

고지방식으로 비만을 유도한 C57BL/6 마우스에서 SM17의 항산화 및 항비만 효과

김수현^{1#}, 김수지¹, 김경조¹, 이아름¹, 노성수¹, 이영철^{2*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 상지대학교 한의과대학 본초학교실

Antioxidant and Anti-Obesity Effect of SM17 in High-Fat Diet Induced C57BL/6 Mice

Soo Hyun Kim^{1#}, Su Ji Kim¹, Kyeong Jo Kim¹, Ah Reum Lee¹,
Seong-Soo Roh¹, Young Cheol Lee^{2*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

2 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Sangji University, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Obesity is caused by the excess accumulation of fat in the body due to energy imbalance, and it causes various diseases. The aim of this study was to investigate an anti-obesity efficacy and an antioxidant activity of water from herbal mixture extract (SM17).

Methods : The antioxidant activities were evaluated through radical scavenging assays using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radicals. To evaluate anti-obesity effect of SM17, we used a high fat diet fed mouse model. The SM17 (150 mg/kg body weight/day, p.o.) was treated every day for 6 weeks to C57BL/6 mice. Body weight and food intake were measured every day. The changes of reactive oxygen species (ROS), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglycerids (TG) and total cholesterol (TC) in serum were analyzed after experiment. Also, expression of lipid metabolism related proteins were investigated by western blot analysis.

Results : It was effective in antioxidant measurements, SM17 administration inhibited the biomarkers of lipid metabolism in serum and tissues. The administration of SM17 showed a significant reduction of body and tissue weight. Moreover, it decreased ROS, ALT, AST, TG and TC in serum, compared with those of the obese mice. Adipogenesis-related protein expressions increased in obese mice compared to normal mice. However, SM17 group exhibited the down-expression of these proteins.

Conclusion : A SM17 aqueous extract has a great effect on the stimulation (AMPK) activation, and may have a benefit to reduce a fatty acid metabolism through inhibition of lipid accumulation.

Key words : High fat diet, C57BL/6, herbal mixture extract (SM17), reactive oxygen species, AMP-activated protein kinase

*Corresponding author : Young Cheol Lee, College of Korean Medicine, Sangji University, Wonju-si, Gangwon-do 26339, Republic of Korea.

· Tel : +82-33-765-2072 · Fax : +82-33-730-0653 · E-mail : lyc072@sj.ac.kr

#First author : Soo Hyun Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : hyunsk0513@gmail.com

· Received : 12 August 2017 · Revised : 2 September 2017 · Accepted : 15 September 2017

I. 서론

비만은 에너지 섭취와 신체활동의 감소로 인하여 소비의 불균형으로 남은 에너지가 과도하게 축적되는 상태를 말하는 데¹⁾, 현대사회에서는 서구화된 식생활과 환경의 변화에 따라 비만 인구가 급증하고 있다²⁾. 비만이 위험한 이유는 고지혈증과 심혈관계 질환 같은 성인병³⁾, 암 뿐만 아니라 신경퇴행성 질병의 발생을 증가시키는 요인⁴⁾으로 작용하기 때문이고 최근 이러한 비만으로 인한 대사증후군의 발생률이 해마다 증가하고 있다⁵⁾.

체내 항산화 시스템의 불균형으로 인한 지질과산화물의 형성은 비만과 밀접한 관계를 가지고 있다⁶⁾. 지방이 몸으로 축적될 경우 지질과산화물이 형성되고 체내 산화스트레스가 증가하게 되는데⁷⁾ 이때 과도하게 생성된 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)은 세포를 손상시키는 작용을 한다⁸⁾.

세포 내에서 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 에너지의 항상성 유지 센서 역할을 하는 중요한 효소이며, 지방 대사 조절에 있어서도 중요한 역할을 한다. AMPK가 활성화되어 인산화가 이뤄지게 되면 지방 합성 기전에 관여하는 효소들이 비활성화 되고 이는 지방산 합성 감소로 나타난다⁹⁾. 비만에 의해 증가되어진 산화적 스트레스가 각종 질병의 원인을 제공함으로 체내 항산화 시스템을 이용하여 산화적 스트레스를 억제하고 예방할 수 있는 연구를 필요로 한다¹⁰⁾.

한편 전 세계적으로 비만 치료제의 개발을 위한 다양한 연구가 진행되고 있는 가운데 현재 비만 치료제인 Orlistat 같은 성분은 부작용을 유발할 수 있어 장기적인 사용은 금하고 있으며¹¹⁾, 사용 기준이 강화되는 등의 논란이 일고 있어 우수한 효능과 함께 안전성이 높은 물질의 개발이 요구되고 있다¹²⁾. 식물체에는 다양한 항산화 물질을 함유하고 있는데, 이는 질병의 원인으로 알려져 있는 유리 라디칼에 의한 손상으로부터 생체를 보호하는 중요한 유효성분으로 주목을 받고 있다¹³⁾.

이에 본 연구에서는 항비만 소재로 알려진 한약재 중 선행 연구를 통하여 10가지 항비만 소재 (丁香, 肉桂, 綠茶, 五味子, 鬱金, 何首烏, 桑白皮, 竹葉, 羊乳根, 夜關門)를 선정하였으며, 각 추출물을 배합하여 항비만 효과에 대해 알아보고 소재 간의 시너지 효과를 분석함으로써 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 실험을 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

4주령 옹성 C57BL/6 mouse (오리엔트, 서울)를 구매하여, 물과 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사)를 충분히 공급하며 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험은 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회의 승인 DHU2017-041을 얻어 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 22 ± 2°C, 습도 50 ± 5%, 명암주기는 12시간 주기로 조절하였다. 정상

군은 일반사료 (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)를 급여하고, 고지방식이군은 Diet사에서 구입한 60% high-fat diet (HFD; Diet 12492, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA)를 매일 새롭게 공급하였다.

2. 시료 추출

본 실험에 사용한 丁香, 肉桂, 綠茶, 五味子, 鬱金, 何首烏, 桑白皮, 竹葉, 羊乳根, 夜關門은 옹기한약국 (대구, 한국)에서 구입한 것을 생약 규격집에 맞추어 약전규격에 합격한 것만을 정선하여 사용하였다.

각 약재는 200 g에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 감압 추출장치로 농축한 후 동결 건조기를 이용하여 완전 건조시켜 파우더를 얻었으며 이들 냉동 (-80°C) 보관하였고 10가지 한약재 동일한 비율로 혼합한 것을 "SM17"로 하였다.

Table 1. The Yield Of Herbal Extracts

No.	Scientific name	Yield (%)
1	<i>Syzygium aromaticum</i> Merrill et Perry	3.7
2	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	22.2
3	<i>Camellia sinensis</i> O.Kuntze	19.9
4	<i>Schisandra chinensis</i> Baillon	27.7
5	<i>Curcuma longa</i> Linne	7.2
6	<i>Polygonum multiflorum</i> Thunberg	28.0
7	<i>Morus alba</i> Linne	6.9
8	<i>Sasa borealis</i>	6.2
9	<i>Codonopsis lanceolata</i> (S. et Z.)	27.3
10	<i>Lespedeza cuneata</i> ,	13.1

3. 시약

본 실험에 사용된 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic은 Sigma Aldrich (St Luis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 ECL Western Blotting Detection Reagents는 GE Healthcare (Arlington Height, IL, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Histone, AMP-activated protein kinase (AMPK), phospho-AMP-activated protein kinase (p-AMPK), Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) sterol regulatory element-binding

transcription factor 1 (SREBP-1)와 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas CA, USA)로부터 구입해서 사용하였다. 단백질 정량을 위한 Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였으며 triglyceride (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) assay kit는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다.

4. 항산화 활성 측정

1) DPPH free radical 소거 활성 측정

항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH free radical 소거 활성을 측정하였으며 시료 중에 포함된 항산화 물질의 양을 측정하는데 사용되는 대표적인 실험법이다. 일정농도의 시료 100 μ l과 60 μ l DPPH 용액을 100 μ l 넣고 혼합한 후, 실온에서 30분간 반응 시켰다. 이 반응액을 UV spectrophotometer (UV1800, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 사용하여 측정하여 산출하였다. 흡광도를 50% 감소 시키는데 필요한 시료의 양을 IC₅₀ 값으로 하여 나타내었다.

2) ABTS free radical 소거 활성 측정

한방 복합물의 항산화 효능을 평가하기 위하여 ABTS free radical 소거활성을 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM Potassium persulfate를 증류수에 녹인 다음 12시간동안 차광하여 반응시킨 후, 이 반응액을 734 nm에서 ethanol을 이용하여 흡광도 0.70 \pm 0.02로 보정하였다. ABTS 용액 95 μ l에 시료 5 μ l를 첨가하고 15분 동안 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다¹⁴⁾.

5. 항비만 효능 평가

1) C57BL/6 마우스를 이용한 비만 유발 동물모델

모든 마우스는 일정한 시간에 1회/1일 체중 및 사료 섭취량을 측정하였다. 실험군은 각 군별로 7마리씩 3군으로 나누어 1주일간 적응시킨 후 고지방식이 대조군 (Con)은 증류수를, 약물투여군은 150 mg/kg/day 농도로 존대 (Zonde)를 이용하여 6주간 경구 투여하였다. 실험종료 하루 전 12시간 절식시킨 후 실험종료당일 마취해 혈액 채취하여 30분 이내에 4,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 혈장을 분리하여 -80°C 냉동고에 보관하였고, 실험동물의 간 조직과 부고환 지방조직은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 -80°C에 보관하였다. 부고환 지방조직의 무게는 몸무게에 나누어 측정하였다.

2) 산화적 스트레스 바이오마커 측정

산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS 값은 혈청과 25 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분

부터 매 5분씩 emission 파장 530 nm와 excitation 파장 485 nm를 이용하여 30분간 측정한 산출 값을 계산하였다.

3) 혈액 지질 및 간 손상 지표 분석

심장에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm, 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻었다. 마우스 혈청의 triglyceride (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

4) 조직 Western blotting

세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (BioSpec Product, Oklahoma, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정지시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 행구고 100 ml의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유 시킨 뒤 10분마다 vortex을 3번 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 간 조직 세포질의 AMPK, p-AMPK와 세포핵의 Histone, SREBP-1, PPAR α 단백질 발현을 측정하기 위하여 10 μ g의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co, Ltd, Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)프로그램을 사용하여 정량하였다.

5) 조직학적 관찰

주요 장기들에 대한 조직병리학적 관찰을 수행하기 위해 간 조직과 지방조직을 10% neutral buffered formalin에 24 시간 동안 고정시킨 다음 graded alcohol로 탈수시키고, 파라핀으로 포매하여 block을 제작한 다음 microtome으로 4 mm 두께의 조직 절편을 제작하여 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 시행한 뒤 xylene clearing을 거쳐 permount로 처리한 후 광학현미경위에서 조직 또는 장기별 특이 병변의 유무를 관찰하였다.

6. 통계분석

모든 수치는 평균과 표준오차로 표시하였으며, SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하여 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 p -value < 0.05에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 항산화 활성

DPPH free radical 소거능 측정방법과 ABTS free radical 소거능 측정방법을 이용하여 한방복합 추출물을 측정하였으며, 대조군으로는 항산화 효과로 널리 알려진 L-ascorbic acid을 사용하였다. 대조군인 L-ascorbic acid는 DPPH와 ABTS에서 free radical 소거능 을 각각 ($IC_{50} = 1.15 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$), ($IC_{50} = 3.08 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$)로 나타났으며 SM17의 DPPH free radical 소거능 IC_{50} 값은 $99.16 \pm 0.60 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났고, ABTS free radical 소거능 IC_{50} 값은 $215.74 \pm 7.63 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다 (Table 1).

Table 2. Anti-oxidant Effects Of SM17

Sample	Radical scavenging activity (IC_{50})	
	DPPH free radical	ABTS free radical
L-ascorbic acid	$1.15 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$	$3.08 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$
SM17	$99.16 \pm 0.60 \mu\text{g/ml}$	$215.74 \pm 7.63 \mu\text{g/ml}$

2. 체중 변화율과 식이섭취량 및 지방 조직 무게 측정

고지방식으로 유도된 동물모델에서 한방 복합 추출물 투여가 식이섭취량과 체중변화, 지방조직 무게 변화에 미치는 영향을 조사해본 결과, 체중 증가량은 정상군 ($6.86 \pm 0.50 \text{ g}$ ($p < 0.01$))에 비하여 대조군 ($11.02 \pm 3.28 \text{ g}$)은 유의성있게 체중 증가량이 증가하였으며 SM17 투여군은 ($6.13 \pm 0.94 \text{ g}$ ($p < 0.01$))으로 나타나 체중변화는 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈다.

식이섭취량은 정상군 ($4.09 \pm 0.69 \text{ g}$)에 비하여 대조군 ($2.54 \pm 0.20 \text{ g}$)은 감소하였고 SM17투여군 ($2.23 \pm 0.21 \text{ g}$) 나타났고 각 군 간의 유의성은 없었으며 고지방식으로 유도된 동물모델에서 조직 부고환지방 무게를 측정할 결과, 정상군 ($5.76 \pm 1.62 \text{ g/kg}$ ($p < 0.001$))에 비하여 대조군 ($18.47 \pm 4.03 \text{ g/kg}$)은 유의성있게 부고환지방 무게는 증가하였으며 SM17 투여군 ($14.86 \pm 2.71 \text{ g/kg}$ ($p < 0.05$))은 유의한 감소를 나타냈다 (Table 3).

Table 3. Initial And Final Body Weight, Body Weight Change, Food Intake And WATs Weight In C57B/6 Mice

Group	Body weight			Food intake (g/day)	WATs weight (g/kg body weight)
	Initial (g)	Final (g)	Gain (g)		
Nor	20.53 ± 0.58	$27.39 \pm 0.70^{**}$	$6.86 \pm 0.50^{***}$	4.09 ± 0.69	$5.76 \pm 1.62^{***}$
Con	20.11 ± 1.74	31.12 ± 3.65	11.02 ± 3.28	2.54 ± 0.20	18.47 ± 4.03
SM17	21.03 ± 0.91	$27.16 \pm 1.56^{**}$	$6.13 \pm 0.94^{***}$	2.23 ± 0.21	$14.86 \pm 2.71^*$

Nor: normal mice, Con: high fat diet mice, SM17: high fat diet with treatment SM17 150 mg/kg body weight mice. All data are expressed means \pm SEM, n=6 mice per group. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. high fat diet mice.

3. 혈청의 ROS 측정

혈청을 이용하여 산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS를 측정할 결과, 정상군 ($102939.4 \pm 15008.8 \text{ fluorescence/min/mg}$ ($p < 0.05$))에 비하여 대조군 ($117604.0 \pm 14754.8 \text{ fluorescence/min/mg}$)은 유의성있게 증가하였으며 SM17 투여군 ($94032.0 \pm 13068.3 \text{ fluorescence/min/mg}$ ($p < 0.01$))은 유의성있는 감소를 나타냈다 (Fig. 1).

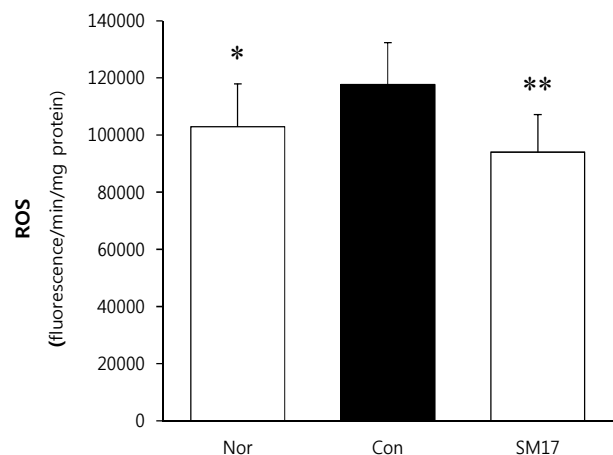
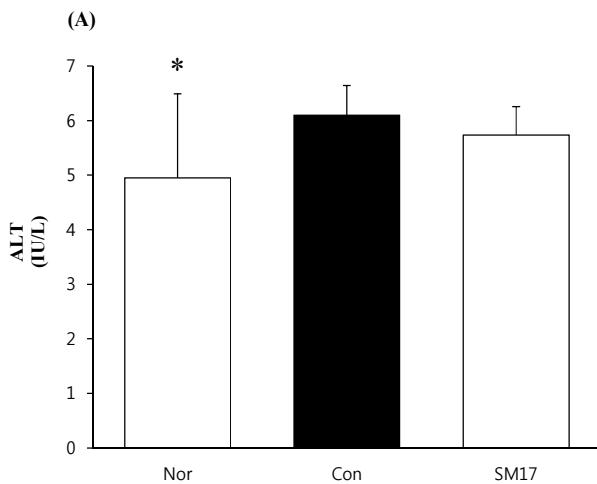


Fig. 1. Oxidative stress biomarkers reactive oxygen species (ROS) in serum.

Nor: normal mice, Con: high fat diet mice, SM17: high fat diet with treatment SM17 150 mg/kg body weight mice. All data are expressed means \pm SEM, n=6 mice per group. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. high fat diet mice.

4. 혈청 내 ALT 및 AST 측정

혈액에서 혈청을 분리하여 혈청 내 간 손상 지표인 ALT 및 AST 측정 하였다. ALT 측정 결과, 정상군 {4.95 ± 1.54 IU/L ($p < 0.05$)}에 비하여 대조군 (6.10 ± 0.54 IU/L)은 유의성있게 증가하였고, SM17 투여군 (5.73 ± 0.52 IU/L)은 유의성은 나타나지 않았으나 감소하는 경향으로 나타났다



(Fig. 2A).

혈청 내 AST 측정 결과, 정상군 {53.95 ± 15.54 IU/L ($p < 0.05$)}에 비하여 대조군 (67.28 ± 15.04 IU/L)은 유의성있게 증가하였고, SM17 투여군 {42.05 ± 10.44 IU/L ($p < 0.01$)}은 유의성있게 감소하였다 (Fig. 2B).

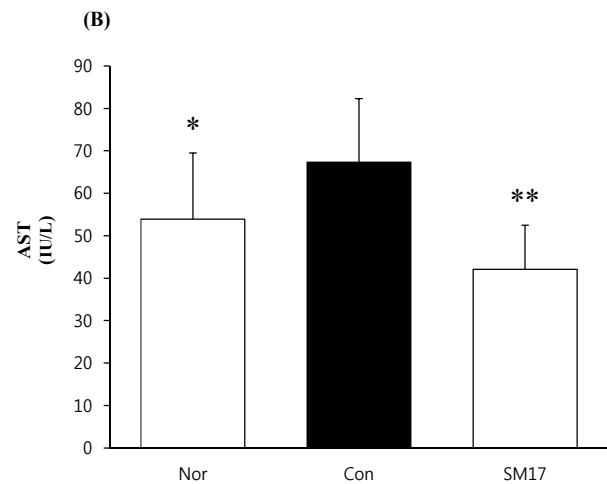


Fig. 2. Aminotransferase (ALT) and Aspartate Amino-transferase (AST) in serum.

(A); ALT, (B); AST. Nor: normal mice, Con: high fat diet mice, SM17: high fat diet with treatment SM17 150 mg/kg body weight mice. All data are expressed means ± SEM, n=6 mice per group. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. high fat diet mice.

5. 혈청 내 TG 및 TC 측정

혈액에서 혈청을 분리하여 혈청 내 중성지방 함량 및 총콜레스테롤 함량을 측정하였다. 혈청 내 TG 측정 결과, 정상군 {67.53 ± 5.75 mg/dl ($p < 0.001$)}에 비하여 대조군 (89.08 ± 10.34 mg/dl)은 유의성있게 증가하였고, SM17 투여군 {15.08 ± 0.9 mg/dl ($p < 0.001$)}은 대조군에 비해 유의성있게 감소

하였다 (Fig. 3A).

혈청 내 TC 측정 결과, 정상군 {799.89 ± 5.14 mg/dl ($p < 0.001$)}에 비하여 대조군 (813.82 ± 4.63 mg/dl)은 유의성있게 증가하였고, SM17 투여군 (811.0 ± 5.14 mg/dl)은 유의성은 나타나지 않았으나 대조군에 비해 감소하는 경향으로 나타났다 (Fig. 3B).

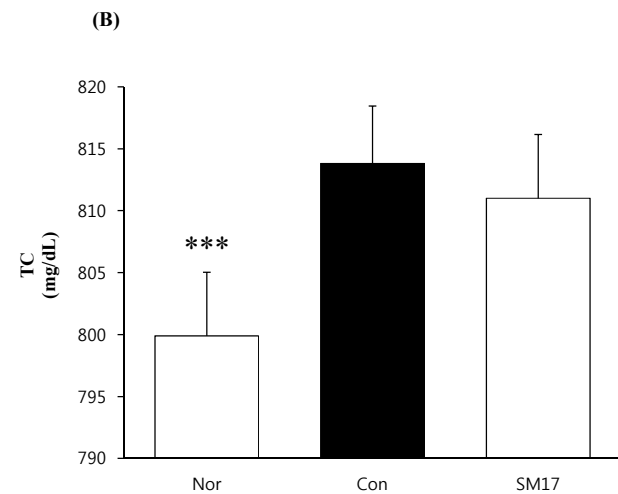
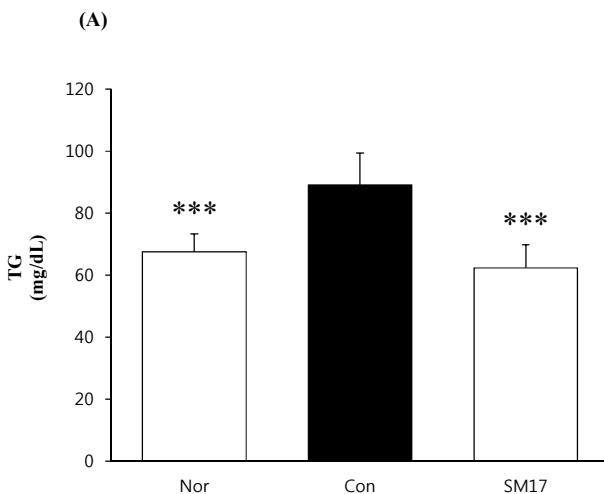


Fig. 3. Triglycerids (TG) and total cholesterol (TC) in serum.

(A); TG, (B); TC. Nor: normal mice, Con: high fat diet mice, SM17: high fat diet with treatment SM17 150 mg/kg body weight mice. The effects of SM17 treated mice were compared with those of normal and control mice. All data are expressed means ± SEM, n=6 mice per group. Significance: *** $p < 0.001$ vs. high fat diet mice.

6. 간 조직에서 지질대사 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

간 조직에서 western blot을 실시하여 지질대사 관련 단백질인 AMPK, p-AMPK, PPARα와 SREBP-1을 측정하였다. 그 결과 p-AMPK는 정상군 (1.0 ± 0.21)과 비교하였을 때 대조군 (0.60 ± 0.32)에서 단백질 발현이 감소하였다. 대조군에 비하여 한방 복합물 투여군 (1.0 ± 0.20)은 유의성은 없었으나 감소하는 경향으로 나타났다 (Fig. 4A).

PPARα는 정상군 (1.0 ± 0.09)과 대조군 (0.95 ± 0.15)을 비교하였을 때 대조군은 감소하는 경향으로 나타났으며 대조군에 비하여 한방 복합물 투여군 (0.64 ± 0.14)은 유의성은 없었으나 감소 경향으로 나타났다 (Fig. 4B).

SREBP-1는 정상군 (1.0 ± 0.25)과 비교하였을 때 대조군 (1.19 ± 0.12)은 증가하는 경향으로 나타났으며 대조군에 비하여 한방 복합물 투여군 (0.62 ± 0.11 (*p* < 0.05))은 유의성있게 감소를 나타냈다 (Fig. 4C).

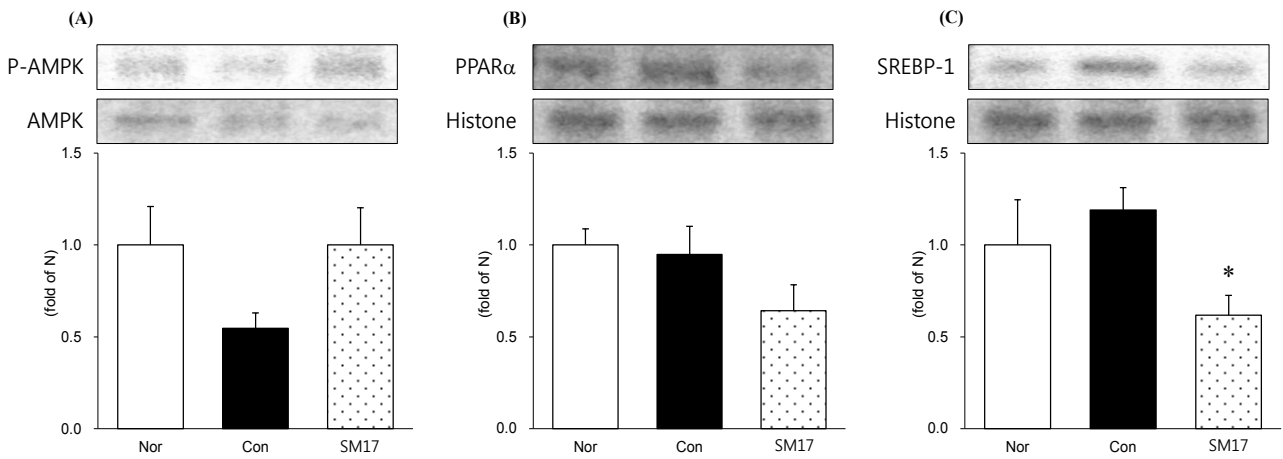


Fig. 4. Expression triglyceride synthesis protein in liver tissue. Western blot analysis of AMPK, p-AMPK, PPARα, SREBP-1 expression; (A), p-AMPK, (B), PPARα, (C), SREBP-1. expression levels in the liver tissue. .Nor: normal mice, Con: high fat diet mice, SM17: high fat diet with treatment SM17 150 mg/kg body weight mice. The effects of SM17 treated mice were compared with those of normal and control mice. All data are expressed means ± SEM, n=6 mice per group. Significance: **p* < 0.05 vs. high fat diet mice.

7. 간 조직학적 분석

부검 후, 적출한 간 조직을 H&E염색을 한 다음, 광학 현미경을 이용하여 관찰한 결과, 정상군 (A)에 비하여 대조군 (B)에서는 혈관 주위의 염증 정도와 지방의 크기가 늘어남을 관찰할 수 있었으며 한방 복합물 투여군 (C)에서는 비교적 염증과 지방이 감소를 관찰할 수 있었다 (Fig. 5).

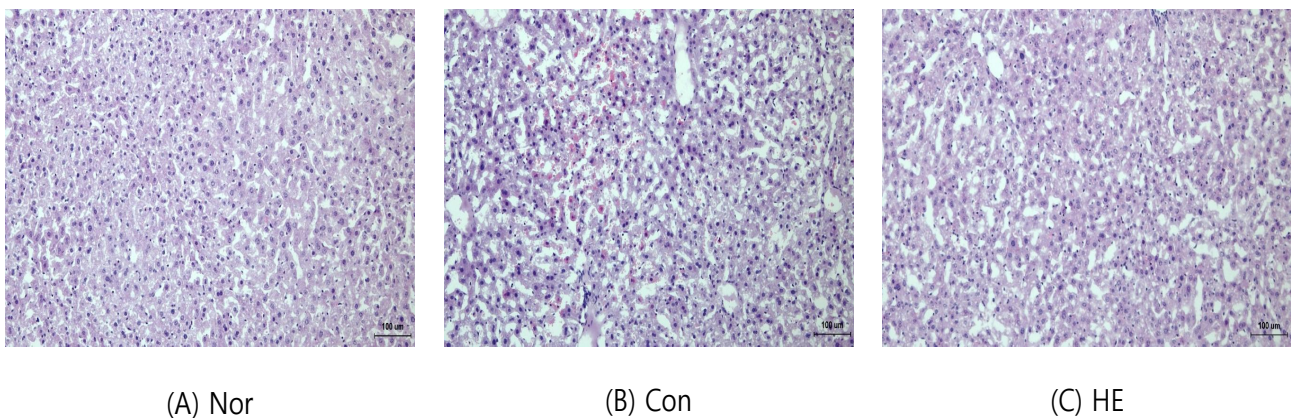


Fig. 5. Effect of SM17 on the histopathological change liver tissues of high-fat-diet mice. Liver tissues were stained with H&E (Original magnification × 100). (A) Nor; normal diet mice, (B) Con; high fat diet mice, (C) SM17; high fat diet treated with SM17 150 mg/kg body weight mice.

8. 부고환 지방 조직학적 분석

부검 후, 적출한 부고환 지방 조직을 H&E염색을 한 다음, 광학 현미경을 이용하여 관찰한 결과, 정상군 (A)에 비하여 대조군 (B)에서는 지방세포의 크기가 증가하였고 한방 복합물 투여군 (C)에서는 지방세포의 크기가 감소함을 관찰하였다 (Fig. 6).

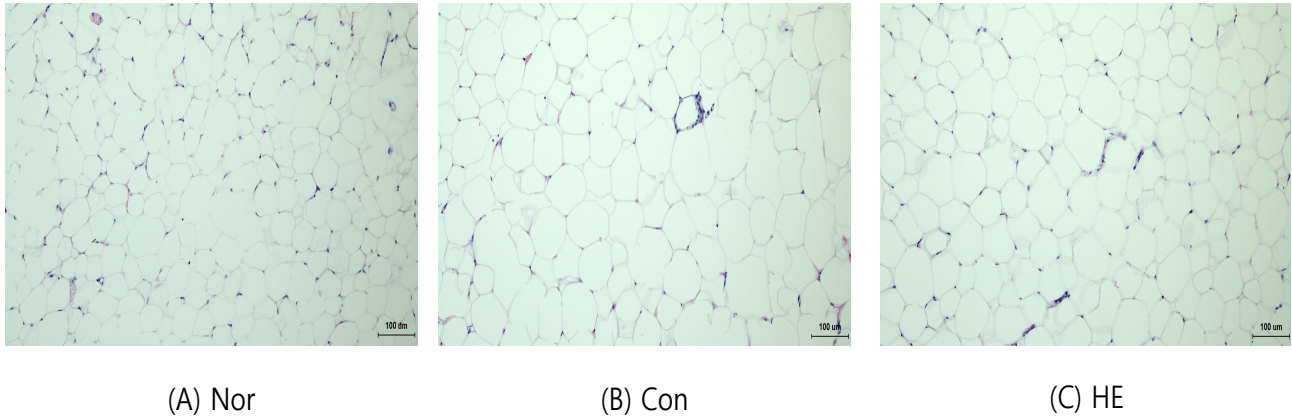


Fig. 6. Effect of SM17 on the histopathological change epididymis fat tissues of high-fat-diet mice.

FAT tissues were stained with H&E (Original magnification $\times 100$).

(A) Nor; normal diet mice, (B) Con; high fat diet mice, (C) SM17; high fat diet treated with SM17 150 mg/kg body weight mice.

IV. 고 찰

비만은 체내에 대사장애로 인해 지방이 과도하게 축적된 상태를 말하며¹⁵⁾, 다양한 질병을 일으킬 수 있는 위험 요인으로 보고 되어 있다. 비만은 동맥경화, 고혈압 같은 심혈관계 질환, 골관절염 같은 근골격계 계통의 질환 뿐만 아니라, 암 발생을 증가시키기 때문에 예방 및 치료가 매우 중요하다¹⁶⁾. 비만의 치료법으로는 운동요법, 식이요법, 약물치료 및 수술치료법 등이 시행되고 있으며¹⁷⁾, 이 중에서도 약물치료법이 가장 대중적인 치료법이다. 현재 사용되는 항비만 전문의약품은 orlistat가 대표적이며 체내에 섭취된 지방의 소화와 흡수를 억제하는 작용을 하여 항비만 효과가 뛰어나지만 장기 복용하였을 때 여러 부작용이 나타나는 것으로 밝혀졌다. 따라서 최근에는 부작용을 줄이고 안전하게 사용할 수 있는 비만 치료 한약제에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다¹⁸⁾.

선행 연구를 통하여 항비만 효과를 나타낸 한약재 (丁香, 肉桂, 綠茶, 五味子, 鬱金, 何首烏, 桑白皮, 淡竹葉, 羊乳根, 夜關門)를 선정하였고, 한약재 추출물을 동일한 비율로 혼합하여 고지방식이로 유도된 비만 마우스에 경구 투여한 후, 항비만 및 항산화 효과를 확인하였다.

한방 복합물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH free radical 측정법과 ABTS free radical 측정법을 이용하여 한방 복합물의 free radical 소거 활성을 측정한 결과 항산화 효과를 나타냈다.

비만을 유발하기 위하여 4주령 C57BL/6 마우스를 1주일간 적응기간을 거친 후 60% Kcal 고지방식이로 비만을 유도하였으며 약물투여군은 한방 복합물을 150 mg/kg로 6주간 경구

투여를 한 후 부검하여 얻은 혈청 및 지방조직을 분석하여 지질 대사의 저해 활성 및 항산화 효과를 평가하였다. 한방 복합물의 항비만 효과를 알아보기 위해 고지방식이로 6주간 먹인 마우스를 실험기간 종료 후 체중 증가량 및 지방조직 무게를 측정하였다. 식이 섭취량은 각 군간의 유의성 없었으며 체중 변화와 지방 조직 무게는 대조군은 유의한 증가를 나타냈으나 한방 복합물 투여군에서는 이를 각각 유의하게 감소시켰다.

ROS는 항산화 시스템의 불균형으로 ROS의 생성은 세포 손상을 일으키며 각종 염증반응 관련이 있고¹⁹⁾ ROS는 지질의 과산화물을 유발함으로써 심혈관계 질환 발병과 진행하는 역할을 하게 된다²⁰⁾. 본 실험에서는 혈청을 분리하여 산화 스트레스 바이오 마커인 ROS를 측정하였다. 대조군은 유의한 증가를 나타내었고 한방 복합물 투여군에서는 이를 감소시켰다.

ALT는 간 조직에 다량 분포하며, ALT는 간 손상의 지표로 활용되는데 약물이나 스트레스 등에 의한 간조직 손상으로 인해 나타난다. 비만으로 인해 간에 지방이 축적이 이루어 지고 지방 과산화물의 생성은 활성 산소종을 발생시켜, 간손상을 유발시키고 이들 효소의 증가를 나타낸다²¹⁾. 혈청 내 ALT와 AST 측정된 결과, 대조군은 각각 유의한 증가를 나타내었고 한방 복합물 투여군에서는 ALT는 감소하는 경향을 나타내었고 AST는 이를 유의하게 감소시켰다. 대조군은 고지방식이로 인하여 높은 열량을 섭취하여 간에 지방이 축적되어 간손상에 영향을 미치는 것으로 판단되었고, 한방 복합물이 지방 축적을 억제하여 ALT, AST 수치를 감소시키는 것으로 사료된다.

간은 TG를 포함하는 cholesterol를 생합성하는 주요 기관으로 간에서 합성되어진 TG는 대사 불균형으로 인해 과다생성되고, 간에 축적되어 지방간을 유발한다²²⁾. 혈청 내 중성지방

함량은 대조군에서 유의한 증가를 나타내었고 한방 복합물 투여군은 대조군에 비해 30.05% 유의하게 감소시켰다.

간에서 합성되는 cholesterol은 지질을 기초로 하며 TC는 비만일수록 증가하는 경향을 나타낸다²³⁾. 혈청 내 총 콜레스테롤 함량은 대조군은 유의한 증가를 나타내었고 한방 복합물 투여군에서는 감소하는 경향으로 나타났다. 비만으로 인해 혈액 내 지질 및 콜레스테롤 축적은 한방 복합물 경구투여로 인해 지방 합성 억제를 통한 체내 지방 축적을 억제하는 것으로 사료된다.

지질대사와 관련된 단백질을 분석하기 위하여 간 조직에서 AMPK, PPAR α , SREBP-1을 측정하였다. serine/threonine kinase의 일종인 AMPK는 세포 내 에너지 상태를 감지하는 센서로 알려져 있는 효소이며 AMPK는 지방산, 콜레스테롤 등의 합성을 억제하고 반대로 ATP를 생산하는 과정으로써 지방산 산화, 해당과정을 활성화시킨다²⁴⁾. 한방 복합물 경구투여는 AMPK 단백질 발현을 대조군에 비하여 82.72% 증가시켰다. 또한 간에서의 AMPK활성은 SREBP-1의 발현을 억제시켜 SREBP-1의 표적 유전자들의 발현에 영향을 주어 지방 합성을 억제시킨다²⁵⁾. 한방 복합물 경구투여는 SREBP-1 단백질 발현을 48.11% 감소시켰다.

항비만 효과를 평가하기 위하여 간 조직 내의 AMPK 활성화 관련 단백질을 분석한 결과, 한방 복합물 투여군을 대조군과 비교하여 p-AMPK 발현을 증가시키고 SREBP-1과 PPAR α 단백질 발현을 감소시키는 것으로 나타났는데 AMPK 인산화를 통하여 활성화시 SREBP-1의 발현을 억제 시키고 PPAR α 의 발현을 증가시키는데 한방 복합물 경구투여는 PPAR α 단백질 발현이 감소하는 경향으로 나타났기에 지방산 산화 경로를 경유하지 않는 것으로 사료되나 SREBP-1의 억제를 통해 항비만 효과가 있는 것으로 판단된다.

V. 결 론

본 연구에서는 항비만 효과를 보이는 한약재 (丁香, 肉桂, 綠茶, 五味子, 鬱金, 何首烏, 桑白皮, 淡竹葉, 羊乳根, 夜關門)를 동일한 비율로 혼합하여 만든 복합물인 SM17을 고지방 식이로 비만이 유도된 마우스에 경구 투여하여 항비만 및 항산화 효과를 확인하였다.

1. 한방 복합물의 DPPH free radical 소거능 IC₅₀ 값은 $99.16 \pm 0.60 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났으며 ABTS free radical IC₅₀ 값은 $215.74 \pm 7.63 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났다.
2. 동물실험을 통해 몸무게 변화와 지방 조직 무게 변화를 확인한 결과 대조군과 비교하여 몸무게와 부고환지방 무게는 유의적인 감소 효과를 나타냈다.
3. 한방 복합물의 경구 투여는 혈액에서 ROS 수치를 감소

시키고 TG와 TC 수치를 감소시켰으며 ALT와 AST의 수치 또한 감소시켰다.

4. 한방 복합물의 경구 투여는 간 조직에서 AMPK를 활성화시켜 p-AMPK의 발현을 통해 SREBP-1의 생성을 유의하게 감소시켰다.
5. 한방 복합물의 경구 투여는 간 조직과 지방조직에서 지방 세포의 크기를 감소함을 관찰하였다.

따라서 한방 복합물의 경구 투여는 혈액에서 ROS 및 ALT, AST 수치를 감소시키고 TG와 TC의 축적을 저해하였다. AMPK 활성화를 통하여 SREBP-1을 발현을 억제하여 결과적으로 지질 축적을 감소시켰다. 한방 복합물은 AMPK 활성화와 항산화 효과를 통한 항비만 효과가 뛰어난 소재로서 활용 가능성이 높다고 사료된다.

감사의 글

이 연구결과는 2015년도 산업통상자원부에서 시행한 지역 특화산업육성(R&D)기술개발사업(과제번호 : R0004310)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Chua SC, Leibel RL. Obesity genes: Molecular and metabolic mechanisms. *Diabetes Reviews*. 1997 ; 5(1) : 2-7.
2. Kim SW, Kim NS, Oh MJ, Kim HR, Kim MS, Lee DY, Yoon SH, Jung MY, Kim HJ, Lee CH, Oh CH. Anti-Obesity Effects of Fermented Soybean Oils in 3T3-L1 Pre-Adipocytes and High Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2017 ; 46(3) : 279-88.
3. Lee DS, Lee MH, Kim HS, Jeong TR, Yang HP, Hyun HS, Lee JM. Anti-Obesity Effect of Pine Cone (*Pinus koraiensis*) Supercritical Extract in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2016 ; 45(12) : 1701-7.
4. Baek SJ, Kim DH. The Study on anti-obesity of Myrrh ethanol extract. *Kor. J. Herbol*. 2016 ; 31(4) : 11-8.
5. Jung YM, Ku SK, Lee DS, Kwon Ks. *Lactobacillus plantarum*-fermented *Opuntia humifusa* Extracts (fOH) Increases the Anti-obesity Activity in Mice Fed a 45% Kcal High Fat Diet. *Journal of Life Science*. 2017 ; 27(6) : 680-7.

6. Kim JY, Shin MS, Heo YR. Effects of Stabilized Rice Bran on Obesity and Antioxidative Enzyme Activity in High Fat Diet-induced Obese C57BL/6 Mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2014 ; 43(8) : 1148-57.
7. Halliwill B. Antioxidant in human health and disease. *Annu Rev Nutr.* 1996 ; 16(1) : 33-50.
8. Bae GJ, Ha BJ. Antioxidative Effect of Fermented *Rhynchosia nulubilis* in Obese Rats. *J. Food Hyg. Saf.* 2015 ; 30(4) : 383-9.
9. Park JE, Shin EJ, Ha BG, So MS, Shon YH. Effect of Deep Sea Water containing Chitosan Oligosaccharides on Fatty Acids Synthesis, β -oxidation, and AMPK Activation. *J. Chitin Chitosan.* 2013 ; 18(2) : 93-8.
10. Shon MS, Kim RH, Song JH, Kwon OJ, Lee AR, Kim HO, Roh SS, Kim GN. Potential of Fisetin as a Nutri-cosmetics Material through Evaluating Anti-oxidant and Anti-adipogenic Activities. *Asian J Beauty Cosmetol.* 2016 ; 14(1) : 6-17.
11. Yoon YS. Effects of Cheongshimyeonja-tang on Body Weight and Serum Lipid Level in High Fat Diet Induced Obese Mice. Wonkwang University. 2011 : 1-67.
12. Park JA, Jin KS, Lee JY, Kwon HJ, Kim BW. Anti-Oxidative and Anti-Obesity Activities of *Tetrapanax papyriferus* and *Siegesbeckia pubescens* Extracts and their Synergistic Anti-Obesity Effects. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 2013 ; 41(3) : 341-9.
13. Hwang CR, Kang MJ, Shim HJ, Suh HJ, Kwon OO, Shin JH. Antioxidant and Antiobesity Activities of Various Color Resources Extracted from Natural Plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015 ; 44(2) : 165-72.
14. Seo CS, Kim JH, Shin HK, Kim BS. Quantitative Analysis of (+)-Catechin, Paeoniflorin, and Paeonol in Moutan Radicis Cortex and Its Processed Products. *Kor. J. Pharmacogn.* 2016 ; 47(3) : 237-45.
15. Bray MS. Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. *J Appl Physiol.* 1985 ; 88(2) : 788-92.
16. Jeong HS. Efficacy of *Alismatis Orientale Rhizoma* on Obesity induced by High Fat Diet. *Kor. J. Herbology.* 2013 ; 28(3) : 95-106.
17. Kim BH, Seo BI, Lee ES, Kim MR, Shin SS. The effects of *Aurantii Fructus Immaturus* and *Persicae Semen* on an obesity of rats fed high fat diet. *Kor. J. Herbology.* 2003 ; 18(3) : 69-78.
18. Shin MR, An HJ, Lee YC, Seo BI, Roh SS. Comparative Evaluation of Korean Medicine well-matched with Chicken through an inhibition of Pancreatic Lipase. *Kor. J. Herbol.* 2017 ; 32(4) : 9-15.
19. Kim SH, Lee AR, Kim SJ, Kim KJ, Kwon OJ, Choi JY, Koo JS, Roh SS. Skin elasticity improvement effect of Young persimon and Heated young persimon by decreased Advanced glycation end products(AGEs). *Kor. J. Herbology.* 2017 ; 32(4) : 17-24.
20. Shin YJ, Jeon SY. Anti-hyperlipidemic and Anti-oxidant effects of *Kgihwaetang-gamibang* in High Cholesterol Diet-induced Mice Model. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2015 ; 29(5) : 422-33.
21. Lee SI, Lee YK, Kim SD, Lee IA, Choi JK, Suh JW. Dietary Effects of Fermented Soybean Curd Residue (Biji) on Body Weight, Serum Lipid Profiles, and Antioxidation-Related Enzymes Activity of Mice Fed a High Fat Diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2013 ; 42(7) : 1043-53.
22. Schaefer EJ. Lipoproteins, nutrition, aging and atherosclerosis. *Am J Clin Nutr.* 1995 ; 61(3) : 726-40.
23. Bae GJ, Ha BJ. Effects of *Cladosiphon okamuranus* on Lipid Metabolism in High-fat-diet Rats. *Journal of Life Science.* 2016 ; 26(6) : 657-62.
24. Choi HM, Moon SO, Lee HH, Lee HD. Inhibitory effect of *Ojeok-san* lipid accumulation in high fat diet-induced obesity mice and 3T3-L1 adipocytes. *Kor. J. Herbol.* 2015 ; 30(4) : 121-8.
25. Lee Jin. Effect of Swimming Training on Hepatic SREBP-1c, ACC and AMPK in Aging Mice. *Korean Journal of Sport Science.* 2010 ; 21(1) : 938-46.