

마황 에틸아세테이트 분획물이 고지방 식이로 유발된 생쥐의 지질대사에 미치는 영향[†]

하태훈 · 권태우 · 김영균*

동의대학교 한의과대학

Effects of Ephedra Herba ethyl-acetate fraction on high fat diet induced hyperlipidemic mice

Tae-Hoon Ha, Tae-Woo Kwon & Young-Kyun Kim*

College of Korean Medicine, Dong-Eui University

Abstract

Objective : Ephedra Herba has been widely used for patients with common cold, asthma in eastern countries, especially china japan and korea. Recently it has been also used for obesity in clinic with high frequency. This study was designed to investigate the effects of Ephedra Herba ethyl-acetate fraction (EEAF) on hyperlipidemic mice.

Method : Effects on total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride, AST, ALT, fasting blood glucose in serum were measured in this experiment, and in addition, histopathological and gene expression changes in liver tissue was also observed.

Results : In our study, EEAF did not affect weight gain in hyperlipidemic mice. Oral administration of EEAF lowered levels of total cholesterol which were elevated by induction of hyperlipidemia. And administration of EEAF lowered fasting blood glucose significantly. By carrying out ontological analysis, large numbers of genes were identified in up or down regulated genes. The expression of the genes that were altered in response to high-fat diet was restored to normal levels in EEAF treated mice, with a recovery rate of 49%. And it was considered that fatty acid metabolism was one of important key pathway of the recovery.

Conclusion : Results in our study suggest that EEAF can prevent obese and through regulation of dyslipidemia and hyperglycaemia.

Key words : Ephedra Herba, ethyl-acetate fraction, hyperlipidemia.

• 접수 : 2014년 6월 19일 • 수정접수 : 2014년 8월 21일 • 채택 : 2014년 8월 25일

* 교신저자 : 김영균, 부산시 부산진구 양정동 동의대학교 한의과대학

전화 : 051-867-5105, 팩스 : 051-853-4036, 전자우편 : lab3402@hanmail.net

† 이 논문은 2013년도 동의대학교 교내 연구비 지원에 의해 연구되었음 (과제번호 : 2013AA100)

I. 서론

최근 다양한 종류의 가공 식품, 고지방식, 탄산음료 등의 섭취는 증가하는 반면, 각종 편의 시설이 발달함에 따라 운동량은 감소하면서 비만의 발생이 증가하는 것으로 알려지고 있다¹⁾.

2008년도 국민건강영양조사(Korean National Statistical Office)에 의하면 우리나라 만 19세 이상 인구 중 31.9%가 비만에 해당하였으며²⁾, 이로 인해 만성 심장질환, 통풍, 제2형 당뇨병, 골관절염, 우울증, 뇌졸중 등의 발병 위험도를 높이고 사망률 또한 높아지는 것으로 보고되었다³⁻⁵⁾.

특히 비만은 콜레스테롤(cholesterol)과 지단백(lipoprotein) 대사에 이상을 초래하여 고지혈증의 원인이 되며, 과체중이거나 비만한 사람은 혈장 콜레스테롤이나 중성 지방이 정상인보다 높다고 보고된 바 있다⁶⁾. 이러한 연구결과는 비만의 관리 및 치료가 고지혈증을 억제하는데 중요한 기능을 한다는 것을 의미한다.

최근 한의학계에서도 이러한 비만을 치료하기 위해 인진⁷⁾, 대황⁸⁾ 등의 약침액을 이용한 연구에서부터 천년초⁹⁾, 자목¹⁰⁾, 사삼¹¹⁾ 등의 약재 추출물 이용한 연구까지 다양한 연구가 진행된 바 있다. 이러한 연구 중에서 비만 치료를 목적으로 마황이 자주 사용되고 있는데, 황 등¹²⁾에 의하면 국내에서 비만 치료를 위해 가장 많이 활용된 처방은 四象體質醫學 처방으로 太陰調胃湯과 調胃升清湯 등이 있으며, 單味 약재로는 마황이 빈도가 제일 높았다고 보고되었다.

마황은 초마황 및 동속근연식물의 초질경으로 發汗解表, 利水消腫, 宣肺平喘의 효능을 지니기 때문에 전통적으로 感冒, 胸悶喘咳, 浮腫 등의 증상에 자주 사용하여 왔다¹³⁾. 마황은 비만에 효과적으로 활용될 수 있다는 연구결과들이 보고¹⁴⁻¹⁷⁾되고 있기는 하나, 대부분 다른 약물과 배합된 처방에서 활용되었거나 마황 단일 약재라 하더라도 조추출물 형태의 연구들이 주류를 이루고 있다. 최근 나고야 의정서 발효로 기존 한의약 지식을 대체할 수 있는 치료 기술 개발의 필요성과 한의 임상에서 다용되는 한약재 또는 천연 생약에서 유래한 물질들을 재료로 한 신약 개발 요구가 대두되고 있음을 감안하면 임상에서 다용되는 마황을 재료로 하여 활성 물질을 개발하는 것도 의미 있는 연구 주제로 판단된다.

한편 마황 분획물을 이용한 실험적 보고로는 김¹⁸⁾의

hexane 분획물을 이용한 연구와 정¹⁹⁾의 chloroform 분획물을 이용한 연구가 있는데 각각 실험 동물의 고지혈증에 유효함을 보고하였다.

본 연구에서는 예비 연구를 통해 마황 추출물의 활성도를 조사한 후 그 중 chloroform, ethyl-acetate, hexane의 순으로 활성도가 높음을 확인하였다. 이에 저자는 앞서 보고된 hexane과 chloroform에 이어 ethyl-acetate가 고지방식으로 유발된 고지혈증 생쥐의 혈청 중 지질 함량과 식욕 및 간 독성에 미치는 영향을 살펴보았다.

또한 본 연구에서는 마황 ethyl-acetate 추출물의 작용 경로를 확인하기 위해 유전자 발현을 분석하는데 있어 유용한 분자생물학적 기법으로 인정받고 있는 microarray 실험도 함께 수행하였다^{20,21)}.

위에서와 같은 내용으로 수행된 본 연구를 통해 마황 ethyl-acetate의 항 고지혈증을 효과와 관련된 경로를 확인하였으며 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

고지혈증 유발을 위하여 6주령 정도로 체중 약 22 g 내외의 수컷 ICR 마우스(샘타코, 한국)를 사용하였다. 실험에 사용된 동물은 항온 및 항습 장치가 부착된 사육장에서 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경(실내 온도 24±2℃, 습도 55±5%, 12 시간 dark/light)에 1주일 이상 적응시킨 후 사용하였다. 동물을 재료로 한 실험 과정은 동의대학교 한의학연구소 중앙 공동실험실에 의해 제시된 원칙을 따랐으며, 동물보호법(2014년 3월 24일 일부 개정) 제23조에 명시된 동물 실험의 원칙을 성실히 준수하여 수행되었다.

2) 약재

본 연구에 사용된 약재 마황(Ephedra Herba)은 화림 제약(부산, 한국)에서 구입하였으며, 관능 검사를 통해 초마황(*Ephedra sinica* Stapf.)에서 기원한 정품 마황인 것을 확인한 후 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 마황 에틸아세테이트 분획의 획득

마황 500 g을 분쇄기로 잘게 부순 다음 실온에서 5 일 동안 methanol에 담가 여과액을 얻는 과정을 2 회 반복한 후 동결 건조시켜 41.38 g의 건조 추출물을 얻었으며 이로부터 ethyl-acetate 용매 분획을 취하여 최종 0.72 g의 건조 추출물을 얻었다. 이 시료는 실험 동물에 투여하기 위해 다시 증류수에 희석시켜 냉장 보관하면서 사용하였다(Fig. 1).

2) 고지혈증 유발 및 실험군 분류

고지혈증 유발을 위하여 4 주간 30 마리의 고지방 식이군에는 고지방 식이를 공급하였으며, 8 마리의 정상 식이군(Normal, 이하 NOR군)에는 일반 사료를 공급하였다. 실험 5주째의 체중을 기준으로 대조군(Control, 이하 CON군) 및 ethyl-acetate 분획 추출물(Ephedra Herba ethyl-acetate fraction, 이하 EEAF) 투여군(이하 EEAF군)을 각각 8 마리 씩 선별하여 실험에 사용하였다.

실험 5 주째부터 NOR군은 계속 일반 식이를 공급하면서, 1 차 증류수를 1 일 1 회 2 주간 경구 투여 하였고, 고지혈증 대조군인 CON군은 고지방 식이를 사료로 공급하면서 1 차 증류수를 1 일 1 회 2 주간 경구 투여하였다. Ethyl-acetate 분획 추출물 투여군인 EEAF군은 고지방 식이를 계속 공급하면서 EEAF를 2 mg/kg body weight/day 농도로 1 일 1 회 2 주간 경구 투여하였다. 실험 식이는 두열바이오텍(대전, 한국)에 주문 제작하여 사용하였으며, 조성은 Table 1과 같다.

3) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정

4 주간의 고지혈증 유발 기간이 끝나고, 시료의 투여가 시작되는 날 전자 저울을 이용하여 기준 체중을 측정하였으며, 이후 7일 간격으로 체중을 측정하였다. 2 주간의 시료 투여 기간 동안 주 1 회 사료 섭취량 (g) 및 음수량 (ml)을 측정하였다. 측정 단위는 24 시간으로 전일 오후 4 시에 고형 사료와 음용수를 공급한 후, 다음 날 오후 4 시에 남은 사료와 음용수의 양을 측정하여 그 차이를 하루 동안의 사료 섭취량 및 음수량으로 계산하였다.

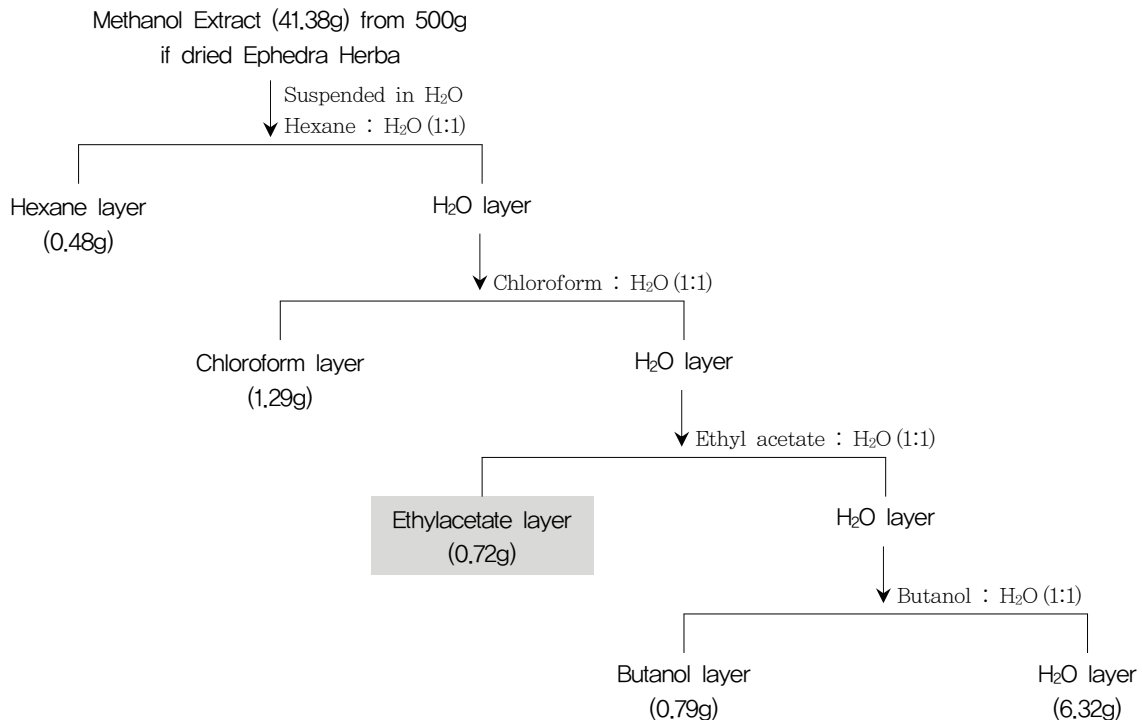


Fig. 1. Purification Procedure for the Ethyl-acetate Fractions Isolated from Ephedra Herba. Final dried extract yield of ethyl-acetate fraction from 500 g of dried Ephedra Herba was 0.72 g.

Table 1. Compositions of High Fat Diet

Ingredients	gm	kcal
Casein	200	800
Sucrose	68,8	275,2
Cellulose	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard)	245	2,205
Mineral mix	10	0
Vitamin mix	10	40
L-Cystine	3	12
Choline Bitartrate	2	0
Potassium Citrate	16,5	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	2	0
Maltodextrin	125	500
Total	773,85	4,057

^{a)} Typical analysis of cholesterol in lard = 0,95 mg/gram.

4) 간 조직 적출 및 처리

6 주간의 실험이 끝나고 생쥐를 희생시킨 후 간 조직을 적출하였는데, 간 조직 대엽의 침부를 절제하여 인산 완충액에 행군 후, 4% paraformaldehyde에 1일간 고정하였다. 고정된 조직은 paraffin 포매 과정을 거쳐서 조직 절편을 완성하였다. 5 μm 두께로 절제된 조직을 슬라이드 글라스 위에 올리고 haematoxylin/eosin 기법으로 염색하고, 광학 현미경(Carl zeiss Co, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

5) 혈액 중 콜레스테롤 및 triglyceride, glucose, AST, ALT 함량 측정

2 주간의 약물 투여가 끝난 후, 생쥐의 복부 대동맥에서 혈액을 채취하였다. 얻어진 혈액을 5,000×g로 20 분간 원심 분리하여 상청액을 취하여 혈중 cholesterol 및 triglyceride 함량을 측정하였다. 혈청 중 total cholesterol, HDL-cholesterol 및 triglyceride, glucose, AST, ALT의 함량 각각의 측정용 kit(FUJI, 일본)을 사용하였다.

6) 간 조직에서 RNA 분리 및 DNA chip 실험

생쥐를 경추 탈구로 희생시켜 간 조직을 분리한 즉

시 동결시킨 후 초저온 냉동고에 보관하였다. 이후 전 RNA를 동결 조직에서 분리하였는데, 이것은 Qiagen Co. (USA)에서 제시한 방법에 따라 이루어졌다. 전 RNA를 agarose gel 상에서 전기영동한 후 28S/18S RNA의 비율을 측정하여 정도 관리하였다. 45K oligo-chip을 이용하여 실험을 수행하였으며, 탐침 준비와 혼성화 반응은 3DNA array detection system을 이용하여 수행하였다. 형광 표지된 cDNA 제작 시 20 μg의 RNA를 사용하였으며, array를 씻어낸 후 ScanArray scanner(Perkin-Elmer, Boston, MA)로 scan하였다. 정상 RNA를 reference로 사용하여 DNA chip상의 대다수 cDNA spots(85% 이상)이 검출됨을 확인하였다.

7) 데이터 분석

이미지 파일에서 IMAGEGENE 4.0(Bio-discovery, Marina del Rey, CA)를 사용하여 1 차 데이터를 얻은 후 Lowess method를 사용하여 표준화하였고, 모든 chip 상의 spot에서, 각 채널의 형광 강도가 배경의 형광 강도 보다 1.4 배 더 큰 경우에 한해 제대로 측정된 것으로 판단하여 선별하였다. 시료에서 제대로 측정되지 않은 것은 제외시켰다.

유전자 발현 비율은 CLUSTER를 이용하여 순차적 clustering 한 후 TREEVIEW(M.B. Eisen, <http://rabam.lbl.gov>)를 이용하여 시각화하였다.

3. 통계 처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SPSS 12.0 ver. for windows를 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차 (mean±SD)로 나타내었으며, 실험군 간 평균의 차이를 검정할 때에는 one way-ANOVA test를 시행하였고 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였으며, 사후 검정은 Tukey를 이용하였다.

III. 성적

1. 체중 변화, 사료 섭취량 및 음수량에 미치는 영향

고지방 식이를 4 주 동안 섭취한 고지혈증 유발 기

간이 끝난 후, 2 주간 EEAF 시료를 투여하면서 체중의 변화를 관찰한 결과, CON군에서 경미한 체중 증가의 경향이 관찰되기는 하였으나 각 실험군 간의 통계적 유의성은 보이지 않았다(Fig. 2). EEAF군에서 시료 섭취 1 주까지는 대조군과 거의 유사한 체중 증가율을 보였으나 2 주째에는 감소하는 경향을 보였다. 실험 동물이 2 주간의 실험 기간 동안 섭취한 사료의 양에는 각 실험군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았으며(Table 2), 본 연구 결과에 나타내지는 않았지만 음수량에도 변화는 없었다.

Table 2. Effects of EEAF on Changes of Food and Water uptake in Hyperlipidemic Mice

Group	Food Uptake (g)	Water Uptake (ml)
NORa)	6.65±1.06b)	17.87±4.17
CON	5.97±1.82	17.16±3.74
EEAF	6.09±1.67	15.38±6.31

a) NOR, naive mice (n=8); CON, hyperlipidemic mice (n=8); EEAF, EEAF administered mice (n=8).

b) Values are represented as mean±SD.

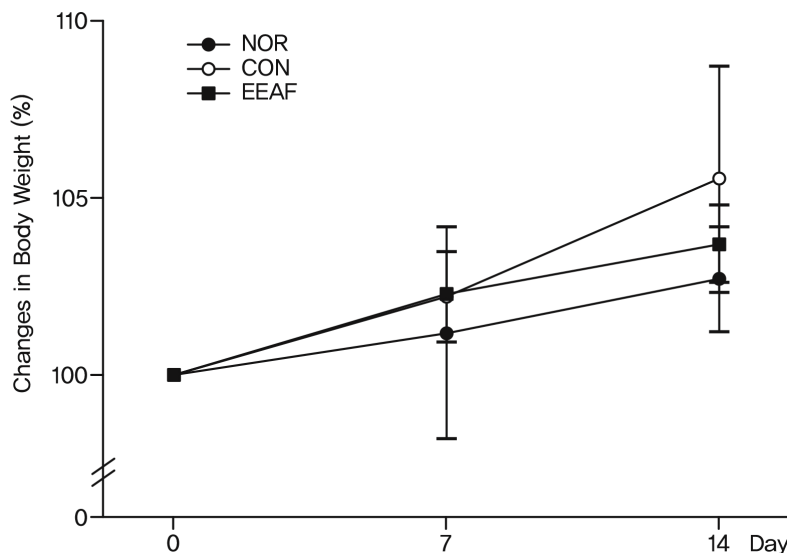


Fig. 2. Effects of EEAF on Changes in Body Weights in Hyperlipidemic Mice. Body weights were measured on day which EEAF was firstly administered (day 0) and every 7 days. NOR, naive mice (n=8); CON, hyperlipidemic mice (n=8); EEAF, EEAF administered mice (n=8). Values are represented as mean±SD.

2. 혈청 중 total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride 및 glucose 함량 변화에 미치는 영향

실험 동물의 혈청 중 total cholesterol 함량 변화를 관찰한 결과 CON군에서 157.0±12.6 mg/dl로 나타나 88.0±16.5 mg/dl를 보인 NOR군에 비해 유의한 (P<0.05) 증가를 보였고, EEAF군에서는 134.6±7.4 mg/dl로 나타나 CON군에 비하여 유의한 (P<0.05) 감소를 보였다(Fig. 3A). HDL-cholesterol 함량 변화를 관찰한 결과 각 실험군에서 48.0±10.3 mg/dl, 64.8±16.8 mg/dl, 68.4±7.1 mg/dl의 수치를 보여 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3B).

EEAF를 2 주간 투여한 후 생쥐의 혈액에서 분리된 혈청 중 triglyceride 함량 변화를 관찰한 결과 각 실험군에서 64.6±7.6 mg/dl, 82.6±14.4 mg/dl, 77.8±12.7 mg/dl로 나타나 각 군 사이에 유의한 차이가 없었다(Fig. 3C).

혈청 중 glucose 함량 변화는 CON군에서 149.6±15.6 mg/dl, EEAF군에서 110.0±16.4 mg/dl로 나타나 통계적으로 유의한 (P<0.05) 차이를 보였다(Fig. 3D).

3. 간 조직의 지방 분포에 미치는 영향

6 주간의 실험이 끝난 후, 간 조직을 적출하여 지방 분포를 관찰한 결과 각 실험군 간에 흰색 방울 모양의 지방 축적 현상인 간지방증이 관찰되지는 않았다(Fig. 4).

4. 혈청 중 AST 및 ALT 함량 변화에 미치는 영향

실험 동물의 혈액으로부터 분리된 혈청 중 AST 함량 변화를 관찰한 결과 각 실험군에서 34.4 ± 5.7 U/L,

37.2 ± 6.8 U/L, 38.6 ± 6.7 U/L로 나타나 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 5A). ALT 함량 변화는 각 실험군에서 21.5 ± 3.1 U/L, 25.2 ± 4.7 U/L, 25.3 ± 6.3 U/L 로 나타나 실험군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 5B).

5. DNA chip에서 유전자 발현 프로파일 및 변화 패턴 분석

유전자 발현 결과는 유사도가 높은 유전자 군끼리 서로 뭉치도록 하는 순차적 clustering 기법을 이용하

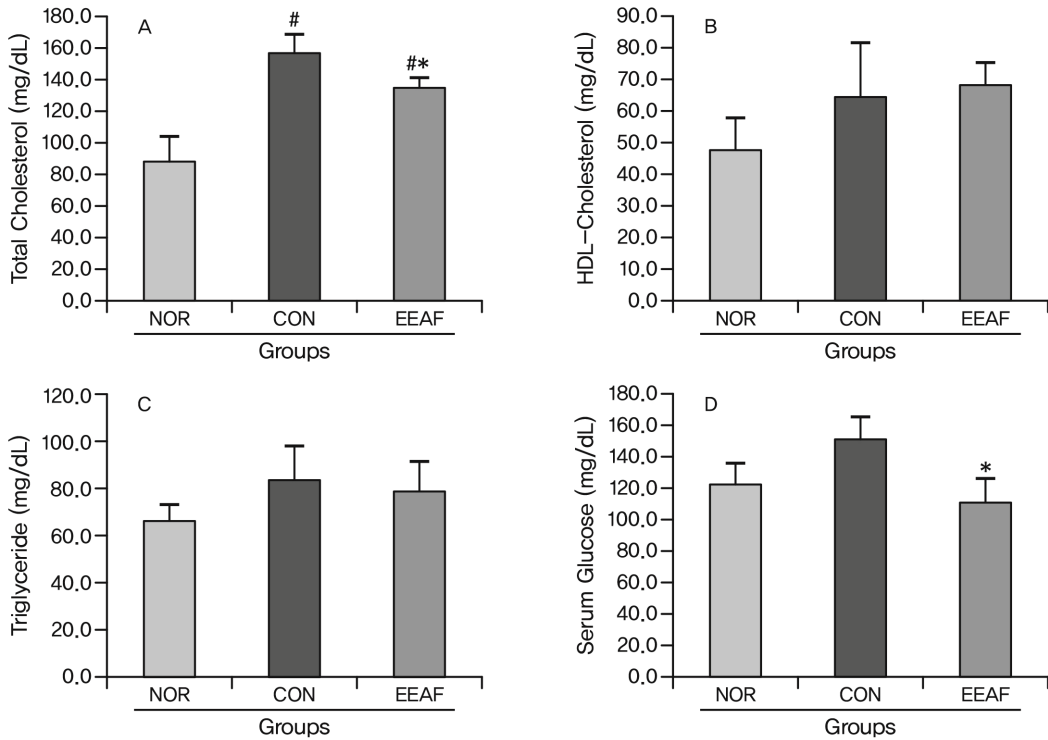


Fig. 3. Effects of EEF on Total Cholesterol, HDL-Cholesterol, Triglyceride and Serum Glucose Levels in Hyperlipidemic Mice. Levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR, naive mice (n=8); CON, hyperlipidemic mice (n=8); EEF, EEF administered mice (n=8). Values are represented as mean±SD. #, p<0.05 as compared to NOR group; *, p<0.05 as compared to CON group (n=6).

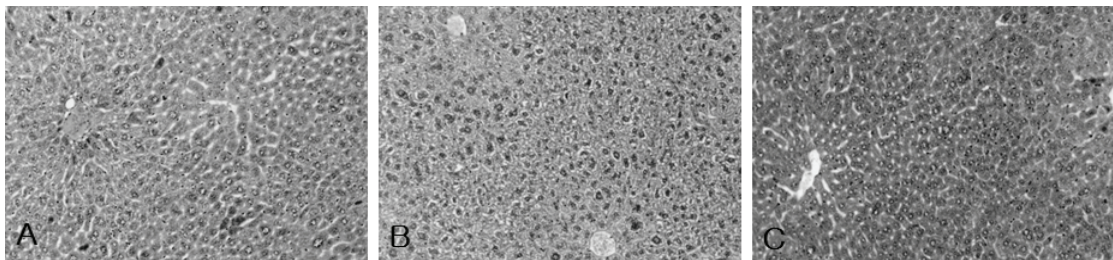


Fig. 4. Effects of EEF on Lipid accumulation of liver tissue in Hyperlipidemic Mice. Liver tissues were observed using haematoxylin and eosin stain. A, NOR group; B, CON group; C, EEF group (x100).

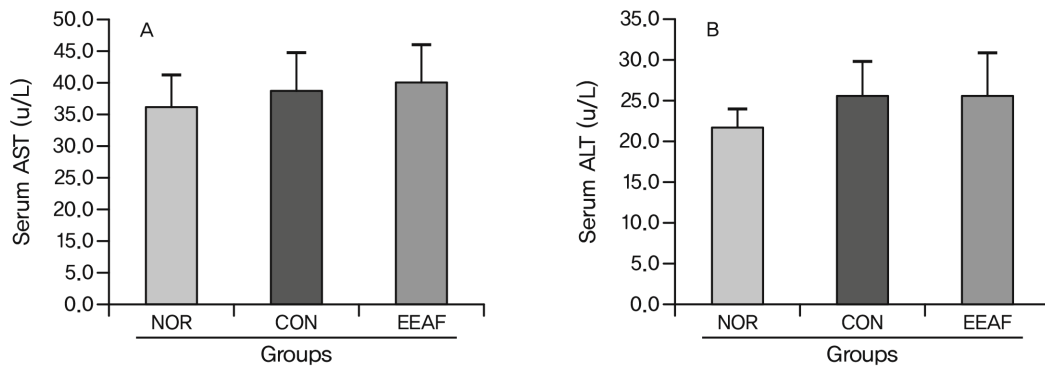


Fig. 5. Effects of EEAF on AST and ALT Levels in Hyperlipidemic Mice. Levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR, naive mice (n=8); CON, hyperlipidemic mice (n=8); EEAF, EEAF administered mice (n=8). Values are represented as mean±SD.

였다. 붉은 색은 발현이 증가된 유전자를, 녹색은 발현이 감소된 유전자를 나타내며, 그 색의 강도는 발현 비율과 비례함을 나타낸다(Fig. 6).

위와 같이 발현의 변화를 보인 유전자를 추출하여 갯수를 계측한 결과 NOR군에 비해 CON군에서 발현이 증가된 유전자의 개수는 417개였으며 이 중 EEAF 투여로 인해 정상 상태의 발현을 유지한 유전자의 개수는 140개였으므로 약 34%의 유전자의 발현 증가가 조절되었음을 알 수 있다(Table 3). 또한 NOR군에 비해 CON군에서 발현이 감소된 유전자의 개수는 484개였으며 이 중 EEAF 투여로 인해 정상 상태의 발현을 유지한 유전자의 개수는 298개로 약 62%의 유전자의 발현 감소가 조절되었다.

따라서 고지방 식이로 인해 발현이 증가 또는 감소된 유전자는 901개였으며 EEAF 투여로 인해 정상 상태를 유지한 유전자는 438개였으므로 전체적으로 약 49%의 유전자 발현 조절의 작용을 보였음을 알 수 있다.

Table 3. Number of Over or Under Expressed Genes

Patterns of Genes	Numbers of Genes	
	Changed in CON	Restored in EEAF
Increased	417	140
Decreased	484	298

The number of over expressed genes (over 2 fold ratio) or under expressed genes (below 0.5 fold ratio) were measured in each experimental condition.



Fig. 6. Clustering Analysis of Expressional Profiling. Data were hierarchically clustered on ratio of gene expression. Left and right columns represent CON and EEAF group each, and rows represents genes. Red color means up-regulated genes and green color means down-regulated genes over reference (NOR) genes.

6. 변화된 유전자의 ontology 분석

NOR군에 비해 CON군에서 발현의 변화가 관찰된 유전자를 대상으로 유전자 ontology 분석을 수행하였으며 이 중 유의한 변화가 큰 20개의 항목을 선별하였다(Table 4). Sterol metabolic process, cholesterol metabolic process, fatty acid metabolic process 등 지질 대사와 관련 있는 항목이 상위에 랭크되어 있으므로 고지방 식이가 이러한 종류들의 유전자 발현에 변화를 유도함을 알 수 있다.

또한 고지혈증 유발이 세포에 미치는 영향을 좀 더 살펴보기 위해 pathway 분석을 수행하였는데 역시 fatty acid metabolism pathway가 상위에 랭크되었다(Table 5).

EEAF 투여에 의해 발현이 조절된 유전자 항목과 pathway를 확인해 보았는데 regulation of lipid metabolic process에 관여하는 항목이 선별되었으며, 주요 pathway로는 fatty acid metabolism이 관여하는 pathway가 선별되었다(Table 6, 7). 따라서 EEAF가

혈청 중 cholesterol 수치를 낮추는 데는 fatty acid metabolism pathway에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하는데 기인한 것으로 추정된다.

IV. 고찰

마황(麻黃)은 마황과에 속한 다년생 초본인 草麻黃 (*Ephedra sinica* Stapf.)의 草質莖을 약용하며, 중국에서는 中麻黃(*E. intermedia* Schrenk et C.A. Mey.) 또는 木賊麻黃(*E. equisetina* Bge.) 등도 사용되는데, 發散風寒藥 중 가장 대표적인 약제로 辛微苦溫한 성질을 가지고 있으며, 肺, 膀胱으로 歸經하여 發汗散寒, 利水消腫, 宣肺平喘의 효능을 가지기 때문에 感冒, 喘息, 浮腫 등에 사용되어져 왔다³⁾.

마황의 대표적인 구성 성분들은 pseudoephedrine 과 ephedrine으로 alkaloid의 일종인데, 대한약전에서는 마황의 의약품으로서의 필수 요건으로 건조품 정량 시 0.7% 이상을 함유해야 함을 공시하고 있다²²⁾.

Table 4. Over/Under Expressed Genes by High-fat Diet (GOstat).

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
oxidation reduction	RT		50	5.7	3.4E-6	7.1E-3
acute-phase response	RT		9	1.0	7.4E-6	7.7E-3
sterol metabolic process	RT		12	1.4	1.1E-4	7.2E-2
cholesterol metabolic process	RT		11	1.3	2.2E-4	1.1E-1
isoprenoid metabolic process	RT		9	1.0	4.0E-4	1.6E-1
fatty acid metabolic process	RT		18	2.1	4.7E-4	1.5E-1
acute inflammatory response	RT		11	1.3	5.4E-4	1.5E-1
immune response	RT		32	3.7	8.7E-4	2.0E-1
steroid metabolic process	RT		16	1.8	9.1E-4	1.9E-1
steroid biosynthetic process	RT		10	1.1	1.2E-3	2.2E-1
regulation of lipid metabolic process	RT		9	1.0	1.3E-3	2.2E-1
negative regulation of secretion	RT		6	0.7	2.8E-3	3.9E-1
sterol biosynthetic process	RT		6	0.7	4.6E-3	5.2E-1
kidney development	RT		11	1.3	5.6E-3	5.7E-1
urogenital system development	RT		13	1.5	7.4E-3	6.5E-1
inflammatory response	RT		17	1.9	7.8E-3	6.4E-1
isoprenoid biosynthetic process	RT		5	0.6	8.1E-3	6.3E-1
response to wounding	RT		23	2.6	8.3E-3	6.2E-1
cholesterol biosynthetic process	RT		5	0.6	9.5E-3	6.5E-1
bone development	RT		11	1.3	1.1E-2	6.9E-1

Table above provides typical batch annotation and gene-GO term enrichment analysis relevant GO terms associated with a given gene list, RT in table means related term search.

Table 5. Pathway Analysis of Over/Under Expressed Genes by High-fat Diet

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
Drug metabolism	RT		23	2.6	5.7E-14	8.1E-12
Retinol metabolism	RT		22	2.5	7.0E-14	4.9E-12
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	RT		19	2.2	4.8E-11	2.3E-9
PPAR signaling pathway	RT		14	1.6	1.3E-5	4.5E-4
Fatty acid metabolism	RT		10	1.1	5.9E-5	1.7E-3
Linoleic acid metabolism	RT		9	1.0	4.2E-4	9.9E-3
Tryptophan metabolism	RT		8	0.9	9.3E-4	1.9E-2
Arachidonic acid metabolism	RT		10	1.1	5.8E-3	9.8E-2
Valine, leucine and isoleucine degradation	RT		7	0.8	9.7E-3	1.4E-1
Drug metabolism	RT		7	0.8	1.2E-2	1.6E-1
Circadian rhythm	RT		4	0.5	1.4E-2	1.6E-1
Terpenoid backbone biosynthesis	RT		4	0.5	1.7E-2	1.8E-1
Glutathione metabolism	RT		7	0.8	1.7E-2	1.7E-1
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	RT		5	0.6	2.2E-2	2.0E-1
Propanoate metabolism	RT		5	0.6	3.1E-2	2.6E-1
Adipocytokine signaling pathway	RT		7	0.8	5.1E-2	3.7E-1
Arginine and proline metabolism	RT		6	0.7	6.1E-2	4.1E-1
Histidine metabolism	RT		4	0.5	7.7E-2	4.7E-1
Pyruvate metabolism	RT		5	0.6	8.1E-2	4.7E-1
Toll-like receptor signaling pathway	RT		8	0.9	9.5E-2	5.1E-1

Table above provides annotation on pathway-GO analysis relevant GO terms associated with a given pathway list. RT in table means related term search.

Table 6. Restored Genes by EEAF Diet (Gostat)

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
acute-phase response	RT		7	1.6	1.1E-5	1.6E-2
acute inflammatory response	RT		9	2.1	7.4E-5	5.4E-2
immune response	RT		21	4.8	2.4E-4	1.1E-1
inflammatory response	RT		11	2.5	6.7E-3	9.2E-1
response to wounding	RT		14	3.2	9.2E-3	9.4E-1
negative regulation of transport	RT		6	1.4	9.8E-3	9.1E-1
regulation of apoptosis	RT		19	4.4	1.1E-2	9.0E-1
defense response	RT		16	3.7	1.2E-2	8.9E-1
regulation of programmed cell death	RT		19	4.4	1.2E-2	8.7E-1
negative regulation of secretion	RT		4	0.9	1.2E-2	8.5E-1
regulation of cell death	RT		19	4.4	1.3E-2	8.3E-1
positive regulation of T cell differentiation	RT		4	0.9	2.0E-2	9.2E-1
regulation of lipid metabolic process	RT		5	1.2	2.1E-2	9.1E-1
anti-apoptosis	RT		6	1.4	2.2E-2	9.0E-1
positive regulation of lymphocyte differentiation	RT		4	0.9	2.3E-2	9.0E-1
positive regulation of response to external stimulus	RT		4	0.9	2.5E-2	9.1E-1
positive regulation of immune system process	RT		9	2.1	2.9E-2	9.2E-1
positive regulation of apoptosis	RT		10	2.3	3.6E-2	9.5E-1

Table above provides typical batch annotation and gene-GO term enrichment analysis relevant GO terms associated with a given gene list. RT in table means related term search.

Table 7. Pathway Analysis of Restored Genes by EAAF Diet

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
Retinol metabolism	RT		7	1.6	1.7E-3	1.8E-1
PPAR signaling pathway	RT		7	1.6	3.7E-3	2.0E-1
Tryptophan metabolism	RT		5	1.2	6.7E-3	2.3E-1
Fatty acid metabolism	RT		5	1.2	1.0E-2	2.6E-1
Drug metabolism	RT		6	1.4	1.4E-2	2.7E-1
Arginine and proline metabolism	RT		5	1.2	1.8E-2	2.9E-1
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	RT		5	1.2	3.6E-2	4.6E-1
Toll-like receptor signaling pathway	RT		6	1.4	3.7E-2	4.2E-1
Histidine metabolism	RT		3	0.7	8.1E-2	6.6E-1
Acute myeloid leukemia	RT		4	0.9	9.4E-2	6.8E-1

Table above provides annotation on pathway-GO analysis relevant GO terms associated with a given pathway list. RT in table means related term search.

최근 비만이 당뇨병이나 심혈관 질환과 같은 성인병과 매우 밀접한 관계가 있다는 사실이 부각되면서 체중 감량에 대한 관심이 증가하고 있는데, 서양 의학계에서도 이러한 추세에 부응하여 ephedrine, sibutramine 등을 원래의 목적과 달리 식욕 억제, 체중 감량 보조 등의 목적으로 사용하는 경우가 있었으며, 이에 대한 임상연구도 진행된 바 있다²³⁾. 그러나 안전상의 이유로 식품의약품안전청에서는 이러한 약물들의 사용을 가급적 자제하도록 하고 있다. 또한 최근에는 감기 치료를 목적으로 만들어진 약물인 시모펜이 체중 감량 목적의 허위, 과대 광고로 시정 조치를 받기도 하였는데 이는 에페드린을 함유하고 있는 제제이다.

한의계에서도 비만 치료를 목적으로 다양한 요법을 개발, 제공하기 시작하였으며, 麻黃은 이 중 가장 대표적으로 응용된 약물 중의 하나라고 할 수 있다.

마황의 효능과 관련된 기존의 연구로는 신 등¹⁴⁾의 연구결과가 있는데, 그 내용을 살펴보면 太陰調胃湯과 麻黃을 연구 재료로 하여 비만 사료로 유발한 흰쥐의 비만을 관찰하였고 그 결과 太陰調胃湯과 麻黃 추출액이 실험 동물의 체중을 유의하게 감소시켰으며 두 약물간의 효능 차이는 없는 것으로 나타났고, 두 약물 모두 혈중의 triglyceride를 유의하게 감소시켰으나 total cholesterol 함량에는 영향을 미치지 못한 것으로 보고되었다. 또한 DNA chip을 사용하여 일부 유전자 발현의 변화를 보는 등 비교적 다양한 연구를 수행한 바 있는데, 처방 및 단일 약재 조 추출물의 수준에서 연구를 진행하였으므로 향후 약물 개발과는 거리가 있는 연구

라 생각된다.

한편 본 연구와 가장 연관성이 많은 마황 분획물을 이용한 연구로는 김¹⁸⁾과 정¹⁹⁾의 연구가 있는데 여기에 선 각각 hexane 분획과 chloroform 분획을 이용하였으며 본 연구의 결과와 비교를 해보면, total cholesterol과 glucose는 세 용매 분획에서 모두 유의한 감소를 보였고, triglyceride는 hexane 분획과 chloroform 분획에서 유의한 감소를 보였다. AST 수치는 chloroform 분획에서 유의한 증가를 보인 반면, hexane 분획과 ethyl-acetate 분획에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 고지혈증 유발에 의해 발현이 변화된 간 조직 유전자의 변화 억제율은 본 연구에서는 49%이고 chloroform 분획에서는 47%로 나타났다. 김¹⁸⁾의 연구는 주로 지질 대사의 변화와 항산화 효과와의 연관성에 대한 결과를 위주로 보고하였으며, 정¹⁹⁾의 연구는 유전자 발현의 변화도 함께 관찰한 것으로, 정¹⁹⁾의 연구가 본 실험과 유사한 방법을 사용하였는데, chloroform 분획의 경우 주로 steroid 생합성의 변화로 인한 지질 대사의 불균형을 직접적으로 조절하는 것이 아니라 DNA의 복제와 오류의 수정, RNA 분해 등과 같은 기본적인 기능을 하는 유전자를 조절함으로써 고지혈증을 억제하는데 간접적으로 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

본 연구는 예비 실험을 통해 생쥐에 고지방 식이를 제공함으로써 유발된 고지혈증에 마황 분획들을 투여하여 다양한 활성을 확인한 바 있으며 ethyl-acetate 분획(EAAF)이 혈청 중 지질 개선에 어떠한 과정을 거쳐 작용하는지 확인하기 위해 수행되었다.

실험 기간 동안 생쥐가 섭취한 사료와 음용수의 양이 연구결과에 영향을 미칠 수 있으므로 본 연구에서는 2 주간의 실험 기간 동안 사료 섭취량과 음수량을 관찰한 바 각 군 사이에 유의한 차이는 없었으며(Table 2), 이러한 결과는 EEAF가 식욕에는 영향을 미치지 않았음을 나타낸다.

4 주간의 고지방 식이 기간 이후 2주간의 약물 투여가 진행되었던 실험 기간 동안 혈청 중 total cholesterol 함량은 변화가 나타났음에도 불구하고 체중 변화에는 유의한 차이가 없었는데 이는 고지방 식이에 의해 체중의 변화 없이도 혈중 total cholesterol의 변화가 유도되는 결과를 보였다(Fig. 2, 3A). 이후 실험 기간을 연장하여 결과를 관찰한다면 조금 더 명확한 체중의 변화가 나타날 수도 있을 것으로 추정된다.

혈청 중 glucose 함량은 대사성 질환의 발생과 진행에 주요한 작용을 하는 것으로 알려져 있는데^{24,25)} 본 연구를 통해 EEAF 투여가 혈청 중 glucose 수치를 유의하게 감소시키는 결과를 보였으므로(Fig. 3D) 향후 EEAF를 다양한 대사성 질환에 적용하여 그 결과를 관찰할 필요가 있을 것으로 생각된다.

본 연구의 결과에서 6 주간의 고지방 사료 섭취 및 EEAF 투여는 실험 동물의 간 조직의 지방 조직에 영향을 미치지 못하였는데(Fig. 4), 이는 역시 고지방 식이의 기간이 비교적 짧은데 기인한 것으로 보인다.

유전자의 발현 변화와 ontology 분석을 통해 변화가 많은 상위 유전자들을 기능별 및 경로별로 분석한 결과 지질 대사에 관여하는 유전자들의 변화가 많이 관찰되었고, EEAF 투여는 이러한 유전자들의 변화를 효과적으로 조절하는 것으로 나타났으며(Table 3-7), 이러한 결과는 마황 chloroform 분획의 경우 지질 대사와는 직접적인 연관성 없이 혈중 지질 변화를 개선하는 것으로 보고한 정¹⁹⁾의 연구와는 다른 결과를 보이는 것으로 본 연구와 구별되는 중요한 특징이라 생각된다.

이상의 연구결과를 종합하면, 마황의 ethyl-acetate 분획인 EEAF는 고지혈증에서의 total cholesterol 및 혈당을 조절함으로써 고지혈증과 관련된 지표들을 개선하였으며, 이러한 과정에 지질 대사에 관여하는 유전자의 발현 조절이 있었음을 확인하였다.

이러한 결과를 통해 마황의 ethyl-acetate 분획인 EEAF는 향후 고지혈증 뿐만 아니라 다양한 대사성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결론

마황 ethyl-acetate 분획(EEAF)이 고지혈증 생쥐에서 혈청 중 지질 함량에 미치는 영향을 확인하기 위하여 고지방 식이를 투여하여 고지혈증을 유발하고, 2주간 EEAF을 투여한 다음 혈청 중 지질 함량을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. EEAF는 생쥐의 체중 증감에 영향을 미치지 못하였다.
2. EEAF는 고지혈증 유발에 의하여 상승된 혈청 중 total cholesterol 함량을 유의하게 감소시켰다.
3. EEAF는 혈청 중 AST 및 ALT 함량과 간 조직 지방의 분포에 영향을 미치지 않았다.
4. EEAF는 고지혈증에 의해 상승된 혈청 중 glucose 함량을 유의하게 감소시켰다.
5. EEAF는 고지혈증 유발에 의해 발현이 변화된 간 조직 유전자의 변화를 약 49% 정도 억제하였다.

감사의 말씀

이 논문은 2013년도 동의대학교 교내 연구비 지원에 의해 연구되었음(과제번호 : 2013AA100)

참고문헌

1. Kleiman S, Ng SW, Popkin B. Drinking to our health: can beverage companies cut calories while maintaining profits? *Obes Rev.* 2012; 13(3):258-274.
2. Korean National Statistical Office. The statistics of life table 2008 [Internet]. Daejeon: Korean National Statistical Office, 2009. Available from: http://kosis.kr/common/meta_onedepth.jsp?vwcd=MT_CTITLE&listid=117_11702.
3. George A. Bray. 대한가정의학회 비만연구회편역. 비만치료의 최신지견. 서울:한미의학. 2005; 20-41.
4. George A. Bray. 대한비만학회편역. 비만의 진단과 치료. 서울:도서출판한의학. 2003;8-10,19-27, 37-56.

5. Eugenia E, Micahel J, Jennifer M, Carmen-rodrigue Z. Body mass index and mortality in a prospective cohort of US adults. *N Engl J Med*. 1994;341(51):1097-105.
6. Hwang GH, Huh YR. A study of hyperlipidemia in Koreans - Specially related to physical characteristics and it's risk factors for hypercholesterolemia. *Korean J Food Nutr*. 1999; 12(3):279-289.
7. Youh EJ, Seo BK, Huang B, Kim JI, Kang SK. *Artemisia capillaries* Herbal Acupuncture Improves Metabolic Abnormalities in High Fat Diet-induced Obese ICR Mice, *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2011;28(1):1-14.
8. Ryu HS, Kim SP, Kim SM, Lee DG, Lee OJ, Lee JH, Wei TS. The Effects of *Rhei Radix et Rhizoma* Pharmacopuncture at Bi-Su (BL20) on the Obese Rars Induced by High Fat Diet. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2012;29(3):9-18.
9. Kim DJ, Jung JH, Kim SG, Lee HK, Lee SK, Hong HD, Lee BY, Lee OH. Antioxidants and Anti-obesity Activities of Hot Water and Ethanolic Extracts from *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Preserv*. 2011; 19(3):366-373.
10. Lee CM, Lee TJ, Kim BH. Improving Effect of *Cudrania Tricuspidata* Ethanol Extract on Lipid Profile and Blood Glucose in HFD-induced Obese Mice. *Journal of Investigative Cosmetology*. 2011;7(3):309-318.
11. Kim GT, Go H, Shin SM, Kim HJ. Study of the Efficacy and Safety of "adenophorae radix extract" in the Obese Patients or Overweight. *THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY*. 2007;7(1):39-54.
12. 전국한의과대학본초학교수공저. 본초학. 서울:영림사. 2004;154-156.
13. Shin DJ, Kim AL, Kim SH. Study of the Effects of Tae-Eum-Jo-Wi-Tang and *Ephedrae Herba* on Changes of Leptin Level in the Obese Rats. *Journal of Sasang Constitutional Medicine*. 2001;13(1):79-87.
14. Park JM, Kim HJ, Kim JA, Kim SJ, Ko BP. The Effects of *Evodia Rutaecarpa* and *Ephedra Sinica* on the Resting Metabolic Rate and Body Composition of Obese Women on a Low-Calorie Diet: A Double-blinded Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Korean Oriental Medicine*. 2005;26(3):249-262.
15. Joh HG, Yang JM, Kim DI. Effects of the oral administration of *Ephedra Sinica* Extract on suppression of body weight gains and the DNA chip expression of obese rats. *THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY*. 2007;20(3):65-80.
16. Lee YJ, Lee MJ. The efficiency of *Ephedrae herba* on the obese zucker rat's lipid of blood serum and fatty acid metabolism of skeletal muscles. *The Journal of the Korean Academy of Oriental Rehabilitation Medicine*. 2005;33(3):99-111.
17. Kim KM. Effects of *Ephedra Herba* Hexane Fraction (EH1) on lipid levels in serum and lipid accumulation in liver tissue in Hyperlipidemic mice. Seoul: Graduate School of Dongguk University;2012.
18. Jung HY. Effects of *ephedra herba* chloroform fraction on hyperlipidemic mice. Busan: Graduate School of Dong-Eui University;2013.
19. Oh MK. Research Trends of Bioinformatics Using DNA Microarray Data. *Prospectives of Industrial Chemistry*. 2006;9(5):43-48.
20. Kim SC, Lee JW, Kim BS. A Concordance Study of the Preprocessing Orders in Microarray Data. *The Korean Journal of Applied Statistics*. 2009;22(3):585-594.
21. 식품의약품안전청. 대한약전(제9개정). 서울:신일북스. 2008;922-923.
22. Park HB, Kim KS, Kim BT, Lee KW, Ahn CW, Choi WH. Double-blind, Randomized, Multi-center, Comparative Clinical Trial of *Sibutramine Mesilate* with *Sibutramine Hydro-*

- chloride for Evaluating Efficacy and Safety in Obese Patients. *The Journal of Korean Society for the Study of Obesity*. 2008;17(2): 82-90.
24. 윤지성. 식후 고혈당과 심혈관질환. *임상당뇨병*. 2012;13(1):18-22.
25. Sheu WH, Rosman A, Mithal A, Chung N, Lim YT, Deerochanawong C, Soewondo P, Lee MK, Yoon KH, Schnell O. Addressing the burden of type 2 diabetes and cardiovascular disease through the management of postprandial hyperglycaemia: an Asian-Pacific perspective and expert recommendations. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;92:312-321.