

# 비만 생쥐모델의 폐약(肺弱)을 유발하기 위한 Bleomycin의 농도 결정 연구

고영미<sup>1</sup> · 장순우<sup>1</sup> · 안택원<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>대전대학교 한의과대학 사상체질과

## A Study on Concentration of Bleomycin to Induce Lung Fibrosis in Obese Animal Model

Young-Mee Koh<sup>1</sup> · Soon-Woo Jang<sup>1</sup> · Taek-Won Ahn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

**Objectives** : The objectives of this study is to develop a mouse model similar to Taeum-type by inducing Lung fibrosis with bleomycin, and to determine adequate concentration of bleomycin. **Methods** : The subjects were divided into six groups: normal, obesity induced group, and bleomycin administered 0.015U, 0.03U, 0.06U, and 0.09U(U/100g bw) concentrations respectively. Each concentration of bleomycin was dissolved in distilled water, and administered through Intra-Nazal-Trachea injection method. Food intake and body weight were measured at regular time weekly. At the end of the experiment, blood was gathered by cardiac puncture for biochemical examinations, organs were removed for histological examinations, and weigh and mRNA genes was analyzed. **Result** : Mice administered with bleomycin at 0.015U and 0.03U showed body and fat weight gain, and increased blood total cholesterol, LDL-cholesterol, glucose, and free fatty acid level. Fat related genes also showed higher level than the control group. Obesity was most strongly induced in the mice administered with 0.03U of bleomycin. On the other hand, when bleomycin was administered at concentrations above 0.06U, a model of obesity mouse was not created due to rapid emphysema inflammation and weakness. **Conclusions** : Mice were most vulnerable to obesity when bleomycin was administered at a concentration of 0.3 to cause liver damage. Bleomycin concentration over 0.06U did not cause obesity-induced mice, due to severe damage in liver.

**Key words** : Taeum-in, bleomycin, obesity, lung damage, Sasang Constitutional Medicine.

### I. 서론

사상체질의학은 1894년 동무 이제마가 창시한 한국 고유의 의학으로<sup>1</sup>, 體形氣像, 容貌詞氣, 性質材幹, 病證藥理을 바탕으로 체질을 분류해서 질병의 치료를 달리 한다<sup>2</sup>. 사람은 태양인·태음인·소양인·소음인 네 개의 체질로 나뉘는데, 그 중 태음인은 肝大肺小라고 하여, 氣液을 呼吸하는 門戶인 肝과 肺의 관계로 설명하였다<sup>3</sup>. 태음인에서 肺는 呼散之氣의 주체가 되고, 吸聚之氣가 강한 태음인에서 上達而呼散하는

기능을 수행하기에 매우 중요한 장부이다. 태음인은 본래 체질이 肝大肺小하여 呼散之氣가 부족하고 吸聚之氣가 강해서 가장 비만해지기 쉬운 체질이어서 태음인과 비만의 상관성에 대한 연구들이 많이 이뤄지고 있다<sup>4</sup>.

한의학적 치료에 대한 표준 확립을 위해서는 한방 의약품 비임상 및 임상시험이 활발히 이뤄져야 한다. 지금까지 체질별 약물 관련 동물실험이 많이 진행되어 왔으나 체질병태모델이 아닌 일반 동물을 대상으

Received Oct 01, 2019, Revised Oct 11, 2019, Accepted Oct 21, 2019 Published online Nov 08, 2019

Corresponding Author Taek-Won Ahn

Doojeong-dong 621, Seobuk-gu, Cheonan city, Chungcheongnamdo, 331-958, Korea

Tel: +82-41-521-7535 Fax: +82-41-521-7007 E-mail: twahn@dju.kr

Acknowledgements

상기 연구는 과학기술정보통신부 '체질 특성에 따른 대사성 질환의 치료 약물 및 기기 임상 연구' (과제번호 : 2015M3A9B6028311)의 지원을 받아 수행되었음.

로 한 실험이기 때문에 체질 처방의 일반적인 효능은 확인할 수 있었지만 특정 체질에 대한 효과는 알 수 없었다.

사상체질의학의 특성상 체질 처방에 대한 동물실험을 하기 위해서는 각 체질별 동물 모형이 개발되어야 하는데, 그 시작으로 김 등의 연구에서는 肺弱 태음인 동물 모델을 대상으로 태음인에게 가장 취약한 질환인 비만에 대한 영향을 평가하였다<sup>5</sup>. 우리 몸의 장기인 폐 자체의 기능 저하가 사상의학에서 정의하는 태음인 肺小의 의미와 유의미한 연관성이 있다는 것을 선행 연구에서 확인하였다.

폐섬유화 동물 모델 개발에 대해 다수의 선행 연구가 있다. Tashiro 등의 리뷰 연구<sup>6</sup>에서는 Bleomycin이 폐손상을 위해 쓰이는 가장 보편적인 약물이며, DNA를 깨뜨려서 세포사를 유발한다고 하였다. Bleomycin의 적정 농도는 1.25~4U/kg이라고 하였다.

이번 실험에서는 후속 연구로써 폐섬유화를 유발함과 동시에, 폐약 특성의 태음인이 비만에 취약한 사상의학의 이론에 근거하여 肺弱 쥐에서 Bleomycin의 농도별 폐섬유화 정도와 비만 유발 정도를 동시에 확인하여 태음인 동물 모델을 만들기 위한 적정 농도를 찾고자 했다. Bleomycin을 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U(U/100g bw)의 농도별로 Intra-Nazal-Trachea (INT) injection 방법으로 기도를 통해 폐로 직접 주입하여 폐장변증을 유도한 후 8주간 고지방식이 (60% HFD)를 투여하여 비만마우스 (DIO)를 유도한 후 bleomycin의 적정 농도를 평가해보기로 하였다.

## II. 연구 방법

### 1. 실험 동물

본 실험을 위하여 사용된 7주령 숫컷 C57bl/6J 생쥐동물은 대한바이오링크 (eumseong, Korea)에서 분양받았다. 분양 받은 실험 동물은 기본사료 (AIN-76A diet)와 물을 자유롭게 공급하고, 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간 light-dark cycle의 환경을 유지하며 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험실 환경에 적응시킨 후 9주령에

Bleomycin(BLM)을 Intra-Nazal-Trachea (INT) injection 방법을 이용하여 기도를 통해 폐로 직접 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw)의 농도로 주입하여 폐장변증을 유도하였다. BLM 투여 2주 후 Whole Body Plethysmography (DSI, USA)를 이용하여 methacholine에 대한 기도저항성 (Penh)을 측정하여 폐장변증을 확인한 24시간 후 BLM\_HFD 대조군으로 분리하여 8주간 60%고지방사료(HFD)를 투여 하였다. 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인을 받았다.

실험 동물은 정상군, 고지방사료(HFD)를 먹인 비만대조군, 그리고 bleomycin을 각각 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) 투여한 군으로 총 6개의 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다.

### 2. 부검 및 장기조직 검사

실험 종료 후 실험동물은 희생 전 16시간 동안 절식시킨 후 혈액을 채취하고, 각 실험동물의 장기조직(간, 지방조직, 신장, 비장, 심장)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 칭량 하고, 간과 부고환주변 지방조직은 RNA 안정액 (RNAsolB)에 보관하여 분쇄 후 -74℃ 냉동고에 보관하였다.

### 3. 체중 및 식이효율 측정

체중, 식이섭취량 및 식이효율은 매주 일정한 시간에 측정하여 기록하였다.

#### (1) 체중 (body weight)

- ① 체중변화 : 매주 수요일 9시에 측정/기록
- ② 총 체중 증가량 : Final body weight - initial body weight
- ③ 1일 평균 체중 증가량 = Total body weight gain / days

#### (2) 식이섭취량 (food intake)

- ① 1일 평균 식이 섭취량 - Total food intake / days

#### (3) 식이효율 (food efficiency ratio, FER)

- ① FER = [Total weight gain / Total food intake] x 100

#### 4. 지방조직 중량 측정

실험 종료 후 각 실험동물을 피하지방(abdominal subcutaneous fat), 부고환주변 복부지방량(epididymal adipose tissue), 그리고 신장후 복막지방조직(retroperitoneal adipose tissue), 내장지방량(visceral fat amount)으로 구분하여 적출 후 지방조직의 중량을 산출하였다.

#### 5. 혈청 생화학 검사

실험 종료 후 각 실험동물로부터 분리한 혈장(plasma)에서 간 기능의 지표인 ALT 및 AST, 혈장 및 간의 지질함량의 지표인 총콜레스테롤(total cholesterol), HDL (High-density lipoprotein), LDL(Low-density lipoprotein), 중성지방(triglyceride), FFA, 혈당,  $\gamma$ -GPT, LDH의 함량을 생화학자동 분석기(Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다. 렙틴, 인슐린, adipokines(TNF- $\alpha$ , IL6, VEGF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1), 아디포넥틴, Acyl CoA dehydrogenase으로 분석하였다.

이를 위하여, 각 항체를 코팅 완충용액에 희석하여 마이크로웰에 코팅한 후 4°C에서 밤새 방치했다. 각 웰을 3회 세척 완충용액으로 세척한 후, 혈청(10배 희석)을 100  $\mu$ l씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 세척 완충용액으로 세척했다. 이후, 항체 아비딘-HRP 접합체 100  $\mu$ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척했다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하여 암소에서 30분간 방치한 후 50  $\mu$ l의 스톱 용액을 처리하고, ELISA 판독기로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정했다.

#### 6. 유전자 발현 분석

실험 종료 후 각 실험동물로부터 적출한 간과 지방조직들의 유전자 발현 양상을 real-time PCR 증폭법을 사용하여 알아보았다. 부고환주변 복부지방량(epididymal adipose tissue) 및 간(liver)등 조직은 RNAsolB (Tel-Test) 용액을 사용하여 각 조직으로부터 RNA를 추출한 뒤 cDNA 및 real-time PCR 분석을 하였다. 지방조직에 RNAsolB 500  $\mu$ l를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하여 여기에 chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 50  $\mu$ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200  $\mu$ l의 상층액을 회수하여

2-propanol 200  $\mu$ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20  $\mu$ l의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다. 역전사(reverse transcription)반응은 준비된 total RNA 3  $\mu$ g을 DNase I (10U/ $\mu$ l) 2U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5  $\mu$ l 10 mM dNTPs mix, 1  $\mu$ l random sequence hexanucleotides(25 pmole/ 25  $\mu$ l), RNA inhibitor로서 1  $\mu$ l RNase inhibitor (20 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l 100 mM DTT, 4.5  $\mu$ l 5 $\times$ RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1  $\mu$ l의 M-MLV RT (200 U/ $\mu$ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20  $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C heating block에서 45분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. PCR은 TaqMan probe(FAM dye-labeled, ABi, USA)를, internal standard를 Mouse GAPDH probe set; Endogenous Control (VIC/MGB Probe, Probe limited) from Applied Biosystems (4352339E)를 사용였고, primer의 최종 농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은: pre-denaturation은 2 min at 50 °C, 10 min 94 °C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 °C, 1 min at 45 °C에서 수행하였다. 실험군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였다.

## 7. 조직검사 분석

실험 종료 후 주요 장기들에 대한 조직병리학적 관찰을 수행하기 위해 간과 지방조직등을 절취하여 10% neutral buffered formalin에 24시간 동안 고정 시킨 다음 graded alcohol로 탈수시키고 파라핀으로 포매하여 block을 제작한 다음 microtome으로 4  $\mu$ m 두께의 조직절편을 제작하여 hematoxylin & eosin (H&E) 염색 및 오일-레드 O 염색을 시행한 뒤 xylene clearing을 거쳐 permount로 처리한 후 광학현미경위에서 조직 또는 장기별 특이 병변의 유무를 관찰하였다.

H&E 염색 후 병리형태학적 관찰을 위해, 실험 종료 후 ethyl ether로 마취하고 부검하여 적출한 부고환주변 백색지방량 (Epididymal adipose tissue) 일부를 10% 포르말데하이드 용액에 24시간 고정한 다음, 같은 용액으로 2회 교환하였다. 그 다음 2배수에 탄올로 탈수하여 파라핀에 포매하고, 이것을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 헤마톡실린-에오신(H-E) 염색한 다음 광학현미경에서 부고환주변 백색지방 (Epididymal adipose tissue)세포는 200배 배율로 관찰하였고, 부고환주변 지방세포 크기는 Nikon ACT-1 version 2.51 (Nikon, Japan)를 사용하여 50  $\mu$ m단위로 측정하였다.

## 8. 통계 처리

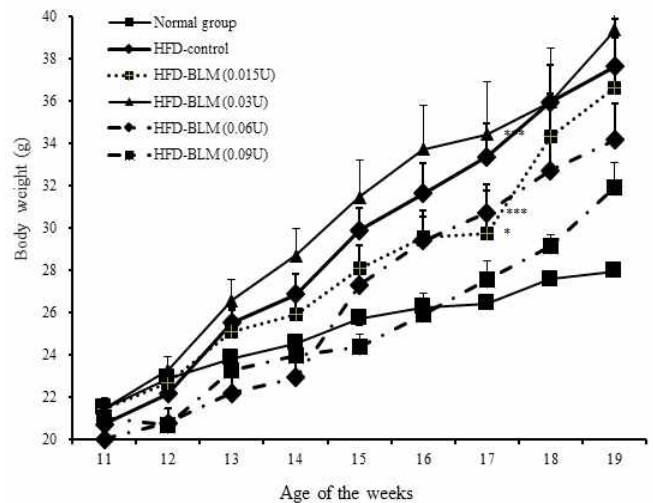
각 실험군 결과 값은 평균값  $\pm$ 표준편차로 나타내었으며 실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS 12.0 (Statistical Package for Social Science 12, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 One-way 분석(ANOVA)에 의한 Tukey's range tests 검정을 시행하였고,  $p < 0.05$  이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

## III. 연구결과

### 1. 체중, 식이효율 비교

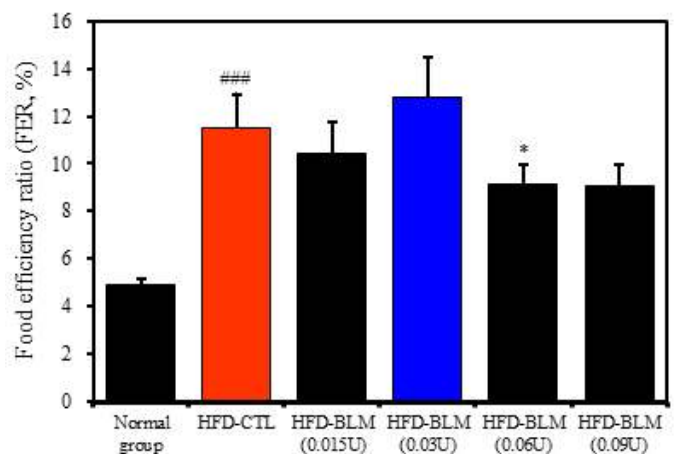
#### 1) 체중 비교

HFD 투여 8주 후 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 bleomycin 0.015U와 0.03U(U/100g bw) 투여군에서 체중의 증가가 관찰 되었고, 0.06U과 0.09U(U/100g bw) 투여군에서는 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 감소된 추이를 보였다(Fig. 1).



[Fig.1]. Effect of various concentration bleomycin treatment on body weight in obese mice fed high fat diet (DIO mice).

Body weight in obese mice fed high fat diet (DIO mice) for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.



[Fig.2]. Effect of various concentration bleomycin treatment on food intake and food efficiency ratio (FER, %) in obese mice fed high fat diet (DIO mice).

Body weight in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. The food efficiency ratio is calculated by (daily body weight gain/daily food intake) $\times$ 100. Values are presented as the mean $\pm$ SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.

## 2) 식이효율 비교

정상군(Normal group)에 비하여 비만대조군(HFD-NC)의 식이효율이 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.001$ ). 비만대조군(HFD-NC)의 식이효율(FER)에 비하여 bleomycin 0.03U 투여군에서 식이효율의 증가가 관찰 되었고, 0.06U과 0.09U 투여군에서는 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 감소하였다 (Fig. 2).

## 2. 혈액생화학 검사

### 1) 혈중 total cholesterol

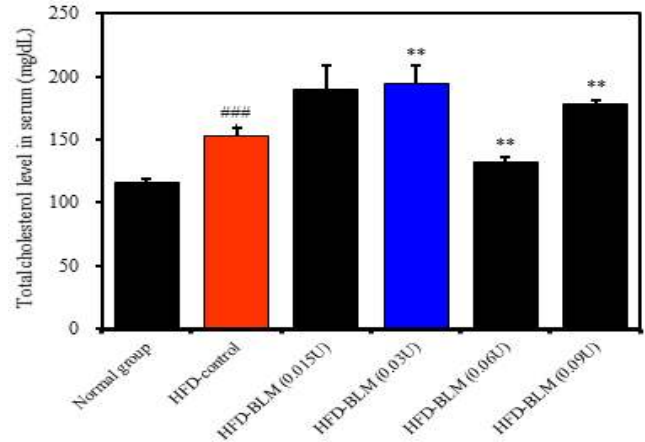
비만대조군(HFD-control)의 혈청내 총콜레스테롤(total cholesterol) 수준은 정상대조군의 혈청내 총콜레스테롤(total cholesterol)에 비하여 통계학적으로 유의미하게 증가하였다( $p < 0.001$ ). HFD 투여 8주 후 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 bleomycin 0.015U과 0.03U (U/100g bw) 투여군에서 총콜레스테롤(total cholesterol) 수준의 증가가 관찰 되었고( $p < 0.01$ ), 0.06U(U/100g bw) 투여군에서는 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 감소되었고, 0.09U(U/100g bw) 투여군에서는 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 증가된 결과를 나타내었다 (Fig.3).

### 2) 혈중 griglyceride

비만대조군(HFD-control)의 혈청내 중성지방(triglyceride) 수준은 정상대조군의 혈청내 중성지방(triglyceride)에 비하여 증가를 나타내었다( $p < 0.01$ ). HFD 투여 8주 후 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 bleomycin 0.03U과 0.09U 투여군에서 중성지방(TG) 수준이 비슷하였고, 0.015U과 0.06U 투여군에서는 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 감소된 결과를 나타내었다 (Fig.4).

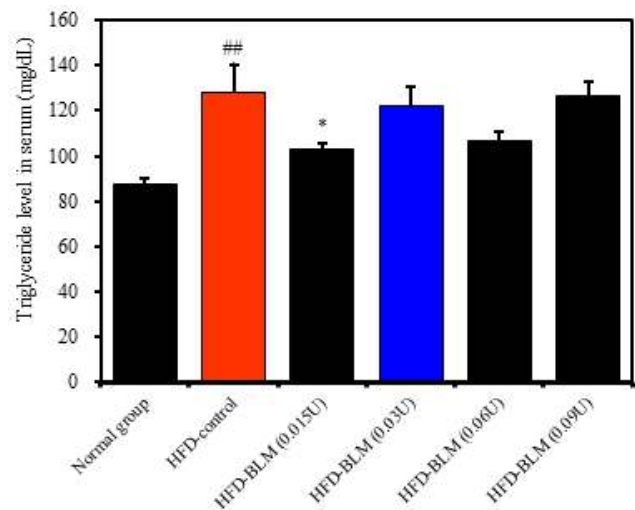
### 3) 혈중 glucose

비만대조군(HFD-control)의 혈청내 혈당(Glucose) 수준은 정상대조군에 비해 증가하였다( $p < 0.05$ ). HFD 투여 8주 후 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 bleomycin 0.015U과 0.03U 투여군에서 혈당(Glucose) 수준이 높았고, 0.06U과 0.09U 투여군에서는 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 감소된 결과를 나타내었다 (Fig.5).



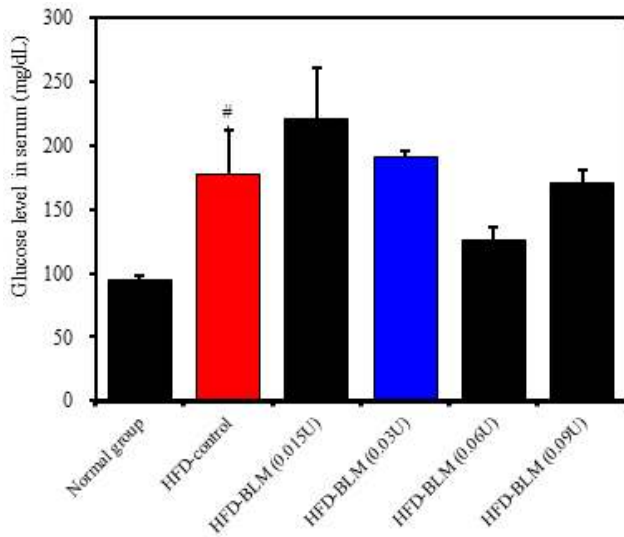
[Fig.3]. Effect of various concentration bleomycin treatment on total cholesterol level in obese mice fed high fat diet (DIO mice).

Total cholesterol level in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Serum TC levels were analyzed using a Hitachi 7020 Automatic Analyzer. Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.



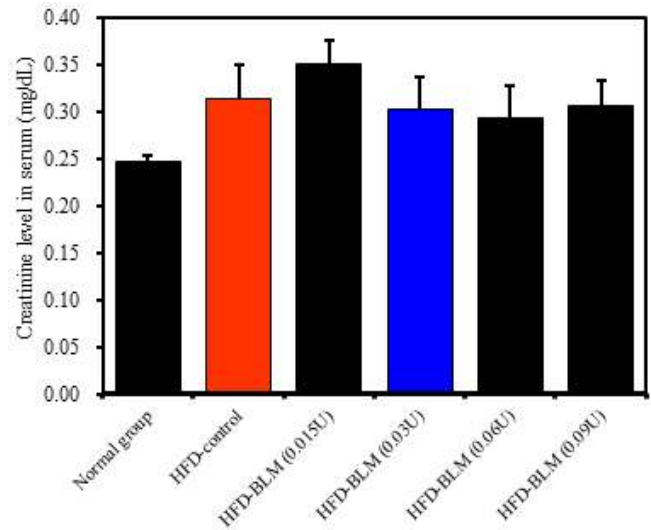
[Fig.4]. Effect of various concentration bleomycin treatment on triglyceride level in obese mice fed high fat diet (DIO mice).

Triglyceride (TG) level in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Serum TG levels were analyzed using a Hitachi 7020 Automatic Analyzer. Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.



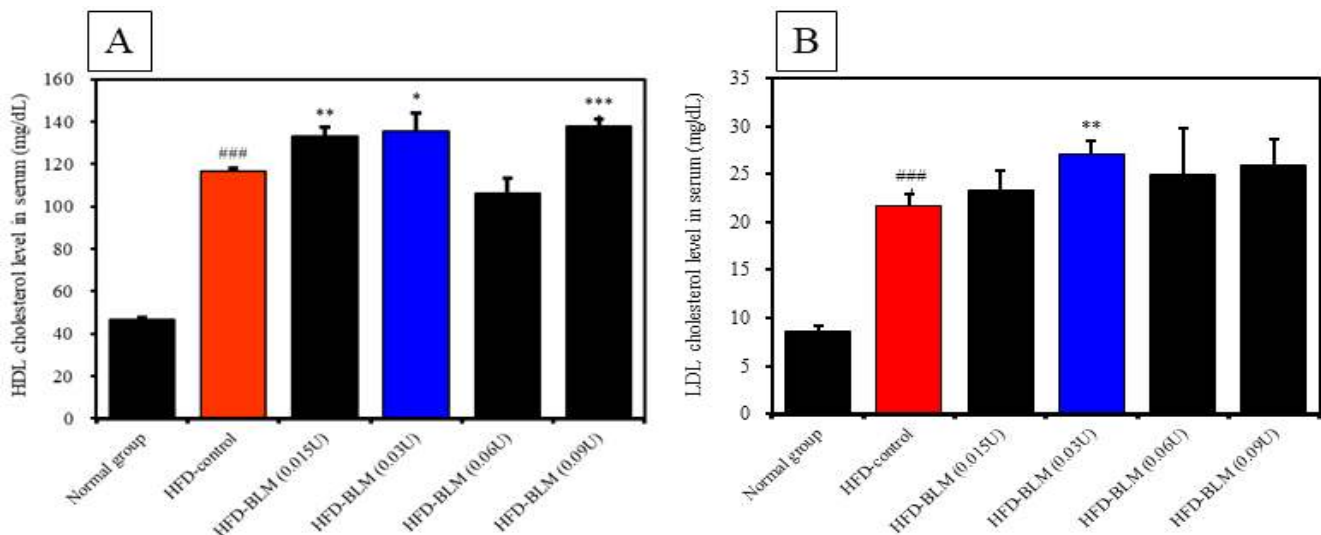
**[Fig.5]. Effect of various concentration bleomycin treatment on glucose level in obese mice fed high fat diet (DIO mice).**

Glucose level in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Serum glucose level were analyzed using a Hitachi 7020 Automatic Analyzer. Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.



**[Fig.6]. Effect of various concentration bleomycin treatment on creatinine level in obese mice fed high fat diet (DIO mice).**

Creatinine level in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Serum creatinine level were analyzed using a Hitachi 7020 Automatic Analyzer. Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.



**[Fig. 7]. Effect of various concentration bleomycin treatment on HDL & LDL cholesterol level in obese mice fed high fat diet (DIO mice).**

HDL (A) & LDL (B) cholesterol level in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Serum HDL (A) & LDL (B) cholesterol level were analyzed using a Hitachi 7020 Automatic Analyzer. Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.

#### 4) 혈중 creatinine

정상군에 비하여 고지방 사료를 식이한 대조군의 혈청내 크레아틴(creatinine)은 유의미한 차이가 없었다. Bleomycin 0.015U 투여군에서 크레아티닌(creatinine) 수준이 비만대조군에 비해 높았고, bleomycin 0.03U, 0.06U, 그리고 0.09U (U/100g bw)에서는 통계학적으로 유의미한 차이가 없었다 (Fig. 6).

#### 5) 혈중 HDL, LDL cholesterol

비만대조군 (HFD-control)의 혈청내 고밀도 콜레스테롤 (HDL-cholesterol) 수준은 정상대조군의 혈청내 고밀도 콜레스테롤 (HDL-cholesterol)에 비하여 유의성 있게 증가를 나타내었다 ( $p < 0.001$ ). HFD 투여 8주 후 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 bleomycin 0.015U와 0.03U, 0.09U 투여군에서는 고밀도 콜레스테롤(HDL-cholesterol)의 수준이 유의성 있게 증가했고 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ), bleomycin 0.06U 투여군에서는 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 감소하였다(Fig. 7A).

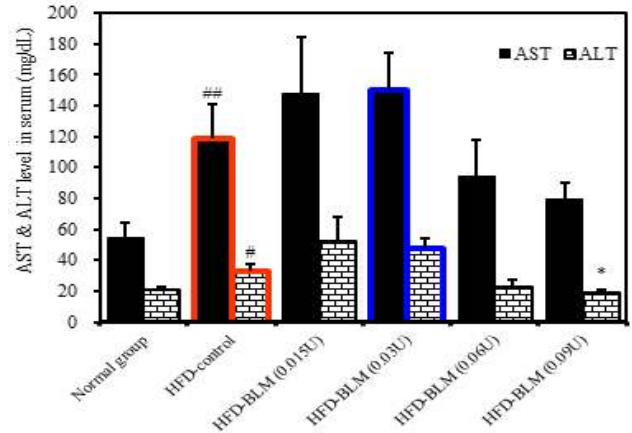
비만대조군 (HFD-control)의 혈청내 저밀도 콜레스테롤 (LDL-cholesterol) 수준은 정상대조군의 혈청내 고밀도 콜레스테롤 (HDL-cholesterol)에 비하여 유의성 있게 높았다( $p < 0.001$ ). 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 bleomycin투여농도 0.015U와 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) 의존적으로 저밀도 콜레스테롤 (LDL-cholesterol)의 수준이 증가를 나타내었다. 통계학적 유의성은 0.03U ( $p < 0.01$ ) 투여농도에서 나타났다 (Fig. 7B).

#### 6) 혈중 AST, ALT

비만대조군(HFD-control)의 혈청내 AST와 ALT 수준은 정상대조군의 AST와 ALT 수준에 비하여 유의하게 높았다( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). HFD 투여 8주 후 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 bleomycin 0.015U와 0.03U 투여군에서 농도 의존적으로 AST와 ALT 수준이 증가를 나타내었고, 0.06U과 0.009U에서는 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 낮았다 (Fig. 8).

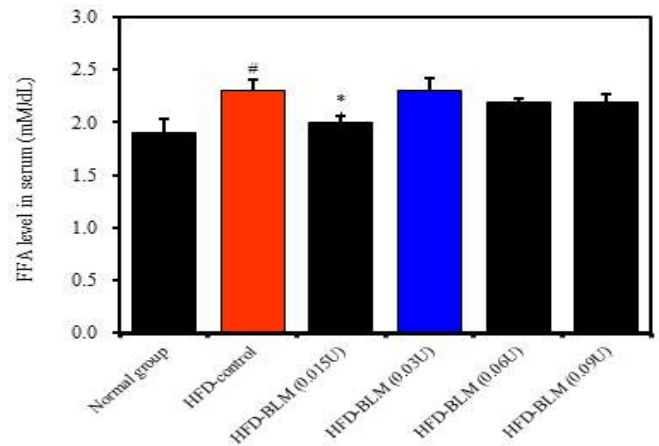
#### 7) 혈중 free fatty acid

비만대조군(HFD-control)의 혈청내 free fatty acid (FFA) 수준은 정상대조군의 free fatty acid (FFA) 수준에 비하여 유의성 있게 증가를 나타내었



**[Fig.8]. Effect of various concentration bleomycin treatment on AST & ALT cholesterol level in obese mice fed high fat diet (DIO mice).**

AST & ALT level in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Serum AST & ALT level were analyzed using a Hitachi 7020 Automatic Analyzer. Values are presented as the mean $\pm$ SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.



**[Fig.9]. Effect of various concentration bleomycin treatment on free fatty acid (FFA) level in obese mice fed high fat diet (DIO mice).**

Free fatty acid (FFA) level in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Serum Free fatty acid (FFA) level were analyzed using a Hitachi 7020 Automatic Analyzer. Values are presented as the mean $\pm$ SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.

다( $p < 0.05$ ). HFD 투여 8주 후 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 bleomycin투여농도 0.015U, 0.03U 0.06U 그리고 0.009U (U/100g bw)에서는 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 9).

### 8) 혈중 adiponectin

비만대조군(HFD-control)의 혈청내 아디포넥틴(adiponectin) 수준은 정상대조군에 비하여 2배 가까이 낮았다( $p < 0.001$ ). Bleomycin 0.015U와 0.03U 투여군에서 농도 의존적으로 아디포넥틴(adiponectin)수준이 비만대조군에 비해 소폭 높았고( $p < 0.01$ ), bleomycin 0.06U과 0.009U 투여군에서는 비만대조군에 비해 2배이상 높아서 정상군에 가까웠다( $p < 0.001$ ) (Fig. 10).

### 9) 혈중 IGF-1

비만대조군(HFD-control)의 혈청내 IGF-1 수준은 정상대조군에 비하여 약 2배 증가를 나타내었다( $p < 0.001$ ). HFD 투여 8주 후 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 bleomycin투여농도 0.015U와 0.03U 투여군(U/100g bw)에서 농도 의존적으로 IGF-1 생산량의 수준이 약간 증가를 나타내었고, bleomycin 투여농도 0.06U과 0.009U ( $p < 0.01$ ) (U/100g bw)에서는 비만대조군(HFD-NC)에 비하여 감소를 나타내었다 (Fig. 11).

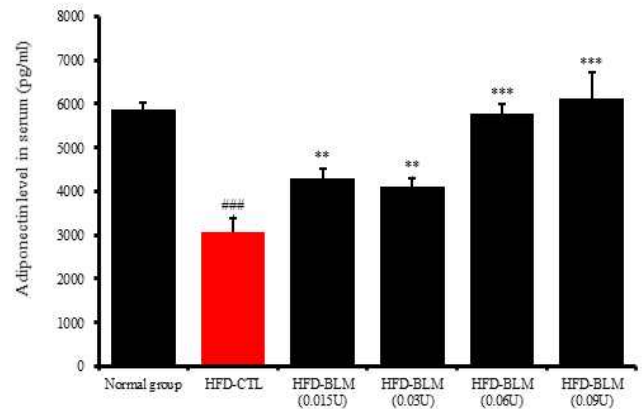
### 10) 혈중 leptin

비만대조군(HFD-control)의 혈청내 leptin 생산량은 정상대조군의 혈청내 leptin 생산량의 수준에 비하여 유의미하게 높았다( $p < 0.001$ ). Bleomycin 0.03U 투여군에서 leptin 생산량은 비만대조군에 비해 높았고, bleomycin 0.015U, 0.06U과 0.009U 투여군에서는 비만대조군에 비해 통계학적으로 유의미하게 낮았다( $p < 0.01$ ) (Fig. 12).

## 3. mRNA 분석

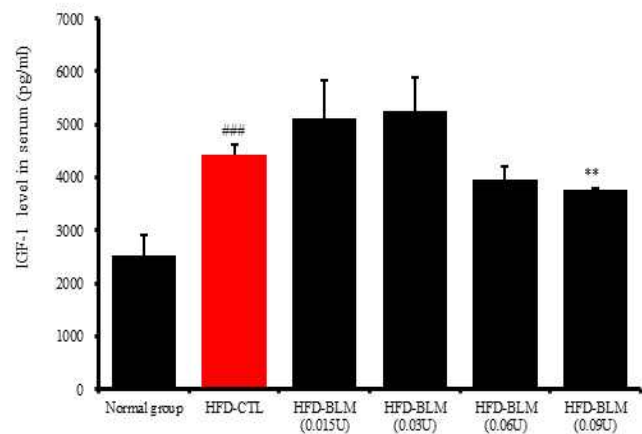
### 1) 부고환지방 조직의 지방합성 관련 유전자 발현 분석

부고환지방(Epididymis Fat) 조직의 지방 합성 관련 유전자 Leptin, PPAR- $\gamma$ , SREBP1c/ADD1, ACC, FAS mRNA 발현을 분석하였다. 비만대조군



[Fig.10]. Effect of various concentration bleomycin treatment on adiponectin production level in obese mice fed high fat diet (DIO mice).

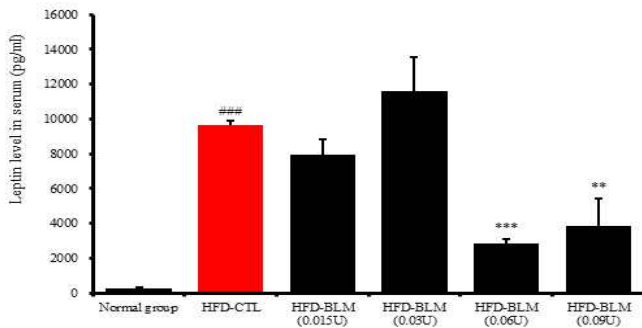
Adiponectin production level in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Serum adiponectin production levels were analyzed using ELISA (R&D system, USA). Values are presented as the mean $\pm$ SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.



[Fig.11]. Effect of various concentration bleomycin treatment on IGF-1 production level in obese mice fed high fat diet (DIO mice).

IGF-1 production level in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Serum IGF-1 production levels were analyzed using ELISA (R&D system, USA). Values are presented as the mean $\pm$ SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.





**[Fig.12]. Effect of various concentration bleomycin treatment on leptin production level in obese mice fed high fat diet (DIO mice).**

Leptin production level in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 10). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Serum leptin production levels were analyzed using ELISA (R&D system, USA). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.

(HFD-control) 은 정상대조군에 비하여 모든 항목에서 통계학적으로 유의하게 높았다(Leptin, PPAR- $\gamma$ , ACC :  $p < 0.05$ , SREBP1c/ADD1 :  $p < 0.01$ , FAS :  $p < 0.001$ ). Bleomycin 0.015U와 0.03U 투여군에서 대조군에 비해 모든 유전자 발현이 증가하였고, SREBP1c/ADD1 mRNA의 경우 통계학적으로 유의미하였다. Bleomycin 0.06U와 0.009U 투여군에서는 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 낮았다 (Fig. 13).

## 2) 부고환지방 조직의 염증 관련 유전자 발현 분석 결과

부고환지방(Epididymis Fat) 조직의 염증 관련 유전자 IL-6와 TNF- $\alpha$  mRNA 발현을 분석하였다. 비만대조군(HFD-control)의 지방합성관여와 관련된 유전자 발현은 정상대조군 (c57bl/6j\_Nr)에 비하여 통계학적으로 유의미하게 높았다 ( $p < 0.01$ ). Bleomycin 투여농도 0.015U와 0.03U (U/100g bw)에서 비만대조군 (HFD-NC)에 비해 염증 IL-6 mRNA는 유의미하게 높았고(Fig.14A), TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현 또한 높게 나타났다 (Fig.14 B). Bleomycin 투여농도 0.06U와 0.009U (U/100g bw)에서는 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 낮았다 (Fig. 14).

## 3) 폐조직의 염증 관련 유전자 발현 분석 결과

폐조직 (lung tissue)에서의 염증 관련 유전자 IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, NOS-II mRNA 발현을 분석하였다. 비만대조군 (HFD-control)의 염증 관련 유전자 발현은 정상대조군 (c57bl/6j\_Nr)에 비해 높았고, COX-2 와 NOS-II mRNA에서 통계학적으로 유의미한 결과를 보였다 (각각  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). Bleomycin투여농도 0.015U와 0.03U 투여군 (U/100g bw)에서 모든 유전자 발현이 대조군에 비해 높았다. Bleomycin 투여농도 0.06U와 0.009U (U/100g bw)에서는 비만대조군 (HFD-NC)에 비해 낮았다 (Fig. 15).

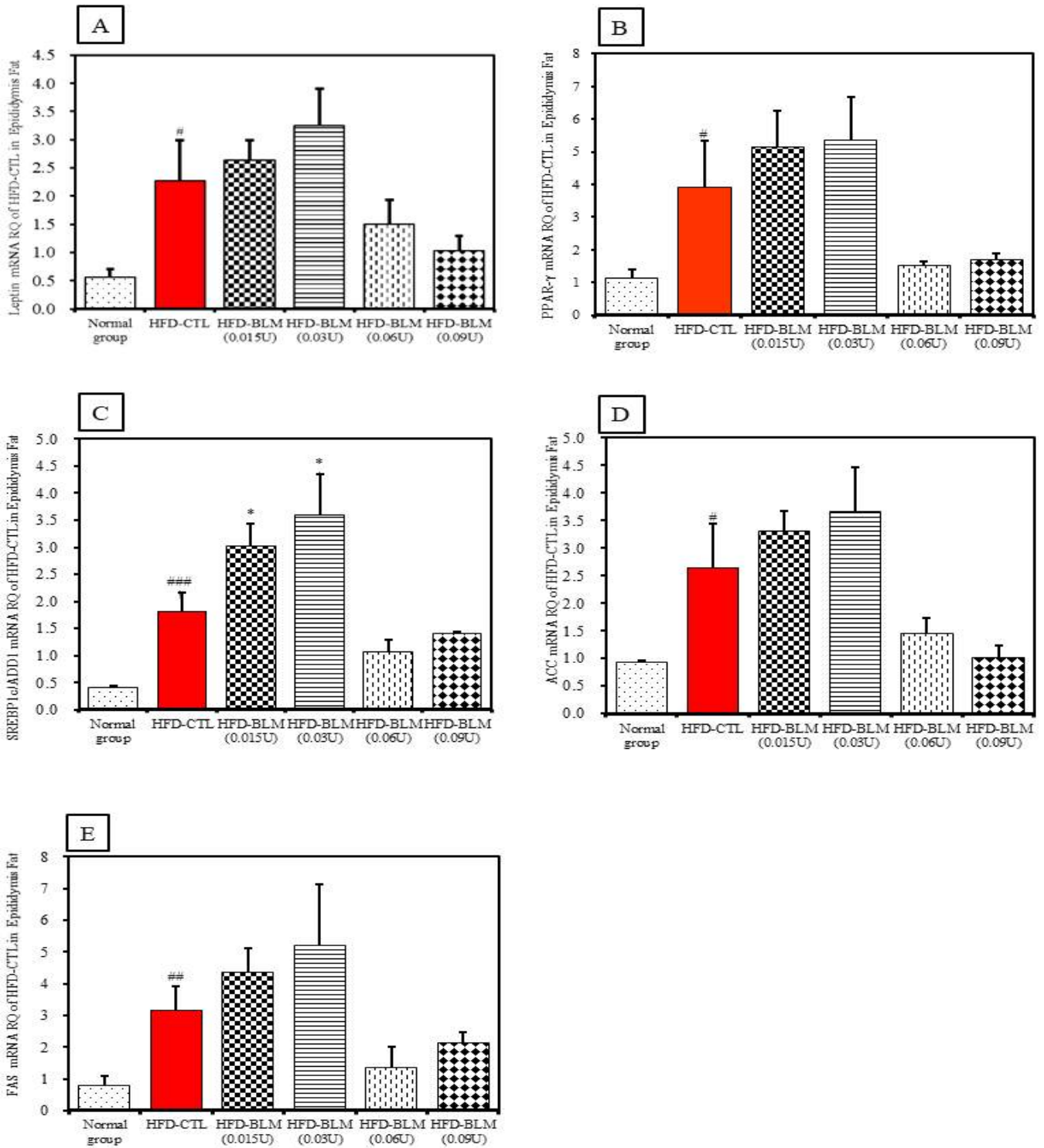
## 4. 장기조직 검사

### 1) 지방량 분석

실험 종료 후 피하지방량 (Abdominal subcutaneous fat), 부고환주변 백색지방 (Epididymal adipose tissue), 신장주변 백색지방량 (Kidney adipose tissue), 그리고 창자주변 백색지방량 (Intestine adipose tissue)을 분석하였다. 비만대조군(HFD-control)은 정상대조군(c57bl/6j\_Nr)에 비해 모든 항목에서 통계학적으로 유의미한 증가를 나타내었다( $p < 0.001$ ). 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 Bleomycin 0.015U와 0.03U 투여군 (U/100g bw)에서 지방량 모든 항목이 증가하였고, 0.03U 투여군에서는 통계학적으로 유의미하였다. Bleomycin 0.06U와 0.009U (U/100g bw)에서는 비만대조군 (HFD-NC)에 비해 유의미한 감소를 보였다 (Fig. 16).

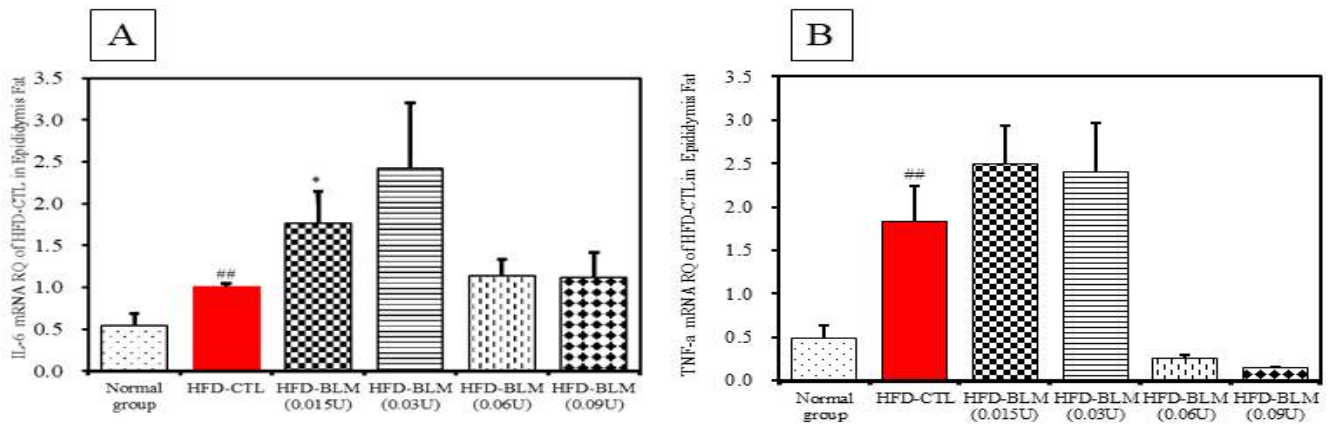
### 2) 간, 신장, 비장 무게 분석

비만대조군 (HFD-control)의 간 무게(liver weight), 신장 무게(kidney weight), 비장 무게(spleen weight)는 정상대조군 (c57bl/6j\_Nr)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높아졌다. 최종 간 장기무게는 HFD 투여 8주 후 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 bleomycin투여농도 0.015U와 0.03U 투여군 (U/100g bw)에서 간 장기무게가 농도의존적으로 증가하였고, bleomycin 투여농도 0.06U와 0.009U (U/100g bw)에서는 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 감소했다. 신장과 비장 무게는 그룹 간 차이가 없었다 (Fig. 17).



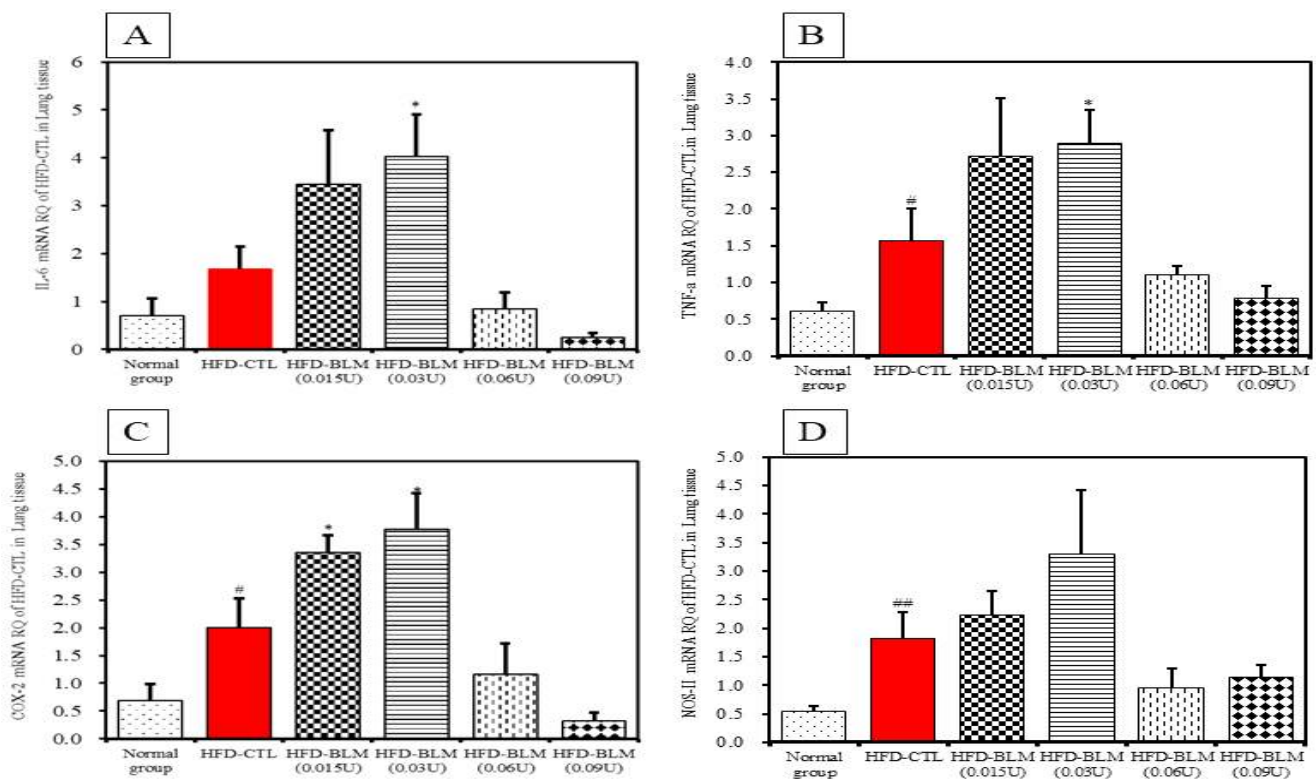
**[Fig.13]. Effect of various concentration bleomycin treatment on leptin, PPAR-γ, SREBP1c/ADD1, ACC , and FAS mRNA gene expression in obese mice fed high fat diet (DIO mice).**

Leptin (A), PPAR-γ (B), SREBP1c/ADD1 (C), ACC (D), and FAS (E) mRNA gene expression in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means ± SEM (n = 10). Values are presented as the mean ± SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at p <0.05 as determined by Tukey's range test. Leptin (A), PPAR-γ (B), SREBP1c/ADD1 (C), ACC (D), and FAS (E) mRNA gene expression in epididymal white adipose tissue was analysis using quantitative real-time PCR (ABI7500, Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA). Values are presented as the mean±SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at p <0.05 as determined by Tukey's range test.



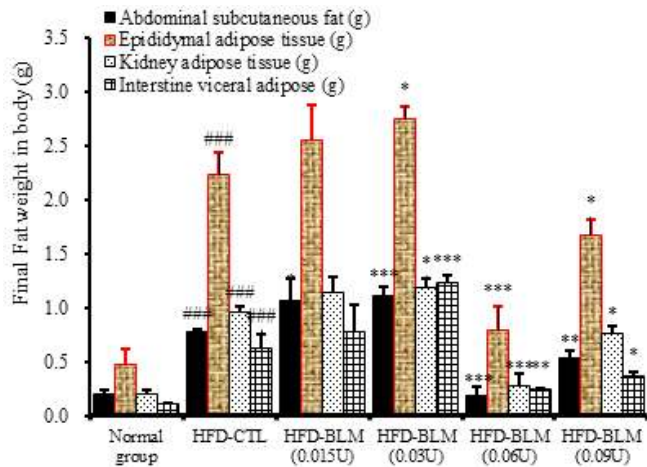
**[Fig.14]. Effect of various concentration bleomycin treatment on inflammatory IL-6, and TNF-α mRNA gene expression in epididymal white adipose tissue in obese mice fed high fat diet (DIO mice).**

Inflammatory IL-6 (A), and TNF-α (B) mRNA gene expression in epididymal white adipose tissue in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means ± SEM (n = 10). Values are presented as the mean ± SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at p <0.05 as determined by Tukey's range test. Inflammatory IL-6 (A), and TNF-α (B) mRNA gene expression in epididymal white adipose tissue was analysis using quantitative real-time PCR (ABi7500, Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA). Values are presented as the mean±SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at p <0.05 as determined by Tukey's range test.



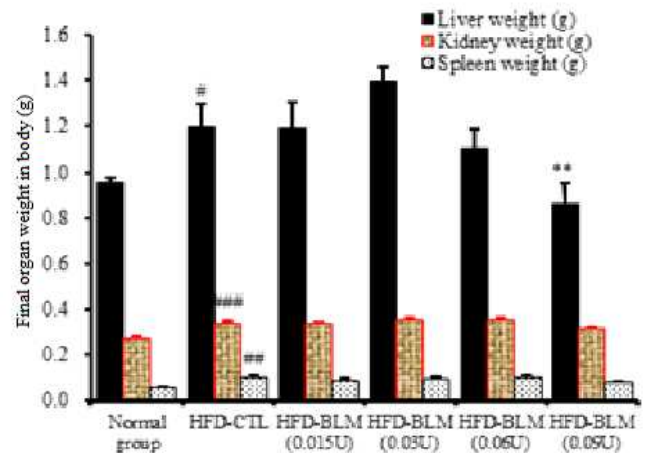
**[Fig.15]. Effect of various concentration bleomycin treatment on inflammatory factor related gene expression in lung in obese mice fed high fat diet (DIO mice).**

Inflammatory factor related gene expression in lung in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are expressed as means ± SEM (n = 10). Values are presented as the mean ± SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at p <0.05 as determined by Tukey's range test. Inflammatory IL-6 (A), TNF-α (B), COX-2 (C), and NOS-II (D) mRNA gene expression in lung was analysis using quantitative real-time PCR (ABi7500, Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA). Values are presented as the mean±SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at p <0.05 as determined by Tukey's range test.



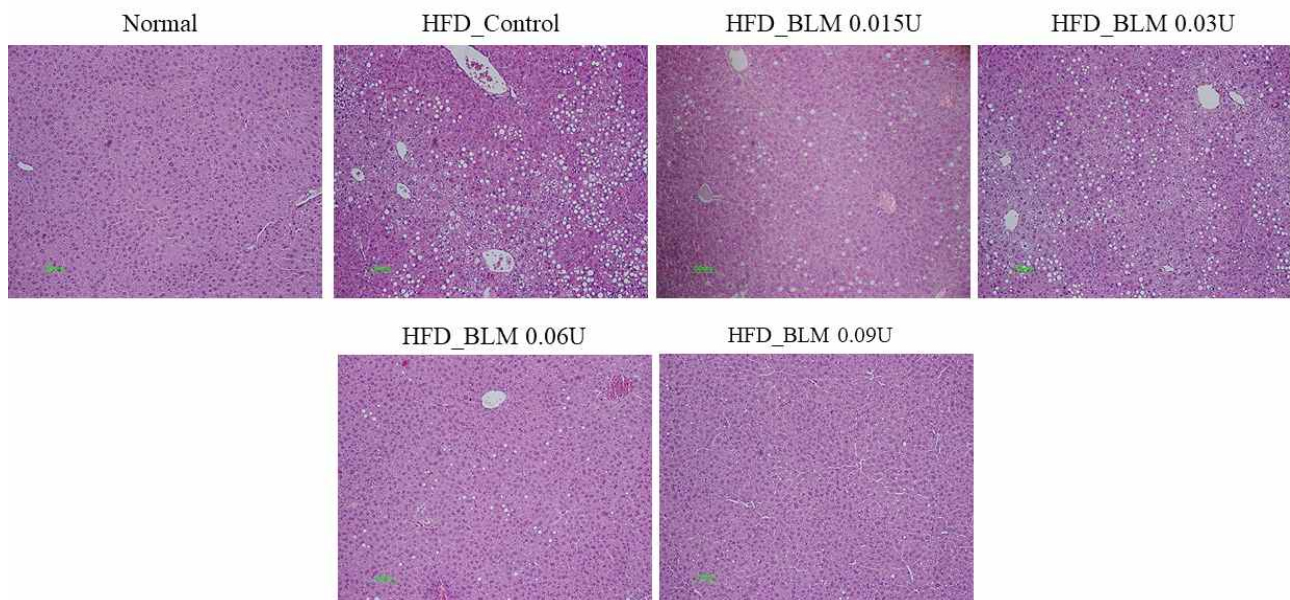
[Fig.16]. Effect of various concentration bleomycin treatment on total final fat weight in body in obese mice fed high fat diet (DIO mice).

Total fat weight in body in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Total fat weight (Abdominal subcutaneous fat (g), Epididymal adipose tissue (g), Kidney adipose tissue (g), Interstine visceral adipose (g)) in body using weight change was measured using an electronic balance (XB / Precisa, Swiss). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.



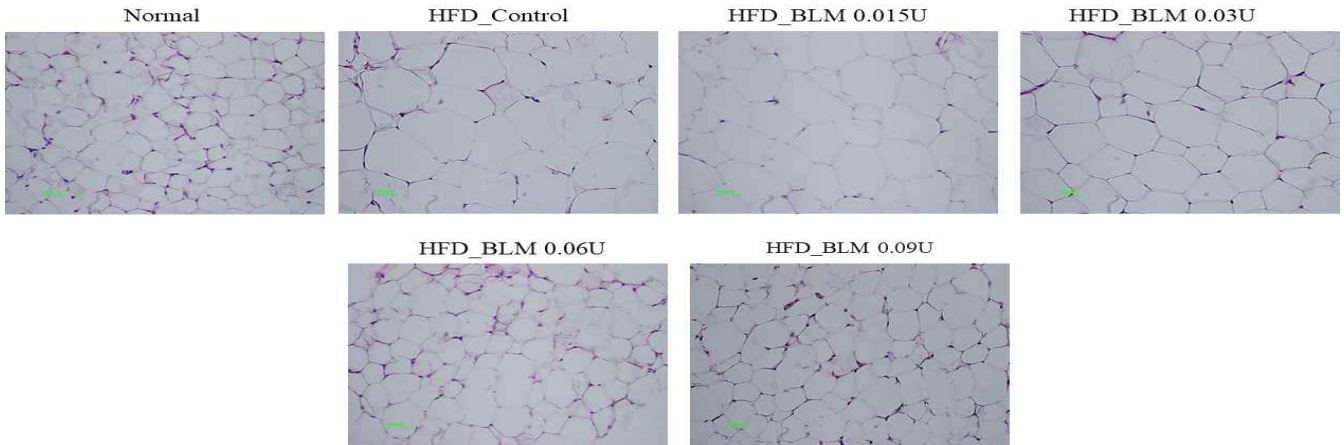
[Fig.17]. Effect of various concentration bleomycin treatment on organ weight in body in obese mice fed high fat diet (DIO mice).

Organ weight in body in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test. Organ weight (liver, kidney, spleen) in body using weight change was measured using an electronic balance (XB / Precisa, Swiss). Values are presented as the mean  $\pm$  SE. Values within arrow with different letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Tukey's range test.



[Fig.18]. Effect of various concentration bleomycin treatment on liver tissue in obese mice fed high fat diet (DIO mice).

Liver tissue histology in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). H&E staining (A) & Oil red O (B) of liver tissue. These images were captured under a light microscope at  $\times 100$  magnification.



**[Fig.19]. Effect of various concentration bleomycin treatment on epididymis fat tissue in obese mice fed high fat diet (DIO mice).**

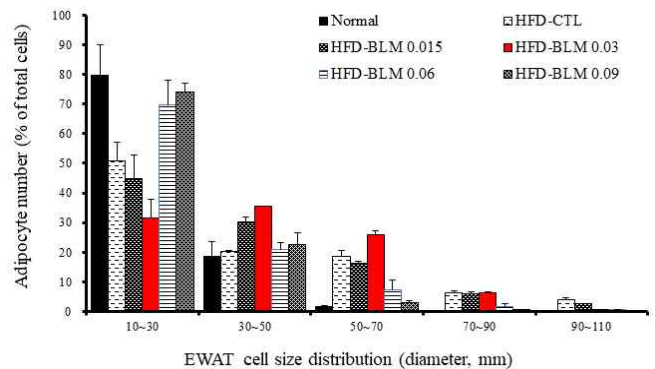
Epididymis fat tissue histology in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). H&E staining of epididymis fat tissue. These images were captured under a light microscope at x100 magnification.

### 3) 간의 조직학적 분석

시험물질에 따른 간 조직검사(H&E 염색)를 하였다. 비만을 유발한 비만대조군 (HFD-NC) 간조직에서는 마이크로 지방구가 간세포질에 축적되어 마이크로 지방구들이 거대세포성(macrovesicular) 지방증으로 진행되어 조직상에 큰 지방구들이 나타나며, 지방의 축적으로 회색지방축적세포들이 넓게 분포하는 비만이 나타난다. 고지방식이 대조군 (HFD-control)에 비하여 bleomycin투여농도 0.015U와 0.03U 투여군 (U/100g bw)에서 농도의존적으로 회색지방축적세포들이 전체에 존재하였고, 거대세포성(macrovesicular) 지방증도 증가하였다. 그러나 bleomycin 투여농도 0.06U와 0.009U (U/100g bw)에서는 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 현저하게 감소했다 (Fig. 18).

### 4) 부고환의 조직학적 분석

시험물질에 따른 부고환(epididymis) 조직검사(H&E 염색)를 하였다. 비만대조군 (HFD-NC) 부고환 조직은 정상식이 정상군(C57bl/6J-normal)과 비교하여 지방세포 크기 및 분포도가 증가하였다. 고지방식이 대조군 (HFD-control)에 비하여 bleomycin 투여농도 0.015U와 0.03U 투여군 (U/100g bw)에서 농도의존적으로 부고환 주변 지방세포 크기 및 분포도가 증가를 나타냄을 관찰할 수 있었다. 특히, bleomycin투여농도 0.03U 투여군 (U/100g bw)에서 현저하게 나타났다. 그러나 bleomycin 투여농도 0.06U와 0.009U (U/100g bw)에서는 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 현저하게 감소를 나타내어 정상군에 가깝게 부고환 주변 지방세포 크기 및 분포도가 관찰되었다 (Fig. 19-20).

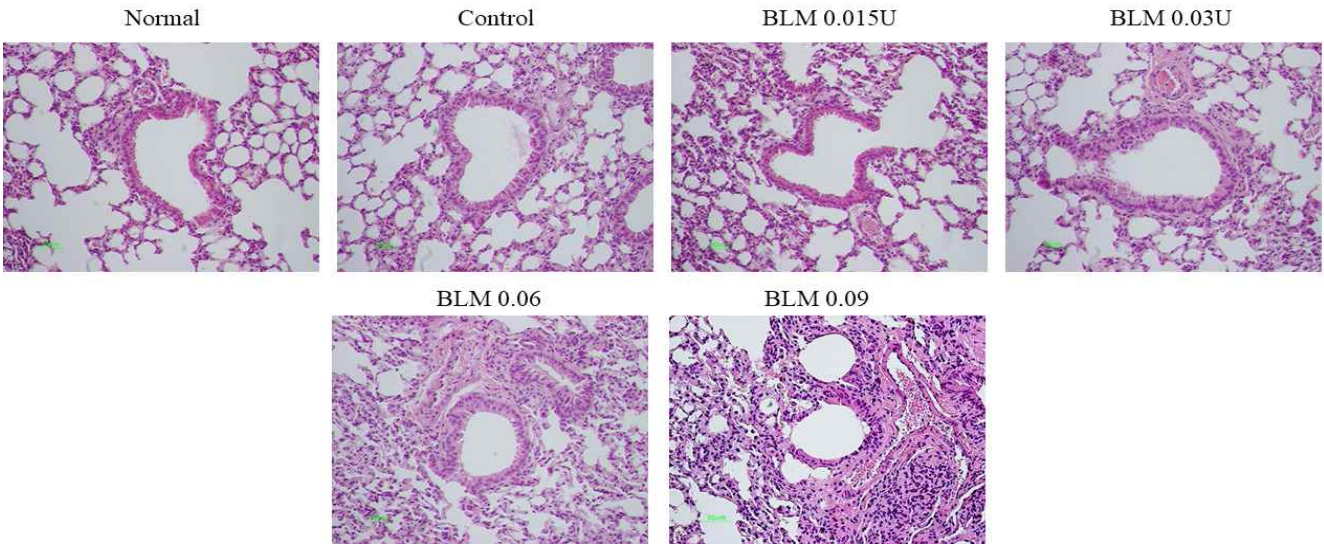


**[Fig.20]. Adipocytes area and cell size distribution were measured on the epididymal white adipose tissue after 8 weeks.**

Adipocytes area and cell size distribution were measured on the epididymal white adipose tissue in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). H&E staining of epididymis fat tissue. These images were captured under a light microscope at x100 magnification.

### 5) 폐조직의 조직학적 분석

시험물질에 따른 폐조직(lung tissue) 검사(H&E 염색)를 하였다. 비만대조군 (HFD-NC) 폐조직은 정상식이 정상군(C57bl/6J-normal)과 비교하여 염증 부위 분포도 증가하였다. 고지방식이 대조군 (HFD-control)에 비하여 bleomycin투여농도 0.015U와 0.03U 투여군 (U/100g bw)에서 거의 폐염증 부분이 나타나지 않았고, bleomycin 투여농도 0.06U와 0.009U (U/100g bw)에서는 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 현저하게 폐섬유화 및 염증 증가를 나타내었다 (Fig. 21).



[Fig.21]. Effect of various concentration bleomycin treatment on lung tissue in obese mice fed high fat diet (DIO mice).

Lung fat tissue histology in obese mice fed high fat diet for 8 weeks. C57bl/6\_Nr group, normal diet group; HFD\_control, bleomycin conc. 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw) plus 60% high fat diet group; HFD-BLM\_0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw). H&E staining of lung tissue. These images were captured under a light microscope at x100 magnification.

#### IV. 考察

사상의학에서는 개인 고유의 체질에 따라 질병의 진단 및 치료 방향을 결정한다. 사상체질 의약품의 연구와 표준화를 통한 발전을 위해서는 동물실험이 선행되어야 하는데, 인간이 아닌 체질 동물모델 개발에서 가장 큰 문제점은 인간의 사상체질분류법과 같이 性情에 따른 장부편차를 구현할 수 없다는 것이다. 따라서 본 연구에서는 실현하기 어려운 성정보다는, 장부의 기능을 인위적으로 변형하여 체질모델을 가정하고 실험을 진행하였다.

사상의학에서 태음인은 偏小之臟인 肺의 기운이 손상되어 질병이 발생하는 체질이기 때문에<sup>7</sup> 태음인 처방은 모두 保命之主인 肺의 呼散之氣를 정상화하고 보해주는 약제로 구성되어있다. 태음인은 다른 체질에 비해 FVC%pred와 FEV1%pred가 낮으며 폐기능장애가 뚜렷하게 나타난다는 선행 연구 결과가 있으며<sup>8</sup>, 박동의 연구<sup>9</sup>에서는 대사증후군 위험인자 중 이상지질혈증과 복부비만, 공복혈당 상승이 폐기능장애와 연관이 있다고 하였다. 실제로 사상체질에 따른 대사증후군의 유병률은 태음인이 46.3%로 다른 체질에 비해 통계학적으로 유의미하게 높으며<sup>10</sup>, 특히 태음인은 비만해지기 쉬운 특징이 있다<sup>11</sup>. 『東醫壽世保元』 四象人辨證論에서도 “太陰人は 體形이 長大하고 肌肉이 堅實하다.” 고 하였다<sup>12</sup>.

김 등<sup>13</sup>의 선행연구에서는 Bleomycin으로 폐손상과 폐섬유화를 유발한 동물모델이 태음인의 특징과 유사하게 대사증후군과 심혈관계질환에 취약함을 확인하였다. 이에 본 연구에서는 조금 더 나아가서, bleomycin을 농도별로 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw)을 Intra-Nasal-Trachea (INT) injection 방법으로 주입하여 폐장변증을 유도한 후 8주간 고지방식이 (60% HFD)를 투여하여 비만마우스 (DIO)를 유도하여서 태음인 비만 모델 마우스를 만들기 위한 bleomycin의 적정 농도를 알아보고자 하였다.

식이효율 (feeding efficiency ratio: FER%) = 체중증가량 (g)/사료섭취량 (g)×100의 공식에서 의미하는 바와 같이 사료를 섭취하는 양이 많음에도 불구하고 체중의 증가가 적다는 것은 비만 조절효과가 있는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 식이효율은 비만의 척도로 사용할 수 있고, 식이효율의 수치가 높을수록 비만 유발 효과가 있다고 할 수 있다. 본 연구에서 비만대조군과 비교하였을 때 Bleomycin 농도 0.03U 투여 쥐에서 체중과 식이효율이 가장 높았고, 0.06U과 0.09U에서는 오히려 대조군보다 낮았다. 실험 종료 후 체내의 지방량을 측정하였을 때에도 피하지방량 (Abdominal subcutaneous fat), 부고환주변 백색지방 (Epididymal adipose tissue), 신장주변 백색지방량 (Kidney adipose tissue), 그리고 창자주변 백색지방량 (Intestine adipose tissue) 모

두 Bleomycin 0.015U와 0.03U 투여군에서는 비만 대조군에 비해 증가하였고, 0.06U와 0.009U 농도로 투여한 군에서는 유의미하게 낮았다. 이는 Bleomycin을 0.03U 농도로 투여하여 폐손상을 발생시켰을 때, 태음인과 유사하게 비만에 취약한 동물이 유발될 수 있음을 가정할 수 있다.

혈청 검사에서도 일관된 결과를 볼 수 있었다. 혈중 총콜레스테롤(total cholesterol)과 저밀도 콜레스테롤(LDL-cholesterol) 수준은 비만 유발 대조군에 비해 Bleomycin 농도 0.015U과 0.03U에서 높았으며, 0.03U에서 가장 높았고 통계학적으로 유의미했다. 체중이 증가하면 glucose에 대한 말초 저항을 유발시켜서 혈중 혈당량을 증가시키기 때문에<sup>14</sup>, 비만을 유도한 대조군에서 정상군에 비해 유의미한 혈중 glucose 상승하였다고 볼 수 있다. Bleomycin 농도 0.015U과 0.03U 투여군에서는 비만 대조군에 비해 더 높은 glucose를 확인할 수 있었다.

Adiponectin은 지방세포에서 유래한 사이토카인으로, free fatty acid를 감소시키고 혈중 지질 농도를 개선시키며, 혈당 조절 효과가 있다<sup>15</sup>. 따라서 Adiponectin은 지방세포에서 분비되는데도 불구하고 비만한 경우 역설적으로 낮은 수치를 보인다<sup>16</sup>. 본 임상시험에서도 비만대조군은 정상군에 비해 혈중 adiponectin 농도가 유의미하게 낮았다. Bleomycin 농도 0.015U과 0.03U 그룹에서는 비만대조군에 비해서 Adiponectin 수치가 높아졌지만 정상군에 비해서는 낮았고, 0.06U과 0.009U 그룹에서는 정상군에 가깝게 유의성 있는 증가를 보였다.

Leptin은 사람과 쥐에서 BMI와 adipose tissue mass와 밀접한 관계가 있다고 알려져있다. Leptin에 대한 민감도 저하는 비만을 유발하고, 그 결과 보상작용으로 혈장의 leptin 양이 증가한다. 따라서 혈중 leptin은 체중 증가의 지표로 볼 수 있다<sup>17</sup>. 실험 결과 비만대조군의 leptin 농도는 정상군에 비해 현저한 증가를 보였고, 실험군 중 bleomycin 0.03U 투여군에서 비만대조군보다 더 높은 leptin 수치를 보였다. 반면, bleomycin 투여농도 0.015U, 0.06U 그룹에서는 비만대조군과 비교하여 통계학적으로 유의미한 감소를 보였다.

Leptin, PPAR- $\gamma$ , SREBP1c/ADD1, ACC, FAS

mRNA의 발현은 지방생성을 촉진시킨다. 이 유전자들이 활성화되면, 지방 전구세포가 성숙한 지방세포로 분화한다<sup>18-19</sup>. 부고환지방 조직에서 상기 유전자 발현을 분석한 결과 bleomycin 0.015U과 0.03U의 농도로 투여하였을 때 모든 항목에서 비만대조군보다 높았고, SREBP1c/ADD1 mRNA의 경우 통계학적으로 유의미한 결과를 보였다. 반면, Bleomycin 투여농도 0.06U와 0.009U (U/100g bw)에서는 비만대조군 (HFD-NC)에 비하여 낮았다.

Bleomycin이 체내에 유발하는 염증을 보기 위해 부고환지방 조직과 폐조직의 염증 관련 유전자 발현을 분석하였다. 부고환지방 조직의 IL-6와 TNF- $\alpha$  mRNA는 Bleomycin투여농도 0.015U과 0.03U에서는 대조군에 비해 높았으나 0.06U와 0.009U의 농도에서는 대조군보다 낮았다. 폐조직에도 일관성 있는 결과를 보였는데, IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, NOS-II mRNA 모두 Bleomycin투여농도 0.015U과 0.03U에서는 대조군에 비해 높았으나 0.06U와 0.09U의 농도에서는 대조군보다 낮았다.

위의 결과들을 종합적으로 보았을 때, 고지방사료 (HFD)로 유도한 비만모델에 비하여 bleomycin을 0.015U과 0.03U (U/100g bw)의 농도로 주입한 그룹에서 체중을 증가시킬 뿐만 아니라, 혈중 중성지방 (triglyceride, TG)와 저밀도 콜레스테롤 (LDL cholesterol, LDL-c), 혈당 (glucose) 수준 증가, 간 기능 (AST와 ALT) 수준 증가, 염증사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 생산량 수준 증가, 지방조직의 수준 및 지방세포 크기를 증가시킴을 확인하였고 또한 간 조직에 지방구가 침착되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 Bleomycin을 0.03U (U/100g bw) 주입한 그룹에서 가장 효과적으로 혈중 지방세포분화 단백질 증가, 체중증가, 지방조직 중량 증가, 간 조직에 지방구가 침착 증가가 나타났다.

반면 bleomycin을 0.06U과 0.09U의 농도로 투여했을 때는 체중, 식이효율, 체내 지방량, 혈중 지질 등 비만 관련 수치에서 0.015U과 0.03U 투여군에 비해 비만 정도가 감소하는 결과를 보였다. 염증 관련 유전자 발현도 0.06U 이상에서는 감소하는 결과를 보였다. 사상체질의학의 이론에서는 肺弱한 태음인이 비만에 취약하다고 하나, Bleomycin 약물 농도가 증가함에 따라 무제한적으로 폐섬유화와 비만 진

행 정도가 비례하는 것은 아닐 것으로 판단된다. 따라서 본 실험의 목적인 太陰人과 유사한 肺弱과 비만을 동시에 만족하는 모델을 만들기 위한 Bleomycin의 농도결정 연구 결과 0.03U/100g 이 가장 적합한 것으로 보인다.

이번 연구의 제한점은 사상의학의 태음인 병증분류에서 논하는 肺小의 개념이 장부 肺의 기능 약화의 의미와 동일하지 않다는 것이다. 하지만 현실적으로 인간과 다른 동물을 체질로 분류하는데 있어서 인간과 동일한 방법을 실현하는 것은 불가능하며 의학의 발전을 위해서는 in-vivo, in-vitro 실험의 선행과 clinical trial로 연계가 중요하기 때문에 장부 손상을 유도하여 태음인과 유사하게 비만에 취약한 모델이 만들어진 것을 확인했다는 점에서 의의가 있다. 추후에도 사상의학에서 정의하는 태음인 肺小의 의미에 대한 지속적인 고찰이 필요하다. 또한, 선행 리뷰 연구에 따르면 Bleomycin으로 유발한 폐섬유화는 7일째부터 시작되며 14~21일에서 극대화 되는 경향이 있다고 하였다. 본 실험에서는 쥐에 Bleomycin을 투여한 기간이 8주밖에 되지 않아서 그 이후에 나타나는 변화를 추적하지 못한 점에 대해 아쉬움이 있다.

## V. 結論

고지방사료(HFD)로 유도한 비만모델에 bleomycin을 0.015U, 0.03U, 0.06U, 0.09U (U/100g bw)의 농도로 주입하였을 때 0.015U과 0.03U을 주입한 그룹에서 비만에 더 취약한 모델이 만들어졌으며, 0.03U의 농도에서 가장 효과적으로 혈중 지방세포분화 단백질 증가, 체중증가, 지방조직 중량 증가, 간 조직에 지방구가 침착 증가가 나타났다. 반면 bleomycin을 0.06U 이상의 농도로 투여했을 때는 급격한 폐기능 약화 및 염증으로 비만마우스의 모델이 만들어지지 않았다.

## VI. Acknowledgement

상기 연구는 과학기술정보통신부 '체질 특성에 따른 대사성 질환의 치료 약물 및 기기 임상 연구' (과제 번호 : 2015M3A9B6028311)의 지원을 받아 수행되었음.

## VII. References

1. Kim JY, Pham DD. Sasang constitutional medicine as a holistic tailored medicine. Evid Based Complement Alternat Med. 2009;6:11-9.
2. Lee JM. Dongeiseusebowon. Seoul: Daesungmoonhwasa. 1997;1:5, 4:1,10,29-32. (Korean)
3. Lee JM. Dongeiseusebowon. 2nd rev. Seoul: Yeogang. 2003:36,278. (Korean)
4. Cho MS, Koh GH, Song IB. A clinical study of the obesity patients according to sasang constitution. J Sasang Constitut Med 1998;10(2):485-511. (Korean)
5. Kim YH et al. A Study of the Effect on Obesity in Taeumin Animal-experimental Model Induced Lung Fibrosis with Bleomycin, J Sasang Constitut Med 2016;28(2):147-162.
6. Jun Tashiro, Gustavo A. Rubio, Andrew H. Limper et al. Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Front. Med. 2017. 4, 118.
7. Lee JH, Lee EJ, Koh BH. A study on the schematic organization of the sub-classification system of the Taeumin symptomatology. J Sasang Constitut Med. 2011;23(1):63-78.
8. Lee SG et al. The study on the upgrade of QSCCII(II);the study on the re-validity of QSCCII. J Sasang Constitut Med. 2003;15:39-50. (Korean)
9. Pak YS, Kim JS, Lee JH, Lee EJ, Koh BH. Association between Sasang Constitution, Impaired Lung Function and Metabolic Syndrome among Middle-aged Adults in Korea. J Sasang Constitut Med 2013;25(3):180-194. (Korean)



10. Lee TG, Kwang MW, Lee SK, Choe BG, Koh BH, Song IB. A Study on the Prevalence and Risk Factors of the Metabolic Syndrome according to Sasang Constitution. *J Korean Med.* 2006;27(2): 14-22. (Korean)
11. Moon SH, Sin SH, Kim HJ, Kim JY. A relationship of the obesity and body composition analysis by Sasang constitution. *J Oriental Rehab Med.* 2002;12(4):1-10. (Korean)
12. Lee JM. Dongeiseusebowon. Seoul: Daesungmoonhwasa. 1993:19-24, 137-41. (Korean)
13. A Study of the Effect on Obesity in Taeumin Animal-experimental Model Induced Lung Fibrosis with Bleomycin, *J Sasang Constitut Med* 2016;28(2):147-162
14. Friedman JE, Dohm GL, Leggett-Frazier N, Elton CW, Tapscott EB, Pories WP, et al. Restoration of insulin responsiveness in skeletal muscle of morbidly obese patients after weight loss. Effect on muscle glucose transport and glucose transporter GLUT4. *J Clin Invest.* 1992;89:701-5.
15. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem.* 2004;50:1511-25.
16. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257(1):79-83.
17. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 1995;269(5223):543-6.
18. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 2004;86:839-48.
19. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:1293-307.