大韓本草學會誌 제33권 제2호(2018년 3월)
Kor. J. Herbol. 2018 ; 33(2) : 59-67

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2018.33.2.59.

차전초 잎의 물 추출물이 고지방식이로 비만 유도된 C57BL/6 생쥐의 체지방 감소에 미치는 영향

김소영[1#], 정미진[1], 김유진[1],이은탁[2], 추성태[2], 김한혁[3], 김미려[1*]

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 농업회사법인 ㈜이비채
3 : (재)경북테크노파크 첨단메디컬융합섬유센터

Effect of Plantaginis asiaticae Folium water extract on body fat loss in high fat-induced obese C57BL/6 mice

So Young Kim[1#], Mi Jin Jeong[1], Yoo Jin Kim[1], Un-Tak Lee[2], Sung-Tae Choo[2]
Han-Hyuk Kim[3], Mi Ryeo Kim[1*]

1 : Dept. of Herbal pharmacology, Coll. of Korean Medicine, Daegu Haany Univ., Daegu, Korea
2 : Ebiche co., Ltd. Yeongheon, Gyenbuk, Korea
3 : Advanced Medical Fusion Textile Center, Gyeongbuk Technopark Foundation. Gyeongsan, Gyeonbuk, Korea

ABSTRACT

Objective : *Plantago asiatica* L. has been used for many years in Korea, China, and Japan for the treatment of many diseases such as anti-inflammatory, anti-asthma and diuretic. But the anti-obesity effect of Plantaginis asiaticae Folium has not been studied yet. Thus, this study aimed to demonstrate the anti-obesity efficacy of Plantaginis asiaticae Folium water extract (PAF) in high fat diet-induced obesity animal model.

Method : Male, five-weeks old C57BL/6 mice were divided into 5 groups; ND (normal diet + 0.9% saline), HFD (high-fat diet + 0.9% saline), PC (high-fat diet + *Garcinia cambogia* 500 ㎎/㎏), PAF 100, 300 (high-fat diet + PAF 100, 300 ㎎/㎏. Treatments were performed daily for 6 weeks per os. We evaluated the changes of body weight, white adipose tissues weight, hepatic and fecal lipids level, pancreatic lipase activity and lipid profiles in plasma.

Result : Body weights, adipose tissue weights and FER were significantly lower in mice fed the high-fat diet with PAF treatment than in mice fed the high-fat diet alone. In plasma, TG, TC, LDL-C, ATS and ALT levels significantly decreased in PAF groups compared with HFD group. Also, hepatic triglyceride (TG) levels decreased and fecal TG increased in PAF groups compared to HFD group. In addition, the activity of pancreatic lipase was decreased in the PAF groups compared to that of HFD group.

Conclusion: These results suggest PAF extract is effective in preventing and improvement obesity, so it might be a potential and safe material for anti-obesity agent of weight control or functional supplements.

Key words : Plantago asiaticae Folium, anti-obesity, lipid profile

*Corresponding author : Mi Ryeo Kim. Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Daegu, Korea
· Tel : +82-53-770-2241 · E-mail : mrkim@dhu.ac.kr
#First author : So Young Kim. College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Daegu, Korea
· Tel : +82-53-770-2241 · E-mail : un7849@naver.com
· Received : 20 February 2018 · Revised : 28 February 2018 · Accepted : 15 March 2018

Ⅰ. 서 론

비만은 에너지 섭취와 소비 간의 불균형으로 인해 발생하는 만성 신진 대사 장애로서, 동맥 경화, 비 알코올성 지방간 및 제 2형 당뇨병과 같은 대사성 질환에도 영향을 미친다[1]. WHO에서는 체질량 지수(BMI)로 비만을 분류하고 있으며 아시아인 기준으로 BMI≥25 kg/㎡인 사람을 비만으로 간주하고 있다[2]. 비만 유병률은 1980년 이래로 70개국 이상에서 두 배로 증가되었으며 전 세계적으로 약 4백만의 인구가 비만의 합병증으로 인해 사망한다고 보고되어있다[3,4]. 따라서 비만은 오랜 시간 동안 세계적인 공중보건 문제로 대두되고 있다. 비만을 개선하기 위한 방법 중 안전하고 부작용이 적은 방법으로 운동 및 식이요법 등이 있다. 그러나 이러한 방법들은 개인의 노력, 의지력 및 장기적인 지속성이 필요하기 때문에 보다 쉬운 약물요법을 더 선호하게 된다[5]. 장기간 사용이 승인된 대표적 비만약물 중 하나인 Orlistat (Xenical®)는 췌장 리파아제 억제제로서, 식이 지방의 흡수를 30%까지 방지한다. Sibutramine (Reductil®)은 monamine-reuptake 억제제로서, 포만감을 증가시킴으로써 체중 억제에 도움이 되었으나, 심혈관 질환의 위험 가능성으로 인해 2010년에 퇴출되었다[6,7]. 이처럼 합성의약품들은 쉽게 체중을 감량할 수 있으나 그에 따른 각종 부작용이 뒤따른다. 따라서 최근에는 이러한 의약품들보다 부작용이 적고, 안전하며 체중 조절에 효능이 있는 천연 소재에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 한의학적으로 비만을 일으키는 원인은 痰, 濕, 氣滯, 瘀血 등이 있으며, 비만을 치료하기 위하여 약물요법, 침구요법, 부항요법 등을 시행하고 있다[8]. 이 중 약물요법으로 기존의 복합처방 및 복합 추출물 연구, 일부 단미제 및 환제에 대한 연구에서 유의한 결과가 보고되었다[9,10]. 차전초(*Plantago asiatica* L.)는 Plantaginaceae 계열에 속하는 다년생 식물로 한국, 중국 및 일본에서 항염증, 항천식 및 이뇨제등 많은 질병의 치료에 오랫동안 사용되어왔다[11]. 차전초의 종자인 차전자는 한의학적으로 이수삼습약에 해당하며, 이뇨제, 해열제, 소염제 및 배변 촉진 효능이 알려져 있다[12]. 차전초 잎인 Plantaginis asiaticae Folium 또한 상처치유의 목적으로 전통의학에서 사용되었다[13]. 차전초는 풍부한 식이섬유 및 phenyl propanoid glycosides와 flavonoid가 포함된 polyphenolic 화합물을 함유하고 있으며[14], 그 중 phenyl propanoid glycosides에 속하는 plantamajoside 및 acteoside는 항 박테리아[15], 항암[16], 항산화[17], 항염증[18] 등 다양한 생물학적 활성이 보고되어 있다. 이와 같이 차전초 성분의 생리활성에 관한 여러 연구결과에서 그 효능이 입증되어 있음에도 불구하고 차전초 잎(Plantaginis asiaticae Folium)의 항비만에 관한 연구는 아직까지 미미하다. 따라서 본 연구에서는 고지방식이로 비만을 유도한 생쥐에서 차전초 잎의 물 추출물(PAF)을 경구 투여하고 혈액생화학적 검사 및 지질 양상을 분석함으로써 항비만 효능을 입증하고자 하였으며, 이에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 시료의 추출

본 실험에서 사용한 차전초(*Plantago asiatica* L.)는 대구한의대 본초학교실에서 감별 받았으며, 차전초의 잎을 증류수로 깨끗하게 세척한 후 이물질을 제거한 다음 70℃에서 6시간 동안 물로 추출한 후 동결 건조하였고, 건조물 추출 수율은 16.9%였다(acteoside 9 ㎎/g 함유). 추출 시료는 농업회사법인 ㈜이비채(Yeongcheon, Korea)에서 제공받았고, 냉동보관하면서 실험 직전 증류수로 녹여 일정한 시각에 1일 1회 경구투여 하였다.

2) 실험동물

실험동물은 5주령의 C57BL/6 수컷 마우스를 ㈜오리엔트(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 승인(DHU2016-093)을 얻었으며 동물 관리 과정을 준수하였다. 실험동물의 사육은 12시간 간격의 light/dark cycle과 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%를 유지하면서 사육하였다. 1주간 적응 기간을 거친 후 난괴법에 따라 정상식이군(ND), 대조군(HFD), 양성대조군(Garcinia cambogia), 시료군(PAF 100, 300)으로 구분하여 6주 동안 실험을 진행하였으며, 물과 식이는 자유급식 하였다.

2. 실험 방법

1) 식이 조성 및 약물 투여

본 실험에 사용된 정상식이 및 고지방식이는 각각 AIN-76A (D10001, Research Diets, USA) 및 45% kcal% fat (D12451, Research Diets, USA)를 사용하였으며, 식이조성은 Table 1과 같다. 정상식이군(ND)과 대조군(HFD)에는 동량의 0.9% saline을 경구로 투여하였으며, 양성대조군(*Garcinia cambogia,* Korea) 은 500 ㎎/㎏을 투여하였으며, 시료군에는 증류수에 녹인 차전초 잎의 물 추출물(PAF)의 분말을 각각 100, 300 ㎎/㎏을 매일 일정한 시간에 1일 1회 6주간 경구로 투여하였다. 체중 및 식이섭취량(Food intake, FI)은 실험 시작일로부터 매일 일정시간에 측정하였으며, 6주간 관찰하였다. 식이효율은 체중 증가량(g)/식이 섭취량(g)*100으로 계산하여 산출하였다.

Table 1. Diet composition for animal experiment

	ND[1]	HFD[2]
Ingredient	g	g
Casein, 30 Mesh	200	233
DL-Methionine	3	
L-Cystine		3
Corn Starch	150	84.8
Maltodextrin 10		117
Sucrose	500	201.4
Cellulose, BW 200	50	58
Soybean Oil		29
Lard*		206.8
Corn Oil	50	
Lard*		206.8

	ND[1)]	HFD[2)]
Corn Oil	50	
Mineral Mix S10026		12
Dicalcium Phosphate		15
Calcium Carbonate		6.4
Potassium Citrate, 1 H2O		19.5
Mineral Mix S10001	35	
Vitamin Mix V10001	10	12
Choline Bitartrate	2	2
FD&C Red Dye #40		0.06
Total (g)	1000	1000

[1)]ND; AIN-76A diet
[2)]HFD; high fat diet (Rodent Diet with 45% kcal% fat)

2) 혈액 생화학적 지표분석

실험 종료 후 실험동물을 12시간 동안 절식시키고 isoflurane (JW pharmaceytical, Korea)를 흡입시켜 마취시킨 다음, 꼬리를 끝에서 2 ㎝자른 후 혈당 측정기(㈜에스디바이오센서, Korea)를 사용하여 혈당을 측정하였다. 헤파린(sigma, USA) 처리된 1 ㏄ 주사기를 사용하여 복부 하대정맥으로부터 혈액을 채취하였으며, 3000 rpm (4℃)에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 혈액으로부터 분리한 혈장은 혈액자동분석기(IDEXX Vet test®8008, USA)을 사용하여 중성지질 (triglyceride, TG) 분석을 수행하였으며, 총 콜레스테롤 (Total- cholesterol, TC) 및 HDL-cholesterol (HDL-C)은 측정 시약 (Asan kit, Korea)을 사용하였다. 또한 LDL-cholesterol (LDL-C) 및 atherodenic index (AI, 동맥경화지수)는 다음 공식에 의해 계산되었다.

LDL = ([Total-cholesterol]-[HDL-cholesterol])-(Triglyceride/5)
AI = ([Total-cholesterol]-[HDL-cholesterol])/[HDL-cholesterol]

3) 조직 시료 채취

실험동물로부터 간 및 백색 지방조직(부고환 지방, 신장주위 지방, 복부 피하지방)을 즉시 적출하여 표면의 수분을 제거한 후 미세저울(XB 220A, Precisa, Swiss)을 이용하여 칭량하였다. 일부 간 및 지방조직은 조직 관찰을 위해 10% formalin (Junsei chemical, Japan)용액에 고정 시킨 후 냉장 보관하였으며, 나머지 장기와 지방조직은 지질 분석을 위해 칭량 즉시 액체질소로 급속 냉동시킨 후 실험분석 전까지 -80℃에 보관하였다.

4) 간 기능 관련 효소 분석

간 기능의 주요 지표인 AST 및 ALT 분석은 Reitman-Frankel의 효소법[19)]을 응용한 AST 및 ALT 측정용 시약 (Asan kit, Korea)을 사용하여 측정하였다. AST 및 ALT 기질액을 1 ㎖씩 취해 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 혈장 200 ㎕를 넣고 AST는 37℃에서 60분, ALT는 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 dintrophenyl hydrazine 발색 용액을 1 ㎖씩 가하여 실온에 다시 20분간 반응시킨 후 0.4 N NaOH 용액 10 ㎖과 혼합하여 10분 반응 후 흡광도 505 nm에서 측정하였다.

5) 간 지질 추출 및 분석

간 조직의 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량은 Folch 등[20)]의 변법을 사용하여 측정하였다. 간 조직 0.1 g을 잘게 자른 후 2 ㎖ phosphate buffer (PH 7.4) 용액으로 균질화 시킨 후 chloroform:methanol (1:1, v/v, Duksan, Korea) 용매로 추출하였다. 추출물을 37℃에서 질소 가스로 휘발시켜 isopropanol (Sigma, USA)로 희석하였다. 지질정량을 위해 유화제인 3mM cholic acid (sodium salt, Sigma, USA)와 발색 시 일어나는 탁도를 제거하기 위해 0.5% Triton X-100 (Sigma, USA)을 혼합하여 사용하였다. 지질성분을 추출한 후 혈장 중성지질 및 콜레스테롤 정량법과 동일하게 정량하였다.

6) 분변 지질 추출 및 분석

분변의 중성지방 및 콜레스테롤 함량 측정을 위해 Folch 등[20)]의 방법을 수정 및 보완하여 추출하였다. 건조된 분변을 막자사발에 갈아 0.2 g을 취한 후 5 ㎖ chloroform : methanol (2:1, v/v) 용액을 첨가하여 4℃에서 24시간 동안 추출하였다. 추출액은 3000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취해 37℃에서 질소가스로 건조시킨 후 동일한 추출용매 0.5 ㎖에 다시 녹인 뒤, 이 중 중성지방 및 콜레스테롤 측정용으로 0.2 ㎖을 취하여 다시 질소가스로 건조시키고 5 ㎖의 ethanol (Merck, Germany)로 용해시켰다. 그 후 중성지방 및 콜레스테롤 함량은 간 조직 지질정량과 동일한 효소 반응법으로 정량하였다.

7) 췌장 lipase 활성 측정

췌장 lipase 저해활성은 lipoprotein lipase assay kit (KA 4538, Abnova, Taiwan)을 이용하여 측정하였다. 췌장 50 ㎎을 분쇄하여 1000 rpm, 10분, 4℃에서 원심분리 한 다음 상층액을 취해 assay protocol에 따라 측정하였다.

8) 간 및 백색지방조직의 형태학적 관찰

실험에 사용된 모든 군에서 간 및 지방조직의 일부를 추출하여 10% 포르말린에 고정시킨 다음, 3~4 ㎛ 두께의 절편을 제작하였다. 조직절편을 Hematoxylin & eosin으로 염색을 실시한 후 광학현미경하에서 조직의 형태변화를 관찰하였다.

9) 통계 처리

본 연구의 모든 실험 결과는 SPSS program (v. 23.0)을 이용하여 산출되었다. 각 군 간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였고, 다군간의 차이는 Ducan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 이상의 수준에서 사후검정을 실시하였다. 모든 결과는 mean ± S.E. (standard error)로 표시하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 체중 변화 및 식이 섭취량에 미치는 영향

실험 식이를 급여한 생쥐의 6주 동안의 평균 체중 변화는 Table 2와 같다. 실험 3주째부터 HFD (high fat diet)군의 체중이 ND (normal)군에 비해 유의적으로 증가 하였다. 6주 후 최종 체중은 HFD군에 비해 PAF군 모두에서 유의적으로 감소하였다. 체중 증가량과 식이효율은 HDF군이 ND군에 비해 유의적으로 증가하였으며 PAF 100, 300군에서 HDF군에 비해 유의적으로 감소하였다.

Table 2. Effects of PAF for 6 weeks on body weight, body weight gain, food intake, FER in C57BL/6 mice fed hight-fat diet

	ND	HFD	PC	PAF 100	PAF 300
Initial BW(g)	20.81±0.27	20.69±0.42	20.64±0.48	20.78±0.26	20.78±0.34
Final BW(g)	26.25±0.30^{a}	30.56±0.56^{d}	29.07±0.43^{c}	28.06±0.32^{bc}	27.61±0.49^{b}
BWG(g/day)	0.13±0.03^{a}	0.23±0.04^{d}	0.20±0.02^{c}	0.17±0.02^{b}	0.16±0.02^{b}
FI*(g/day)	2.99±0.08^{d}	2.88±0.10^{c}	2.85±0.13^{bc}	2.76±0.09^{ab}	2.72±0.14^{a}
FER**	0.043±0.01^{a}	0.082±0.01^{e}	0.07±0.01^{cd}	0.063±0.01^{bc}	0.060±0.01^{b}

Data are presented as mean ± S.E. (n=10). ^{a,b,c,d} Values not sharing common letter are significantly different among groups at $p < 0.05$. *FI; Food intake, **FER; Food intake ratio. ND; normal diet group, HFD; high fat diet group, PC; *Garcinia cambogia* (500 ㎎/㎏), PAF 100, 300; PAF treated group (100 and 300 ㎎/㎏).

2. 간 및 지방 조직 무게변화에 미치는 영향

고지방식이와 PAF를 6주간 처리한 생쥐의 체중 100 g 당 장기무게의 비교 결과는 Table 3과 같다. 간 무게는 HFD군에 비해 PAF 300군에서 유의적으로 감소되었다. 총 백색 지방 조직의 경우 PAF군 모두에서 농도 의존적으로 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였다.

Table 3. Effects of PAF for 6 weeks on adipose tissue weights in C57BL/6 mice fed high-fat diet

Group	Organ weights (g)	WAT weights (g/100 g BW)				
	Liver	Epididymal	Retroperitoneal	Perirenal	Mesenteric	Total
ND	0.92±0.2^{ab}	2.94±0.2^{a}	0.24±0.05^{a}	0.82±0.09^{a}	0.82±0.19^{a}	4.83±0.35^{a}
HFD	0.93±0.36^{b}	4.63±0.5^{d}	0.33±0.04^{b}	1.41±0.23^{b}	1.2±0.2^{c}	7.74±0.77^{e}
PC	0.93±0.31^{b}	4.24±0.58^{cd}	0.32±0.06^{b}	1.39±0.12^{b}	1.11±0.16^{bc}	7.25±0.92^{de}
PAF 100	0.88±0.26^{ab}	3.79±0.29^{bc}	0.29±0.04^{ab}	1.31±0.16^{b}	0.95±0.26^{abc}	6.25±0.52^{bc}
PAF 300	0.84±0.21^{a}	3.55±0.38^{b}	0.29±0.05^{ab}	1.2±0.19^{b}	0.92±0.21^{ab}	5.99±0.39^{b}

Data are presented as mean ± S.E. (n=10). ^{a,b,c,d,e} Values not sharing common letter are significantly different among groups at $p < 0.05$. ND; normal diet group, HFD; high fat diet group, PC; *Garcinia cambogia* (500 ㎎/㎏), PAF 100, 300; PAF treated group (100 and 300 ㎎/㎏).

3. 혈액 생화학적 변화에 미치는 영향

꼬리 정맥에서 얻은 혈액의 혈당을 측정한 결과, ND군에 비해 HFD군에서 유의적으로 혈당이 증가하였으며, PAF 300군에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였다. 혈장에서의 중성지방 함량의 비교 결과, HFD군에서 ND군에 비해 중성지방의 함량이 유의적으로 증가하였으며, PAF 모든 농도군에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었다.

혈장 내 콜레스테롤은 Total cholesterol (TC) 과 HDL cholesterol (HDL-C) 및 LDL cholesterol (LDL-C)을 측정하였다. TC의 함량은 ND군과 HFD군이 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 PAF군 모두에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였다. HDL-C의 함량은 HFD군에서 ND군에 비해 유의적으로 감소되었으며, PAF군 모두에서 HFD군에 대해서 유의적으로 증가하였다. 반면에, LDL-C는 HDF군이 ND군에 비해 유의적으로 증가하였으며, PAF군 모두에서 HDF군에 비해 유의적으로 감소되었다. 동맥경화지수를 나타내는 AI (Atherogenic index)는 HFD군이 ND군에 비해 유의적으로 증가하였으며 PAF 모든 농도 군에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었다. 간 기능 수치를 나타내는 AST, ALT 분석 결과, AST는 HFD군이 ND군에 대해 유의적으로 증가하였으며, PAF군 모두에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었다. ALT 역시 HFD군이 ND군에 비해 유의적으로 값이 증가하였으며, PAF군 모두에서 HFD군에 대해 유의적으로 감소되었다 (Table 4).

Table 4. Effects of PAF on plasma lipid profiles and liver function-related enzyme plasma levels in C57BL/6 mice fed high-fat diet

Group	plasma contents (mg/dl)					AI*	(U/L)	
	Glucose	TG	TC	HFD-C	LDL-C		AST	ALT
ND	212±5.58^{a}	80.6±3.83^{a}	149±2.62^{ab}	56.58±0.85^{b}	75.74±1.81^{bc}	1.64±0.19^{a}	72.5±1.85^{a}	46±1.27^{a}
HFD	225±2.51^{b}	134.4±6.8^{b}	156.19±3.19^{b}	51.05±1.2^{a}	80.81±3.28^{b}	1.87±0.1^{b}	93±3.0^{b}	71.25±2.14^{b}
PC 500	215.8±2.06^{a}	115.4±5.7^{a}	150.16±4.22^{ab}	58.07±1.38^{b}	75.17±2.44^{b}	1.82±0.11^{b}	89.3±0.92^{b}	67.8±1.34^{b}
PAF 100	217.3±1.25^{ab}	112.6±2.01^{a}	143±3.0^{a}	61.04±1.6^{bc}	54.66±1.1^{a}	1.57±0.38^{a}	78.8±2.18^{a}	56.83±1.87^{a}
PAF 300	213.3±4.26^{a}	110.4±6.9^{a}	144±2.43^{a}	65.31±2.0^{c}	52.83±3.26^{a}	1.56±0.31^{a}	74.5±2.33^{a}	57±2.04^{a}

Data are presented as mean ± S.E. (n=10). ^{a,b,c} Values not sharing common letter are significantly different among groups at $p<0.05$. *AI; Atherogenic index. ND; normal diet group, HFD; high fat diet group, PC; *Garcinia cambogia* (500 ㎎/㎏), PAF 100, 300; PAF treated group (100 and 300 ㎎/㎏).

4. 간 지질 변화에 미치는 영향

고지방식이와 PAF를 투여한 생쥐의 간 조직 내 지질함량의 결과는 Fig.4와 같다. 간 조직 내 TG함량은 ND군(13.13 ± 3.34 ㎎/g liver)에 비해 HFD군(17.49 ± 1.65 ㎎/g liver)에서 약 133% 증가하였으며 PAF 100 및 300군 각각 13.46 ± 1.5, 12.61 ± 1.94 ㎎/g liver로 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였다. 간 조직 내 TC 함량은 ND군(2.42 ± 0.3 ㎎/g liver)에 비해 HFD군(2.54 ± 0.18 ㎎/g liver)에서 유의적으로 증가하였고, PAF군 100 및 300군 각각 1.73 ± 0.33, 1.76 ± 0.31 ㎎/g liver로 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였다.

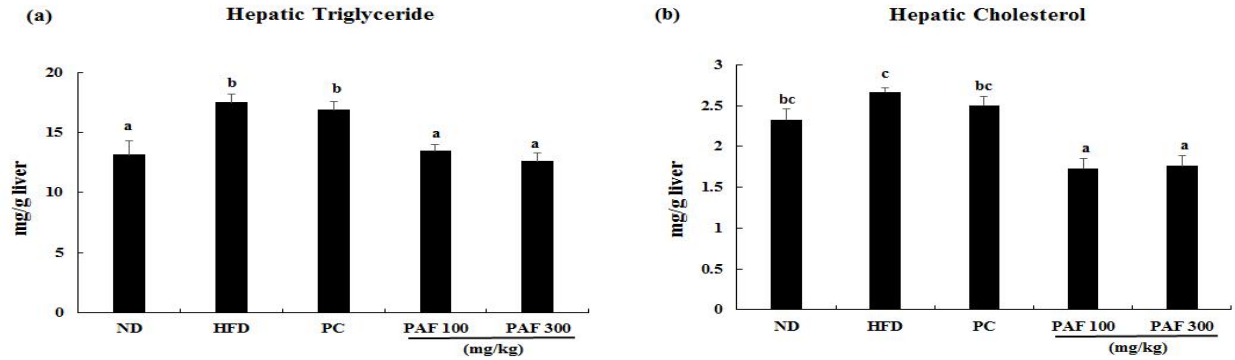

Fig.4. Effects of PAF for 6 weeks on the hepatic lipid levels in C57BL/6 mice fed high-fat diet.
Data are presented as mean ± S.E. (n=10). ^{a,b,c} Values not sharing common letter are significantly different among groups at $p<0.05$. ND; normal diet group, HFD; high fat diet group, PC; *Garcinia cambogia* (500 ㎎/㎏), PAF 100, 300; PAF treated group (100 and 300 ㎎/㎏).

5. 분변 지질 변화에 미치는 영향

PAF를 6주간 투여한 생쥐의 분변 중 TG 및 TC 함량은 Fig.5에 나타낸 바와 같다. 분변 중 TG 및 TC 함량 각각에서 ND군 및 HFD군 간에서는 유의성이 나타나지 않았으나 ND군에 비해 HFD군이 증가하는 경향을 보였다. PAF 300군에서 TG 함량은 9.7 ± 1.07 ㎎/g feces로 HFD군에 비해 유의적으로 증가하였다. 그러나 HFD군에 비해 PAF군 모두에서 TC의 증가 현상은 나타나지 않았다.

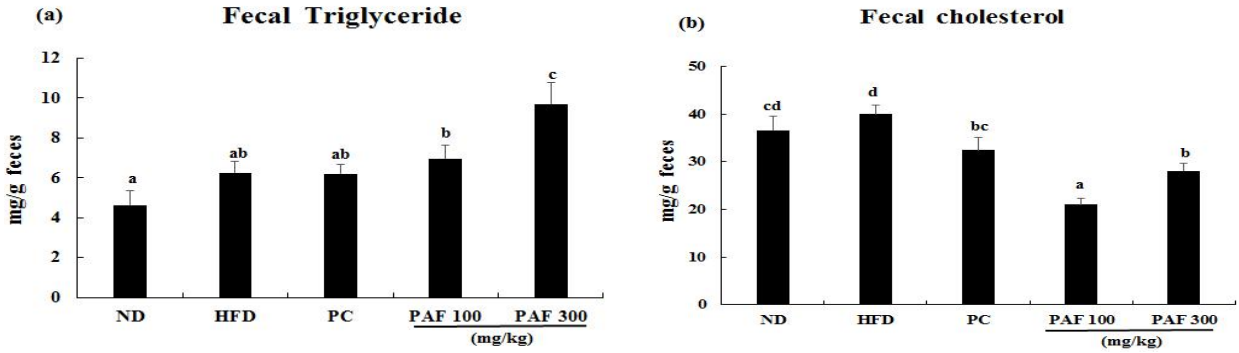

Fig. 5. Effects of PAF for 6 weeks on the fecal lipids excretion in C57BL/6 mice fed high-fat diet.
Data are presented as mean ± S.E. (n=10). a,b,c,d Values not sharing common letter are significantly different among groups at $p<0.05$. ND; normal diet group, HFD; high fat diet group, PC; Garcinia cambogia (500 ㎎/㎏), PAF treated group; PAF 100, 300; PAF treated group (100 and 300 ㎎/㎏).

6. 췌장 lipase 분석

PAF을 6주간 투여한 생쥐의 췌장 lipase 분석 결과는 Fig.6에 나타낸 바와 같다. 췌장 lipase 활성은 HFD군에서 1.83 ± 0.18 mu/㎖으로 ND군(1.66 ± 0.10 mu/㎖)에 비해 활성이 증가되었으나 유의성은 나타나지 않았다. PAF 100, 300군에서 lipase 활성은 각각 1.26 ± 0.26, 0.98 ± 0.47 mu/㎖으로 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었다.

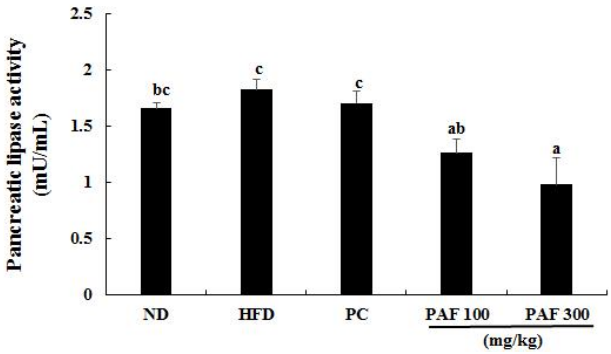

Fig.6. Effects of PAF for 6 weeks on pancreatic lipase activity in C57BL/6 mice fed high-fat diet.
Data are presented as mean ± S.E. (n=10). [a,b,c] Values not sharing common letter are significantly different among groups at $p < 0.05$. ND; normal diet group, HFD; high fat diet group, PC; *Garcinia cambogia* (500 ㎎/㎏), PAF 100, 300; PAF treated group (100 and 300 ㎎/㎏).

7. 간 및 지방조직의 형태학적 관찰

고지방식이로 비만이 유발된 생쥐의 지방간 병변, 지방세포 비대에 대한 간 및 지방조직의 형태학적 분석결과는 Fig.7과 같다. 간 및 지방조직의 형태학적 비교 시, ND군에 비해 HFD군에서 지방구의 크기가 큰 것으로 관찰되었고, 지방구의 축적 또한 증가되었다. PAF군에서 조직 내 지방구의 크기 및 축적이 HFD군에 비해 감소된 것이 관찰되었다.

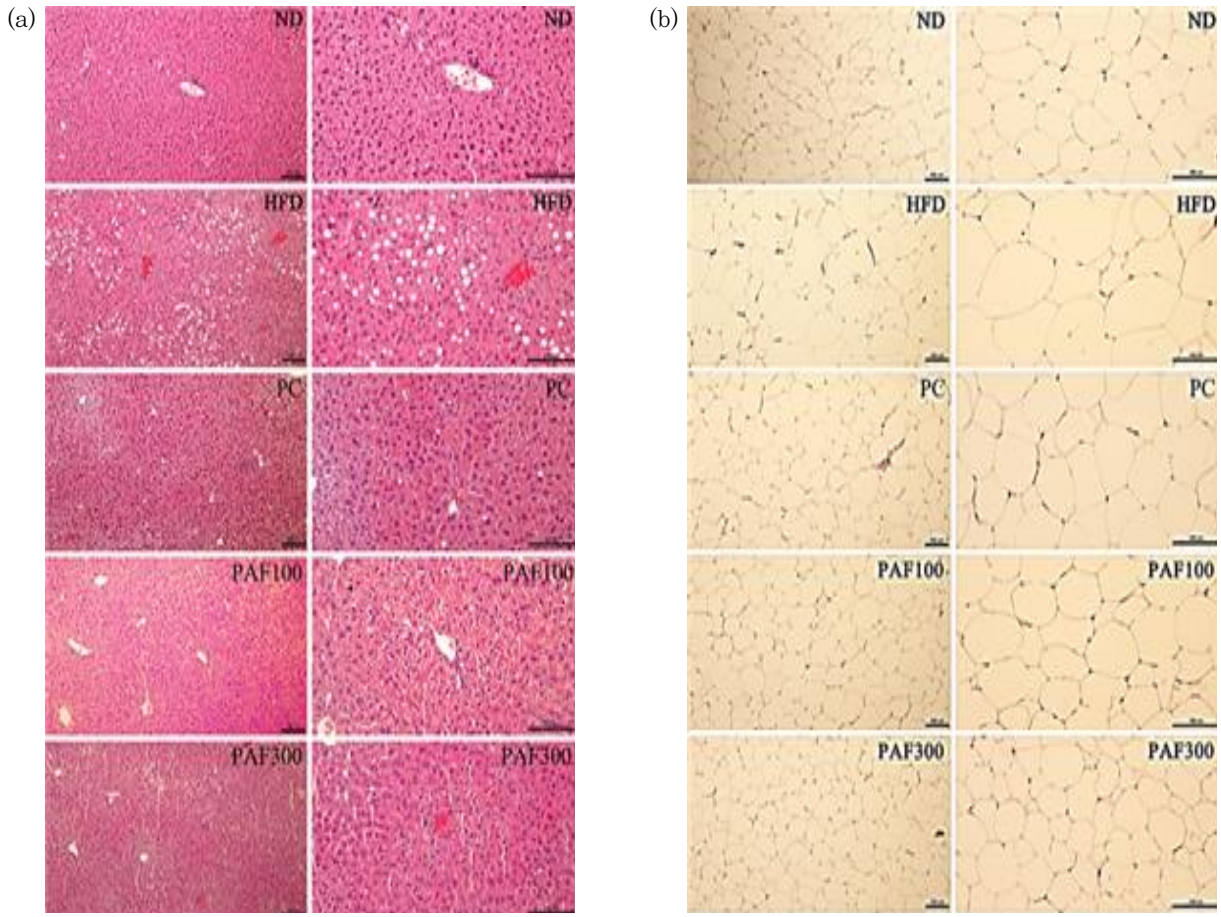

Fig.7. Effects of PAF on hepatic (a) and epididymal fat (b) pads in C57BL/6 mice fed high-fat diet.
Data are presented as mean ± S.E. (n=10). ND; normal diet group, HFD; high fat diet group, PC; *Garcinia cambogia* (500 ㎎/㎏), PAF 100, 300; PAF treated group (100 and 300 ㎎/㎏).

Ⅳ. 고 찰

오늘날 급속한 산업화 및 자동화에 따라 과다 영양 섭취 및 운동부족으로 인해 비만인구가 급속히 증가하고 있다. 이에 따라 고혈압, 동맥경화 및 당뇨병 등 각종 대사성 질환의 유병률 또한 증가하고 있다[21]. 따라서 비만의 예방 및 치료에 대한 관심이 높아지고 있으며, 비만 치료제 또는 기능성 식품 소재의 항비만 활성을 평가하기 위한 식이성 비만 모델을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다[22]. 차전초는 오래 전부터 각종 민간요법으로 이용되어 왔으며, 현대 한의학에서도 꾸준히 이용되고 있다. 이에 대한 기능연구로는 항산화[23], 항염증[24] 등의 활성이 보고되어 있으며, 박 등[25]은 차전초의 성분인 plantamajoside의 독성시험을 통해 차전초의 안전성을 간접적으로 확인하였다. 또한 본 실험실에서는 차전초 에탄올 추출물의 항비만 관련 연구결과를 보고한 바 있다[26,27]. 이와 같이 차전초에 대한 연구는 많이 이루어지고 있으나, 차전초 잎(Plantaginis asiaticae Folium)에 관한 항비만 연구는 없다. 그러므로 본 연구에서는 비만 유도된 동물모델을 이용하여 PAF의 항비만 활성을 분석하였다. Chen등[28]의 연구에서 8주간 C57BL/6 생쥐에서 45% Kcal 고지방 식이로 비만을 유도한 결과 ND군에 비해 HFD군의 체중이 14% 증가하였는데 본 연구에서는 ND군에 비해 HFD군의 체중이 18.7% 증가하였고, PAF군 모두에서 HFD군에 비해 증가된 체중이 유의적으로 감소하였다. 이는 고지방식이로 인해 생쥐에서 현저한 체중 증가 및 다량의 지방의 축적이 유도되었으며, PAF를 투여함으로써 비만 유도된 생쥐의 체중이 유의적으로 감소한 것을 나타낸다. 백색 지방조직은 지질저장의 주된 장소로서 leptin 및 adiponectin과 같은 다양한 호르몬과 다양한 단백질 인자를 분비하는 기능을 한다[29]. 비만에서의 지방조직 내 triglyceride의 증가는 산화스트레스를 유발하고 당뇨, 고지혈증 및 심혈관 질환 등의 다른 대사성 질환과도 연관 된다[30,31]. 따라서 체내 지방량을 감소시키는 것은 비만을 억제하는데 중요한 역할을 한다. 본 연구에서 고지방식이를 섭취한 비만 생쥐에서 백색 지방조직의 무게가 ND군에 비해 HFD군에서 유의적으로 증가하였으며, 조직염색을 통한 조직형태학적 결과에서도 부고환 백색 지방조직 및 간 조직에서 지방세포의 비대가 관찰되었다. PAF군에서 HFD군에 비해 백색 지방조직 무게가 유의적으로 감소하였고, 특히 부고환 백색 지방조직무게의 감소가 가장 뚜렷하였으며, 부고환 백색 지방조직의 크기도 감소하였다.

유리 및 에스테르화 형태의 cholesterol 및 triglyceride는 혈장 내의 주요 지질로써, 혈장 내 중성지방의 높은 수치, HDL-C 감소 및 LDL-C의 증가는 마찬가지로 심혈관 질환 및 내당능 장애, 인슐린 저항성 및 대사성 질환으로 이어지기 때문에 혈청 콜레스테롤, 중성지방 농도 및 AI는 이러한 대사성 질환의 중요한 인자이다[32,33]. 이 등[34]의 연구에서 flavonoid, phenolic acid 등의 항산화 성분을 비만 유도한 흰쥐에게 투여한 결과, 혈장과 간의 콜레스테롤 및 내인성 소화 효소 활성을 감소시켰다. 본 연구에서 PAF의 투여가 HFD군에 비해 공복혈당, 중성지방 및 총 콜레스테롤 농도를 감소시켰다. 또한 HDL-C 콜레스테롤 농도를 증가시키고, LDL-C 농도를 감소시켰다. 이에 따라 심혈관 지수인 AI 수치 또한 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 차전초에 함유되어 있는 phenylpropanoid glycosides인 천연 항산화 활성 화합물에서 기인하는 것으로 사료 된다[35].

간 조직은 중성지방의 합성장소로써, 지질의 대사과정에 중추적인 역할을 하며, 혈액 내 지질함량과 지방산 산화를 조절하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 고지방식이를 유도한 쥐의 간 조직을 관찰한 결과, ND군에 비해 HFD군에서 지방세포의 비대가 관찰되었으며, PAF 투여 군에서 HFD군에 비해 지방세포의 크기가 감소한 것으로 나타났다. 또한 간 기능의 지표 효소인 AST 및 ALT는 고지방식이, 고 콜레스테롤 및 알코올 등으로 인한 지방간 유발, 독성물질에 의한 간 조직 손상 등으로 인해 혈중으로 이들 효소가 다량 분비됨으로써 활성이 증가되어 나타난다[36]. 본 연구에서 AST 및 ALT 측정 결과, AST 및 ALT 모두에서 HFD군에 비해 PAF 군 모두에서 유의적으로 감소하였다. 또한 간 조직 및 분변에서 중성지방 및 총 콜레스테롤 분석결과, 간 조직의 중성지방 및 총 콜레스테롤 수치는 ND군에 비해 HFD군에서 유의적으로 증가하였으며, PAF 군에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였다. 이 결과는 조 등[37]의 chlorogenic acid의 연구 결과와 일치하며, PAF 투여가 간에서 지방 축적을 억제하여 간 손상을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

췌장 리파아제는 지방을 가수분해 하는 소화효소로 지방은 췌장 리파아제에 의해 분해되어 글리세롤과 지방산을 생성 한다[38]. 분해된 글리세롤과 지방산은 에너지원으로 쓰이며, 쓰이고 남은 지방은 중성지방으로 합성되어 체내에 축적된다. 따라서 리파아제 효소활성의 저해는 체내 지방흡수를 억제시켜 지방을 대변으로 배출 한다[39]. 본 실험에서 분변 지질함량 분석 결과 PAF군에서 HFD군에 비해 유의적으로 중성지방의 배출을 증가시킨 것을 확인할 수 있었다.

이상의 모든 결과를 종합하면 고지방식이로 유도된 비만 생쥐에서 PAF 투여는 체중 및 조직 무게의 감소, 혈액 및 간에서의 지질 축적 억제, 췌장 lipase의 억제를 통한 체내 중성지방 배출 증가 등 항비만 효능에 대한 유의적인 결과를 나타냈으므로, PAF가 항비만 관련 천연 기능성 소재로서 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 한편 이 연구를 기초로 추후 PAF의 지질대사 관련 단백질 발현량 등의 관찰을 통해 PAF의 항비만 기전에 관한 연구를 진행할 예정이다.

Ⅴ. 결 론

본 연구에서는 PAF의 투여가 고지방식이로 비만이 유발된 생쥐에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중 및 식이효율은 HFD군에 비해 PAF군 모두에서 유의적으로 감소하였다.

2. 간 무게는 HFD군에 비해 PAF 300군에서 유의적으로 감소하였으며, 지방 조직 무게는 모든 PAF군에서 HFD군보다 유의적으로 감소하였다.

3. 혈액분석 결과 TG, TC, LDL-C, AST 및 ALT 모두 HFD군에 비해 모든 PAF군에서 유의적으로 감소하였

으며, HDL-C는 유의적으로 증가하였다.

4. 간에서 TG 및 TC 함량은 HFD군에 비해 모든 PAF군에서 유의적으로 감소하였다.

5. 분변 지질 분석결과 TG 함량은 PAF 300군에서 유의적으로 HFD군 보다 증가하였으며, TC 함량에서는 군간 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

6. 췌장 lipase 활성은 모든 PAF군에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었다.

7. 간 및 백색지방조직의 형태학적 관찰 결과 HFD군에 비해 모든 PAF군에서 지방구의 크기 및 축적이 감소됨이 관찰되었다.

따라서 PAF의 투여는 고지방식이로 유발된 비만 생쥐의 체중 및 지방조직무게 감소뿐만 아니라 혈액, 간 및 분변의 지질 양상의 감소에 유의한 영향을 미침으로써 PAF가 비만 치료 및 예방을 위한 기능성 소재로 응용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 연구개발 특구진흥재단-기술이전사업화 사업 (No. 2016DG00010) 및 한국연구재단 (No. 17-220-023)의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

1. Bhatt A, Ghiliyal P. A review on anti-obesity. World J Pharm Sci. 2017 ; 6(7) : 1714-22.
2. World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: WHO. 1995
3. The GBD 2015 obesity collaborators. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. N Engl J Med. 2017 ; DOI : 10.1056/NEJMoa 1614362.
4. Adan RAH, Vanderschuren L. JMJ, La Fleur SE. Anti-obesity drugs and neural circuits of feeding. Trends Pharmacol Sci. 2008 ; 29(4) : 208-17.
5. Kang JG, Park CY. Anti-obesity drugs: A review about their effects and safety. Diabetes Metab J. 2012 ; 36 : 13-25.
6. Padwal RS, Majumdar SR. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. J Lancet. 2007 ; 369 : 71-7.
7. Li MF, Cheung BMY. Rise and fall of anti-obesity drugs. World J Dibetes. 2011 ; 2(2) : 19-23.
8. Jeong HS. Efficacy of *Alismatis Orientale Rhizome*on obesity induced high fat diet. Kor J Herbology. 2013 ; 28(3) : 95-106.
9. Jeong SH, Chae KG, Jung YS, Rho YH, Lee JM, Ha JR, Yoon KH, Kim GC, Oh KS, Shin SS, Yoon MC. The Korean traditional medicine Gyeongshingangjeehwan inhibits obesity through the regulation of leptin and PPAR action in OLETF rats. J Ethnopharmacol. 2008 ; 119 : 245-51.
10. Jang YE, Seo BI. The anti-obesity of Platycodi Radix, combination of Platycodi Radix and Cyperi Rhizoma on obesity induced by high fat diet. Kor J Herbology. 2016 ; 31(3) : 1-11.
11. Ye CL, Jiang CJ. Optimization of crude polysaccharides from *Plantago asiatica* L. by response surface methodology. Carbohydr Polym. 2011 ; 84 : 495-502.
12. Yang Q, Qi M, Tong R, Wang D, Ding L, Li Z, Huang C, Wang Z, Yang L. *Plantago asiatica* L. seed extract improves lipid accumulation and hyperglycemia in high-fat diet-induced obese mice. Int J Mol Sci. 2017 ; DIO: 10.3390/ijms18071393.
13. Michaelsen TE, Gilje A, Samuelsen AB, Hogasen K, Paulsen BS. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMⅡ, from the leaves of *Plantago major* L. Scand J Immunol. 2000 ; 52 : 483-90.
14. Li YJ, Han L, Li GQ, Deng L, Zhang XS, Deng YL. Pharmacokinetics of plantamajoside and acteoside from *Plantago asiatica* in rat by liquid chromatography-mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal. 2014 ; 89 : 251-6.
15. Galisteo M, Sanchez M, Vera R, Gonzalez M, Anguera A, Duarte J, Zarzuelo A. A diet supplemented with husks of *Plantago ovata* reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF-α in obese Zucker rats. J Nutr. 2005 ; 135(10) : 2399-404.
16. Pei S, Yang X, Wang H, Zhang H, Zhou B, Zhang D, Lin D. Plantamajoside,a anti-tymor herbal medicine inhibits breast cancer growth and pulmonary of matrix metalloproteinase-9 and-2. BMC Cancer. 2015 ; 15 : 965.
17. Cardinali A, Pati S, Minervini F, D' Antuono I, Linsalata V, Lattanzio V. Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food anti oxidants, J. Agric. Food Chem. 2012 ; 60 : 1822-9.
18. Akdemir Z, Kahraman C, Tatl II, Akkol KE, Süntar I, Keles H. Bioassayguided isolation of anti-inflammatory, anti nociceptive and wound

healer glycosides from the flowers of *Verbascum mucronatum* Lam. J Ethnopharmacol. 2011 ; 136 : 436-43.
19. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. Am J Clin Pathol. 1957 ; 2 : 56-63.
20. Folch J, Less M, Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem. 1957 ; 226 : 497-569.
21. Lee CW, Yoon HM, Kang KH. The effects of Ganoderma lucidum herba pharmacopuncture on 3T3-L1 preadipocyte differentiation. Journal of pharmaco puncture. 2008 ; 11(3) : 47-53.
22. Houg HJ, Yang HY, Kang WY, Kim DG, Lee SY, Choi YH, Kim JH, Han CH, Lee YJ. Dangyuia (*Citrus grandis Osbeck*) Peel lmproves lipid profiles and alleviates hypertension in rats fed a high-fat diet. Lab Anim Res. 2010 ; 26(4) : 361-7.
23. Yin JN, Nie SP, Zhou C, Xie MY. Chemical charac-teristics and antioxidant activities of polysaccharide purified from the seed of plantago asiatica L. J Sci Food Agric. 2010 ; 90(2) : 210-7.
24. Turel I, Ozebek H, Erten R, Oner AC, Cengiz N, Yilmaz O. Hepatoprotectine and anti-flammatory of Plantago major L. Indian J Pharma. 2009 ; 41(3) : 120-4.
25. Park BG, Lee HS, Jung SH, Koo YC, Hong CO, Lee SJ, Lee KW. Single & 14-day repeated oral toxicity study and genotoxicological safety estimate of plantamajoside isolated from *Plantago asiatica*. J Toxicol Pub Health. 2007 ; 23(1) : 79-86.
26. Hwang SJ, Shin IS, Kim MR. Effects of mixed medicinal herbs on adipogenesis and apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. J Physiol & Pathol Korean Med. 2010 ; 24(4) : 661-7.
27. Jeon SY, Park JY, Shin IS, Kim SO, An HD, Kim MR. Ethanol extract of Plantago asiatica L. controls intracellular fat accumulation and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes. Kor J Herbology. 2014 ; 29(4) : 77-82.
28. Chen Q, Wang E, Ma L, Zhai P. Dietary resveratrol increases the expression of hepatic 7α-hydroxylase and ameliorates hypercholesterolemia in high-fat fed C57BL/6J mice. Lipids Health Dis. 2012 ; DIO : 10.1186/1476-511X-11-56.
29. Trayhurn P, Wood SI. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. Br J Nutr. 2004 ; 92 : 347-55.
30. Das UN, MD, FAMS. Is obesity an inflammatory condition? Nutr J. 2001 ; 17 : 953-66.
31. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. Nature. 2000 ; 404 : 635-43.
32. Chapman MJ, Ginsgerg HN, Amarenco P, Andreotti F, Boren J, Catapano LA, Descamps OS, Fisher E, Peter TK, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Nordestgaard BG, Ray KK, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Tybjaerg-Hansen A, Watts FG. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. Eur Heart J. 2011 ; 32 : 1345-61.
33. Vega GL, Barlow CE, Grundy SM, Leonard D. PHD, Defina LF. Triglyceride-to-high-density-lipoprotein-cholesterol ratio is an index of heart disease mortality and of incidence of type 2 diabetes mellitus in men. J Investig Med. 2014 ; 62(2) : 345-9.
34. Lee SH, Park YB, Choi MS. The effect of dietary citrus flavonoid supplementation on cholesterol biosynthesis control in rats. The Autummol symposium of Korean Nutr Association. 1998 ; 79-90.
35. Pastorelli G, Rossi R, Corino C. Influence of *Lippia citriodora* verbascoside on growth performance, antioxidant status, and serum immunoglobulins content in pilets. Czech J Anim. sci. 2012 ; 57(7) : 312-22.
36. Plaa GL, Charbonneau M, Principles and methods of toxicology. Raven Press, NY, USA. 1994 ; 839-70.
37. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo JY, Seo KI, Choi MS, Lee MK. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. Food Chem Toxicol. 2010 ; 48 : 937-43.
38. Williams JA, Goldfine ID. The insulin-pancreatic acinar axis. Diabetes. 1985 ; 34 : 980-5.
39. Woo SE, Kwon JH, Yang SY, Park HY, Kim HK. Development of egg yolk antibody specific to the pancreatic lipase domain for anti-obesity. Korean J Microbiol Biotechnol. 2008 ; 36 : 299-306.