A). HDL-cholesterol의 값은 대

조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도 모두에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 5B). LDL-cholesterol의 값은 대조군에 비하여 GGH(4)-2와 GGH(4)-3의 두 농도에서 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났다(Fig. 5C).

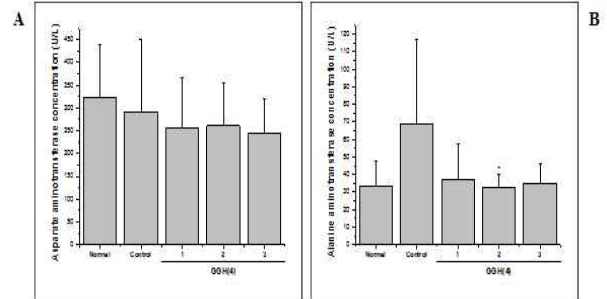


Fig. 4. Fasting plasma aspartate aminotransferase(A) and alanine aminotransferase(B) levels in high fat diet-fed obese mice. All values are expressed as the mean ± SD. * p<0.05 significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1

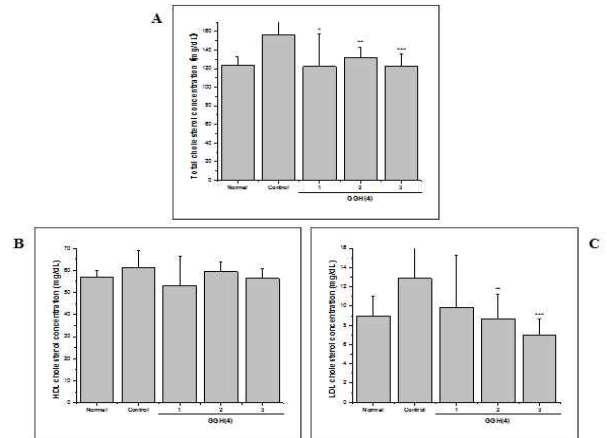


Fig. 5. Fasting plasma total cholesterol(A), HDL- cholesterol(B) and LDL-cholesterol(C) levels in high fat diet-fed obese mice. All values are expressed as the mean ± SD. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1. HDL = high density lipoprotein; LDL = low density lipoprotein.

3) 혈중 free fatty acid와 triglyceride 농도

실험시작 8주 후 혈장 내 free fatty acid와 triglyceride의 양을 측정한 결과, free fatty acid의 값은 대조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도 모두에서 낮아지는 경향이 있으나 GGH(4)-3에서만 통계적인 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 6A). Triglyceride의 값은 대조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도에서 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났으며, GGH(4)-3에서 그 정도가 큰 것으로 나타났다(Fig. 6B).

4) 혈중 glucose와 insulin 농도

실험시작 8주 후 혈장 내 glucose와 insulin의 양을 측정한 결과, glucose의 값은 대조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도 모두에서 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났다(Fig. 7A). Insulin의 값은 대조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도 모두에서 낮은 것으로 나타났으나 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 7B).

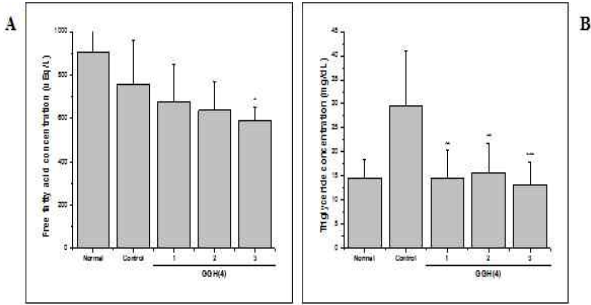


Fig. 6. Fasting plasma free fatty acid(A) and triglyceride(B) levels in high fat diet-fed obese mice. All values are expressed as the mean \pm SD. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

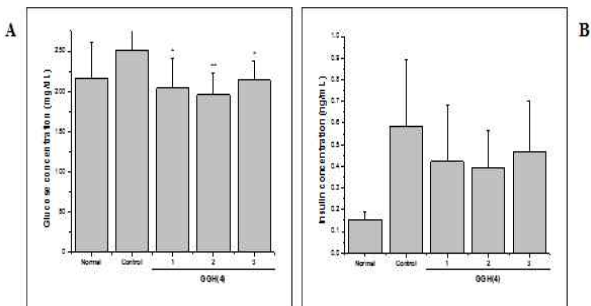


Fig. 7. Fasting plasma glucose(A) and insulin(B) levels in high fat diet-fed obese mice. All values are expressed as the mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

4. GGH(4)에 의한 지방조직 및 간조직의 histology와 morphology 변화

1) GGH(4)에 의한 지방조직의 histology와 morphology 변화

GGH(4)가 고지방식이 마우스 비만모델 지방세포의 조직학적, 형태학적 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 지방조직을 hematoxylin-eosin 염색법으로 염색한 후 현미경 및 image analysis system으로 관찰하였다. 정상군과 비교하여 대조군에서 지방세포의 크기가 크게 증가되었다(normal, $2669.68 \pm 283.03 \mu m^2$; control, $5630.05 \pm 388.23 \mu m^2$). 그러나 고지방식이 마우스에 GGH(4)를 투여하면 지방세포의 크기가 감소하였다. 지방세포의 크기는 대조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도에서 감소하는 경향은 있으나 GGH(4)-2에서만 통계적으로 유의한 차이를 나타냈으며, 그 감소율은 7.32%, 8.28%와 11.04%로 나타났다(control, $5630.05 \pm 388.23 \mu m^2$; GGH(4)-1, $4862.02 \pm 618.63 \mu m^2$; GGH(4)-2, $4768.57 \pm 312.49 \mu m^2$; GGH(4)-3, $4509.88 \pm 727.46 \mu m^2$, Fig. 8-A and B). 반면, 대조군과 비교하여 GGH(4)의 세 농도에서 단위면적당 지방세포의 수는 증가하는 경향이 있으나 GGH(4)-2에서만 통계적으로 유의한 차이를 나타냈으며, 그 증가정도는 7.72%, 8.28%와 11.72%였다(control, 48.11 ± 3.36 개; GGH(4)-1, 56.17 ± 7.49 개; GGH(4)-2, 56.78 ± 3.6 개; GGH(4)-3, 60.89 ± 9.52 개, Fig. 8A and C). 세 농도 중 GGH(4)-2에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다.

2) GGH(4)에 의한 간조직의 지방축적 변화

고지방식이의 비만형질을 나타내는 비만마우스는 정상 마우스와 비교하여 상당량의 지방이 축적된 지방간을 보여주었으나

이러한 비만마우스에 GGH(4)를 투여하면 간의 지방축적이 감소되었다. 지방세포의 morphology에 미치는 효과와 유사하게 간세포의 지방축적은 대조군에 비하여 세 농도 모두에서 통계적으로 유의하게 lesion score를 감소시켰으며, 그 감소정도는 39.92%, 56.12%와 45.96%였다. 세 농도 중 GGH(4)-2에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다(Fig. 9).

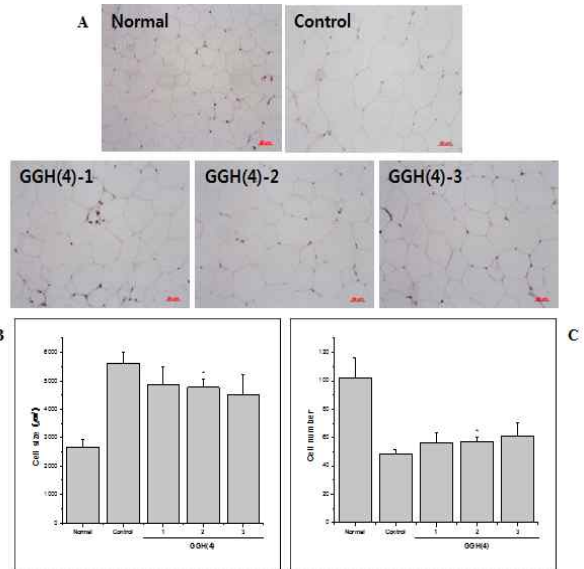


Fig. 8. Histology of epididymal white adipose tissues in high fat diet-fed obese mice. (A) Representative hematoxylin and eosin sections of epididymal adipose tissue(original magnification X 50). (B) Size of epididymal adipocytes. (C) Number of epididymal adipocytes. The size and number of adipocytes in a fixed area ($1,000,000 \mu m^2$) were quantified by an image analysis system. All values are expressed as the mean \pm SD. * $p < 0.05$ significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

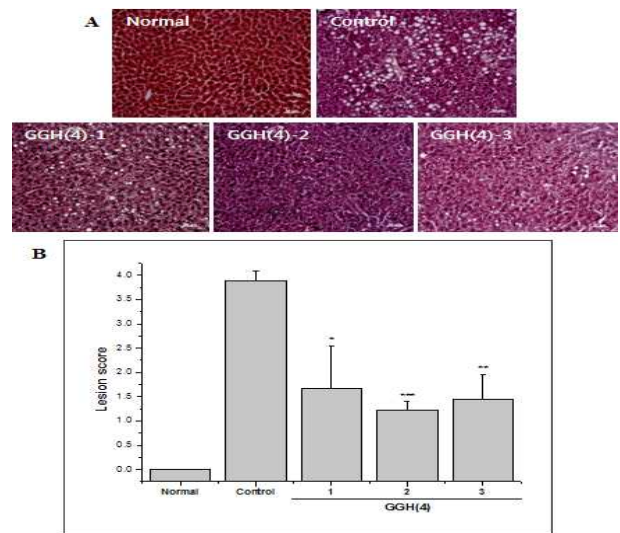


Fig. 9. Inhibition of hepatic lipid accumulation by GGH(4) in high fat diet-fed obese mice. (A) Representative hematoxylin- and eosin-stained sections of livers are shown(original magnification X 50). (B) Histological analysis of hepatic lipid accumulation in high fat diet-fed obese mice. Pathological scores of hepatic accumulation are as follows: 0, no lesion; 1, mild; 2, moderate; 3, severe; 4, very severe. All values are expressed as the mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

고찰

본 연구는 GGH(4)가 체중감량에 효과가 있는지와 체중감량 효과가 있다면 이에 따라 NAFLD의 개선효과로 이어지는지를 알아보기 위해, 비만마우스모델을 이용하여 체중변화, 식이효율, 혈중 leptin, 지질대사 및 ALT 농도, 지방조직의 형태학적 조직학적 변화와 간조직 내 지방축적을 조사하였다. NAFLD의 발병 기전이 인슐린저항성과 연관되어 있으므로 비만 인구의 95%, 당뇨병 인구의 75%에서 NAFLD를 가지고 있다³⁾. NAFLD는 대사 증후군과 밀접한 연관성이 있으며 대사증후군의 각 component 들과도 연관성이 다 있다^{4,5)}. 따라서 지방간 질환의 진행, 심혈관 질환의 악화 등^{6,7)}에 의한 유병률, 사망률을 억제하기 위해 비알콜성 지방간의 적절한 치료는 꼭 필요하다고 생각된다.

비만동물모델을 이용한 GGH(4)에 대한 체중조절과 간내 지방축적의 개선에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 고지방식이 마우스 비만모델을 이용하여 GGH(4)의 투여가 체중 증가량의 변화에 따라 지방무게에 어떤 영향을 미치는 지에 대해서 알아보았다.

체중 증가량의 경우, 대조군에 비하여 GGH(4)-1은 11.11%, GGH(4)-2는 19.68%, GGH(4)-3은 11.32%의 체중 감량효과가 있는 것으로 나타났으며, 세 농도 중 GGH(4)-2에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다. EAT의 경우, 대조군에 비하여 GGH(4)-1은 14.26%, GGH(4)-2는 14.59%, GGH(4)-3은 13.12%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났고, RAT의 경우, 대조군에 비하여 GGH(4)-1은 17.88%, GGH(4)-2는 15.98%, GGH(4)-3은 16.26%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났으며, IAT의 경우, 대조군에 비하여 GGH(4)-1은 17.12%, GGH(4)-2는 16.32%, GGH(4)-3은 13.58%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났다. BAT의 경우, 대조군에 비하여 GGH(4)-1은 22.67%, GGH(4)-2는 20.52%, GGH(4)-3은 20.26%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났다. EAT, RAT, IAT와 BAT의 무게의 감소는 세 농도 중 GGH(4)-1과 GGH(4)-2에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다. 따라서 GGH(4)는 체중감량효과와 일치하게 지방량을 전반적으로 개선시킨다는 것을 시사한다.

GGH(4)의 투여가 식이효율에는 어떤 변화를 주고 혈중 leptin 농도에는 어떻게 반영되는 지에 대해서 알아보았다.

대조군에 비하여 GGH(4)-1은 12.89%, GGH(4)-2는 19.90%, GGH(4)-3은 13.53%의 식이효율이 낮은 것으로 나타났으며, 세 농도 중 GGH(4)-2에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다.

혈중 leptin 농도의 값은 GGH(4)의 모든 농도에서 대조군에 비하여 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났으나 GGH(4)-1과 GGH(4)-2에서 그 정도가 큰 것으로 나타났다. 식이효율의 공식에서 의미하는 바와 같이 사료를 섭취하는 양이 많음에도 불구하고 체중의 증가가 적다는 것은 비만조절효과가 있는 것으로 생각할 수 있다. 식이효율은 비만을 나타내는 하나의 척도로 사용할 수 있고, 식이효율의 값이 적을수록 비만조절효과가 있다고 할 수 있다. 따라서 GGH(4)는 식이효율의 값에 따라 혈중 leptin 농도에도 반영되어 식이효율을 낮추고 혈중 leptin 농도도 낮추

어 체중 증가량을 줄이며 이에 따라 지방무게를 줄이는 것으로 생각된다.

GGH(4)의 투여가 혈중 간장 독성지표인 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT)와 체중 조절 및 지방간과 관련된 지표인 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, free fatty acid, triglyceride, glucose, insulin의 농도를 조사하였다. 왜냐하면 GGH(4)의 비만 조절효과가 약리작용에 의한 경우도 있지만 이의 독성으로도 생길 수 있기 때문이다. Alanine aminotransferase(ALT)는 간세포 손상의 흔하고 유용한 지표로서 간질환의 평가에서 중요한 역할을 한다¹⁸⁾. NAFLD는 혈중 ALT 농도의 상승과 밀접하게 관련되어 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 특히 몇몇 연구에서는 ALT와 간내 지방 축적은 상관관계가 강하다는 것을 보여준다²¹⁾.

Aspartate aminotransferase(AST)의 값은 대조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도에서 낮게 나타났으나 모두 통계적으로 유의한 차이는 없었다. Alanine aminotransferase의 값은 대조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도에서 낮게 나타났으며 GGH(4)-2에서만 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났다. AST와 ALT의 값이 생리적인 범위에 있어서 체중조절이 간독성의 간세포 손상에서 이루어진 것이 아님을 알 수 있고, 간내 지방축적이 줄어들었음을 시사한다.

대조군에 비하여 Total cholesterol의 값은 GGH(4)의 세 농도 모두에서 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났고, HDL-cholesterol의 값은 GGH(4)의 세 농도 모두에서 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, LDL-cholesterol의 값은 GGH(4)-2와 GGH(4)-3의 두 농도에서 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났다. 대조군에 비하여 free fatty acid의 값은 GGH(4)의 세 농도 모두에서 낮아지는 경향이 있으나 GGH(4)-3에서만 통계적인 유의한 차이가 있는 것으로 나타났고, Triglyceride의 값은 GGH(4)의 세 농도에서 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났으며, GGH(4)-3에서 그 정도가 큰 것으로 나타났다. 대조군에 비하여 glucose의 값은 GGH(4)의 세 농도 모두에서 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났고, Insulin의 값은 GGH(4)의 세 농도 모두에서 낮은 것으로 나타났으나 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다.

따라서 GGH(4)는 체중감량효과와 일치하게 total cholesterol, LDL-cholesterol, free fatty acid, triglyceride, glucose와 insulin의 농도값이 통계적으로 유의한 차이를 보여주고 있어 GGH(4) 투여의 실질적인 체중 증가량 감소효과가 혈중 체중감량지표와 간내 지방축적에 전반적으로 영향을 미친다는 것을 시사한다.

GGH(4)에 의하여 체중감량효과가 고지방식이 마우스 비만 모델의 지방세포와 간세포의 조직학적, 형태학적 변화에 반영하는지를 조사하였다.

지방세포의 크기는 대조군에 비하여 GGH(4)의 세 농도에서 감소하는 경향은 있으나 GGH(4)-2에서만 통계적으로 유의한 차이를 나타냈으며, 그 감소율은 7.32%, 8.28%와 11.04%로 나타났다. 반면, 대조군과 비교하여 GGH(4)의 세 농도에서 단위면적당

지방세포의 수는 증가하는 경향이 있으나 GGH(4)-2에서만 통계적으로 유의한 차이를 나타냈으며, 그 증가정도는 7.72%, 8.28%와 11.72%였다. 세 농도 중 GGH(4)-2에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다.

지방세포의 morphology에 미치는 효과와 유사하게 간세포의 지방축적은 대조군에 비하여 세 농도 모두에서 통계적으로 유의하게 lesion score를 감소시켰으며, 그 감소정도는 39.92%, 56.12%와 45.96%였다. 세 농도 중 GGH(4)-2에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다.

따라서 체중감량효과와 일치하게 GGH(4)에 의하여 지방세포의 수는 증가하였고 그 크기는 감소하였으며, 간세포의 지방축적은 억제하는 것을 알 수 있다.

그러므로 GGH(4)는 식이효율과 leptin 농도를 낮추고 혈중 비만지표들을 개선시키며 지방량을 줄여 체중감량효과로 나타나고 지방간의 개선도 보여주며, 특히 간내 지방축적의 중요한 지표인 ALT와 triglyceride의 개선을 통하여 NAFLD의 개선에 기여할 수 있음을 보여준다.

결 론

고지방식이 유발 수컷마우스 비만모델을 이용하여 GGH(4)의 투여가 체중 증가량과 지방조직의 무게, 식이효율과 혈중 leptin 농도, 혈중 비만관련 지표, 그리고 지방조직의 조직학적, 형태학적 변화와 간조직의 지방축적을 분석하고 평가하여 다음의 결론을 얻었다.

GGH(4)는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 체중 증가량과 지방무게가 감소하였고, 그 효과는 GGH(4)-2에서 더 현저하였다. GGH(4)는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 식이효율과 혈중 leptin 농도를 감소시켰고, 그 효과는 GGH(4)-2에서 더 현저하였다. GGH(4)는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 혈중 total cholesterol, LDL-cholesterol, free fatty acid와 triglyceride의 농도가 낮은 것으로 나타났다. GGH(4)-2는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 혈중 ALT의 농도가 감소하는 것으로 나타났다. 체중감량효과와 일치하게 GGH(4)에 의하여 지방세포의 수는 증가하였고 그 크기는 감소하였으며, 간세포의 지방축적은 억제하였다.

결론적으로 GGH(4)는 고지방식이 유발 수컷마우스 비만모델에서 식이효율과 leptin 농도를 낮추고 혈중 비만지표들을 개선시키며 지방량을 줄여 체중감량효과로 나타나고 지방간의 개선도 보여주며, 특히 간내 지방축적의 중요한 지표인 ALT와 triglyceride의 개선을 통하여 NAFLD의 개선에 기여할 수 있음을 보여준다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2012R1A2A2A01004508).

참고문헌

1. Neuschwander-Tetri, B.A., Caldwell, S.H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 37(5):1202-1219, 2003.
2. 식품의약품안전청 영양정책관 영양정책과. 건강한 간을 위한 다면 탄수화물 섭취를 줄이세요-비알콜성 지방간, 탄수화물 및 당류 섭취량과 연관성 높아. 2013년 1월 30일 보도 (<http://www.kfda.go.kr>).
3. Byrne, C.D., Olufadi, R., Bruce, K.D., Cagampang, F.R., Ahmed, M.H. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*. 116(7):539-564, 2009.
4. Lazo, M., Clark, J.M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* 28(4):339-350, 2008.
5. Fan, J.G., Farrell, G.C. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol* 50(1):204-210, 2009.
6. Targher, G., Bertolini, L., Rodella, S., Tessari, R., Zenari, L., Lippi, G., Arcaro, G. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 30(8):2119-2121, 2007.
7. Hamaguchi, M., Kojima, T., Takeda, N., Nagata, C., Takeda, J., Sarui, H., Kawahito, Y., Yoshida, N., Suetsugu, A., Kato, T., Okuda, J., Ida, K., Yoshikawa, T. Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World J Gastroenterol* 13(10):1579-1584, 2007.
8. 沈映君 主編. 『中藥藥理學』. 第1版 第1次印刷. 北京, 人民衛生出版社, pp 645-646, 2000.
9. 常新全, 丁麗霞 主編. 『中藥活性成分分析手冊』(上, 下冊). 第1版 第1次印刷. 北京, 學苑出版社, pp 1354-1360, 2002.
10. 江蘇新醫學院 編. 中藥大辭典(上卷). 上海, 上海科學技術出版社, pp 1088-1089, 1995.
11. 冉先德. 中華藥海(下卷). 哈爾濱, 哈爾濱出版社, pp 865-866, 1993.
12. 甘偉松. 藥用植物學. 臺北, 國立中國醫藥研究所, p 169, 1993.
13. 김재길. 원색천연약물대사전(하). 서울, 남산당, p 161, 1992.
14. 서부일. 赤楊에 관한 文獻的 考察. *한약응용학회지* 3(1):67-68, 2003.
15. 國家中醫藥管理局『中華本草』編委會 編. 『中華本草』(8冊). 第1版 第1次印刷. 上海, 上海科學技術出版社, pp 762-763, 1999.
16. 오창호 『비만억제자인 α-MSH 유사체의 합성 및 약효분석』(신약개발연구개발사업 최종보고서). 서울, 보건복지부, p 21, 2003.
17. Garrido-Polonio, C., Garcia-Linares, M.C., Garcia -Arias, M.T., Lopez-Varela, S., Garcia-Fernandez, M.C., Terpstra, A.H., Sanchez-Muniz, F.J. Thermally oxidised sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies

- lipoprotein composition in rats. *Br J Nutr.* 92(2):257-265, 2004.
18. Clark, J.M., Brancati, F.L., Diehl, A.M. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 98(5):960-967, 2003.
19. Westerbacka, J., Cornér, A., Tiikkainen, M., Tamminen, M., Vehkavaara, S., Häkkinen, A.M., Fredriksson, J., Yki-Järvinen, H. Women and men have similar amounts of liver and intra-abdominal fat, despite more subcutaneous fat in women: implications for sex differences in markers of cardiovascular risk. *Diabetologia* 47(8):1360-1369, 2004.
20. Fraser, A., Longnecker, M.P., Lawlor, D.A. Prevalence of elevated alanine aminotransferase among US adolescents and associated factors: NHANES 1999-2004. *Gastroenterology* 133(6):1814-1820, 2007.
21. Kim, W.R., Flamm, S.L., Di Bisceglie, A.M., Bodenheimer, H.C.; Public Policy Committee of the American Association for the Study of Liver Disease. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology* 47(4):1363-1370, 2008.