

방풍통성산이 고지방식이 유도 어린 비만 생쥐의 지방 축적에 미치는 영향

안상현¹ · 김기봉^{2,3,*}

¹세명대학교 한의과대학 해부학교실, ²부산대학교 한의학전문대학원, ³부산대학교한방병원 한방소아과

Abstract

Effect of Bangpungtongsungsan on Suppressing Fat Accumulation in High-fat Diet-Induced Young Obese Mice

Ahn Sang Hyun¹ · Kim Ki Bong^{2,3,*}

¹Dept. of anatomy, College of Korean Medicine, Semyung University

²School of Korean Medicine, Pusan National University

³Dept. of Pediatrics, Pusan National University Korean Medicine

Objectives

The aim of this study was to determine the inhibitory effects of Bangpungtongsungsan extract (BTS) on fat accumulation in high-fat diet-induced young obese mice.

Methods

The extract was administered to 3-week-old C57BL/6 male mice fed with a high-fat diet. The experimental groups were divided into a control group (Ctrl), high-fat diet group (HFDF), and BTS treated group after high fat diet feeding (BTST), with 10 mice assigned to each group. Lipid synthesis was observed to confirm the inhibition of fat synthesis. Changes in body weight, body fat percentage, and total cholesterol in the blood were observed to confirm weight control. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) and sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1 positivity was observed to confirm the inhibition of fat accumulation in liver tissue.

Results

Bangpungtongsungsan significantly inhibited lipid synthesis. Changes in body weight, body fat percentage, and total cholesterol in the blood were significantly lower in BTST rats than in HFDF rats. PPAR- γ and SREBP-1 positivity were significantly lower in BTST rats compared to HFDF rats.

Conclusions

This study confirms the potential of BTST to inhibit fat accumulation in obesity.

Key words: Bangpungtongsungsan, Obesity, Total cholesterol, PPAR- γ , SREBP-1

• Received: January 21, 2024 • Revised: February 13, 2024 • Accepted: February 23, 2024

*Corresponding Author: Kibong Kim

Department of Korean Pediatrics, Pusan National University Korean Medicine Hospital,
Geumo-ro 20, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea
Tel: +82-55-360-5952 / Fax: +82-55-360-5952

E-mail: kkb@pusan.ac.kr

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. Introduction

비만의 유병률은 서구식 식습관, 좌식 생활 방식, 신체활동 감소 등을 특징으로 하는 오늘날의 생활 습관과 연관되어 있다. 이러한 생활 습관은 죽상동맥경화증 (atherosclerosis)과 비알코올성 지방간 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)을 포함한 지방대사 장애를 증가시킨다¹⁻³. 최근 연구에 의하면 NAFLD 및 비알코올성 지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)의 세계적 유병률은 대략 25%와 5%이다⁴.

과체중과 비만은 생애주기 전반에 걸쳐 질병률과 사망률을 증가시키는 독립적인 위험요소이다. 예를 들어, 여성의 과체중과 비만은 임신 중 임신성 당뇨병과 출생 시 체중이 과다한 신생아의 예측인자가 될 수 있다. 높은 출생 시 체중은 성인기의 과체중 및 비만과 인슐린 저항성과 관련이 깊다⁵. 전 세계적으로 비만 유병률이 증가하는 것과 병행하여 소아의 과체중 및 비만도 증가하고 있다⁶. 소아 비만은 성인으로 이어지는 경우가 많기 때문에 소아 비만의 증가는 성인 비만 확산의 주요 원인이 된다⁷. 소아는 성인과 마찬가지로 과체중 및 비만과 관련하여 동일한 동반 질환을 유발한다⁸.

운동은 다양한 질병의 사망률을 낮추는 강력한 치료법이며, 특히 체중 감량에 크게 영향을 준다⁹. 그러나 비만이나 NAFLD 같은 지방대사 장애를 해결하기 위해 고안된 고강도 운동 프로그램에서 개인의 신체적 능력을 향상시키기 위해서는 전문적인 훈련이 요구되기에 현실적으로 시행하기에 어렵다. 따라서 체중을 감량하고 비만이나 NAFLD를 예방하기 위한 효과적인 운동 방법과 보조제 개발이 시급하다.

탄수화물은 간에서 지방으로 전환되어 저장되는데, 지속적인 지방 합성과 과도한 지방 축적은 지방대사 장애를 유발할 수 있다¹⁰. 지방 생성 과정에서 sterol regulatory element binding proteins-1 (SREBP-1)은 콜레스테롤의 합성과 지질대사를 조절하는 주요 전사인자이다¹¹. 또한 비만이나 NAFLD 같은 지방대사 장애 질환의 진행은 지방생성과 지질대사를 조절하는 peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ)에 의해 복잡하게 지배된다¹². 결과적으로 PPAR- γ 및 SREBP-1의 발현 수준을 평가하는 것은 지질 축적 조절을 모니터링하는 데 중요한 지표이다. 따라서 오늘날 비만이나 NAFLD 같은 지방대사 장애의 치료목표 중 하나는

PPAR- γ 및 SREBP-1의 발현 조절 및 억제이다.

방풍통성산은 <宣明方論>에 기재되어 있는 처방으로, 발한 (發汗), 해열 (解熱), 대변통변 (大便通便) 등의 효능이 있어 식적 (食積)으로 인한 비만에 사용된다¹³. 방풍통성산의 비만에 대한 연구로는 비만 환자에 대한 치료효과¹⁴, 고지방식이 흰쥐의 간 조직 내 지방축적의 억제 효과¹⁵ 및 NAFLD 유도 인슐린저항성 개선 효과¹⁶에 대한 보고가 있다.

한의학에서 간은 소설 (疏泄) 작용으로 몸의 기혈을 순환시키며, 이러한 기능이 떨어지면 습담 (濕痰)이 쌓여 비만이나 지방간 같은 지방 대사 장애를 유발한다고 인식하였다. 또한 간기 (肝氣)가 울체되면 간화 (肝火)가 생성되어 신음 (腎陰)이 마르게 되니 당뇨나 황달이 잘 생긴다고 하여 간과 신이 밀접한 관련이 있음을 제시한다¹⁷. 이러한 이론을 근거하여 간에 습담이 쌓이면 습열이 생겨 질병을 유발하므로 청열이습 (淸熱利濕)의 치료를 사용하게 된다. 따라서 습담을 개선하는 淸熱利濕法이 지방대사 장애를 완화시켜 비만을 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 방풍통성산이 고지방식으로 유발된 비만의 지방 축적을 억제하고 PPAR- γ 및 SREBP-1 조절에 대한 가능성을 확인하였기에 보고하는 바이다.

II. Materials and Methods

1. Materials

1) 실험 세포주

인간 간암 세포주 (Human hepatocellular carcinoma cell line, HepG2)는 한국세포주은행에서 구매하여 사용하였다. HepG2 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, St. Louis, MO, USA)과 항생제 (Penicillin-streptomycin)를 첨가한 Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 5% CO₂, 37 °C 환경에서 배양하였다.

2) 실험동물

자바이오 (JA-Bio, Seoul, Korea)에서 분양 받은 태령 3주 C57/BL6계 수컷 생쥐를 사용하였다. 결과를 평가할 때 발생할 수 있는 주관적 편향을 최소화하기 위해 2주 동안 적응시킨 후 체중 13 ± 1 g으로 선별하여 실험

험에 사용하였다. 실험군은 대조군 (Control, Ctrl), 고지방식이 섭취군 (high fat diet feeding group, HFDF), 고지방식이 섭취 후 방풍통성산 추출물 투여군 [Bangpungtongsungsan extract (BTS) treated group after high fat diet feeding, BTST]으로 나누었고, 각각 10마리씩 배정하였다. 실험기간 동안 과소 및 과다 체중 (평균 ± 10 g 이상)과 이상섭식행동을 관찰하여 해당 개체를 선정에서 제외하였다.

모든 군의 생쥐들은 23-25 °C, 55 ± 10% 습도, 12 hr 명암 주기에서 사육되었고, SAFE-40+RMM (SAFE, France) 및 filtered tap water를 제한없이 제공하였다. 또한 HFDF와 BTST는 실험기간 동안 (20주) high fat diet (fat, 60%; carbohydrate, 20%; protein, 20%; DIO DIET, USA)를 자유섭식 시켰다. 동물실험은 세명대학교 동물 실험윤리위원회의 승인 (IACUC No. smecae 20-10-02) 후 실시되었고, 기타 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 미국 국립보건원 (NIH) 가이드라인에 따라 시행되었다.

3) 실험약물

실험에 사용된 방풍통성산 (Bangpungtongsungsan)은 세명대학교 한방병원에서 제조된 것을 사용하였다 (Table. 1). 방풍통성산 4첩을 증류수 1500 ml에 넣고

Table 1. The amount and composition of Bangpungtongsungsan extract (BTS)

Herb name	Dosage (g)
滑石 <i>Talcum</i>	7
防風 <i>Peucedani radix</i>	2
甘草 <i>Glycyrrhizae radix rhizoma</i>	5
當歸 <i>Angelicae gigantis radix</i>	2
川芎 <i>Cnidii rhizoma</i>	2
赤芍藥 <i>Paeoniae Radix Rubra</i>	2
梔子 <i>Gardeniae fructus</i>	1.5
大黃 <i>Rhei rhizoma</i>	2
荊芥 <i>Schizonepetae spica</i>	1.5
白朮 <i>Atractylodis rhizoma alba</i>	1.5
石膏 <i>Gypsum fibrosum</i>	3
薄荷 <i>Menthae herba</i>	2
麻黃 <i>Ephedrae herba</i>	2
芒硝 <i>Natrii sulfas</i>	2
連翹 <i>Forsythiae fructus</i>	2
桔梗 <i>Platycodi radix</i>	3
黃芩 <i>Scutellariae radix</i>	3
生薑 <i>Zingiberis rhizoma crudus</i>	6
Total	49.5

3시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator (Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 50 ml로 감압, 농축한 후 동결건조기 (Labconco, Kansas, MO, USA)로 -75 °C에서 건조하여 추출물 42 g (수득률 23%)을 얻었다.

방풍통성산 추출물을 생리식염수에 희석하여 0.35 mg/kg의 양을 0.1 ml씩 BTST에 고지방식이 8주 섭식 후 12주 동안 경구투여 하였다.

2. Methods

1) 지질합성 분석

지질을 측정하기 위한 지방산은 palmitic acid (PA)를 사용하였다. Sodium hydroxide (NaOH) 0.01M에 PA 20 mM을 섞고, 70 °C에서 30분간 유지시켜 현탁액을 만든 다음, 10% fatty acid free bovine serum albumin (BSA) solution과 1:3 비율로 혼합하여 37 °C에서 접합시켰다. 이렇게 제작한 PA는 MEM (Sigma)을 이용하여 500 μM PA를 만들어서 사용하였다.

세포독성을 평가하기 위해 HepG2 세포에 방풍통성산 추출물을 각각 10, 100, 1000, 10000 μg/mL의 농도로 24시간 동안 처리한 후 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1)을 2시간 동안 처리하여 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 무처리군과 상대 정량하여 백분율로 환산하여 그래프화 하였으며, 결과는 세포독성수치와 세포가 50% 사멸되는 농도를 inhibitory concentration 50 (IC₅₀)으로 기록하였다.

PA로 유도된 지질의 축적 효능을 검증하기 위해 HepG2 세포 (1 x 10⁵ cells /well)를 tomodish (Shaefer, Milano, Italia)에 seeding 하였다. 이후 500 μM PA와 500 μM의 방풍통성산 추출물을 각각 24시간 동안 처리하였다. Tomocube HT-1S 현미경 (Tomocube, Seoul, Korea)을 이용하여 지질의 축적을 live cell에서 획득하였다. 세포의 3차원 굴절률 분포를 기반으로 Tomostudio software를 이용하여 지질 축적을 분석하였다.

2) 비만지표 분석

체중은 실험시작일, 고지방식이 8주차 (방풍통성산 추출물 투여 시작일), 고지방식이 20주차 (방풍통성산 추출물 투여 12주차)에 측정하였다.

체내 지방 분포는 Dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA)-Fat로 조사하였다. 5% isoflurane으로 수면 마

취상태에서 X-ray absorptiometry (Analyzer, Medikors, Seoul, Korea)로 측정하였다.

혈액 내 total cholesterol은 방풍통성산 투여 12주차에 채혈한 혈액을 혈청 분리 후 cholesterol E kit (BC 108-E, YD Diagnostics, Korea)를 사용하여 측정하였다. 혈당은 혈당계 (Freestyle, Therasence Inc, USA)를 사용하여 측정하였다.

3) 조직화학

간조직을 10% neutral buffered formalin에 실은 환경에서 24시간 동안 고정된 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 μm 두께로 연속절편을 만들었다. 간조직 내에서 지방화에 따른 형태변화를 조사하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 사용하여 조직학적 구조를 관찰하였다.

4) 면역조직화학

지질축적에 관여하는 peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ)와 sterol regulatory element binding proteins-1 (SREBP-1)의 면역조직학적 변화를 조사하기 위해 항 PPAR- γ 와 SREBP-1 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

우선 간조직 절편을 proteinase K 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Dako, Santa Clara, CA, USA)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 1% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 포함된 10% normal goat serum (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)에서 12시간 동안 blocking 반응을 시켰다. 1차 항체인 mouse anti-PPAR- γ (1:100, Abcam, Waltham, MA, USA)와 mouse anti-SREBP-1 (1:100, Abcam)에 4 $^{\circ}\text{C}$ humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG (1:50, Abcam)에 실온에서 24시간 link 하였고, avidin biotin complex kit (Vector Lab)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine 과 0.01% hydrochloric acid (HCl)이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

5) 영상분석

면역조직화학의 결과는 image Pro 10 (Media cybernetics, Rockville, MD, USA)을 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means \pm standard error) 되었다. 각 군의

간조직 표본 10개를 임의로 선정한 후 x 100 배율에서 촬영한 다음 positive pixels (intensity 80 ~ 100) /20,000,000 pixels로 영상분석하였다.

6) 통계

통계는 SPSS software (SPSS 25, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 ($p < 0.05$)을 검증하고, 사후 검증은 Tukey's honestly significant difference (HSD) test를 실시하였다.

III. Results

1. 지방 합성 저해

세포독성 IC_{50} 은 1206 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 무독성 농도는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 정의하였다 (Fig. 1A).

PA로 유도된 지질의 합성은 BTS 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 의해 지질의 축적이 $0.07 \pm 0.02 \mu\text{m}^3$ 로 유의성있는 지질의 합성 저해를 나타내었다 (Fig. 1B).

2. 체중 조절

20주 동안 고지방식이 섭취된 HFDF와 BTST는 정상식을 섭취한 Ctrl보다 모두 체중이 더 증가하였다. HFDF는 100%, BTST는 50% 증가하였다. 그러나 BTST의 체중 증가는 HFDF의 체중 증가에 비해 25% 유의성 있게 낮았다 (Table 2).

체내 지방비율은 Ctrl ($23 \pm 1.4\%$)에 비해 HFDF ($53 \pm 2.4\%$)는 130%, BTST ($36 \pm 3.2\%$)는 56% 증가하였다. 그러나 BTST는 HFDF에 비해 32% 유의성 있게 낮았다 (Fig. 2A).

혈액 내 total cholesterol은 Ctrl ($151 \pm 14 \text{ mg/dl}$)에 비해 HFDF ($388 \pm 24 \text{ mg/dl}$)는 157%, BTST ($248 \pm 37 \text{ mg/dl}$)는 64% 높았다. 그러나 BTST는 HFDF에 비해 36% 유의성 있게 낮았다 (Fig. 2B).

3. 간조직 내 지방 축적 억제

HFDF에서는 지방방울이 가득 찬 그물모양 (mesh-like type)의 세포질을 가진 간세포들과 큰 지방방울 덩어리가 세포질에 찬 간세포들이 간조직에서 다수 관찰되었다. BTST는 HFDF에 비해 적은 수의 지방축적 간세포가 관찰되었다 (Fig. 3).

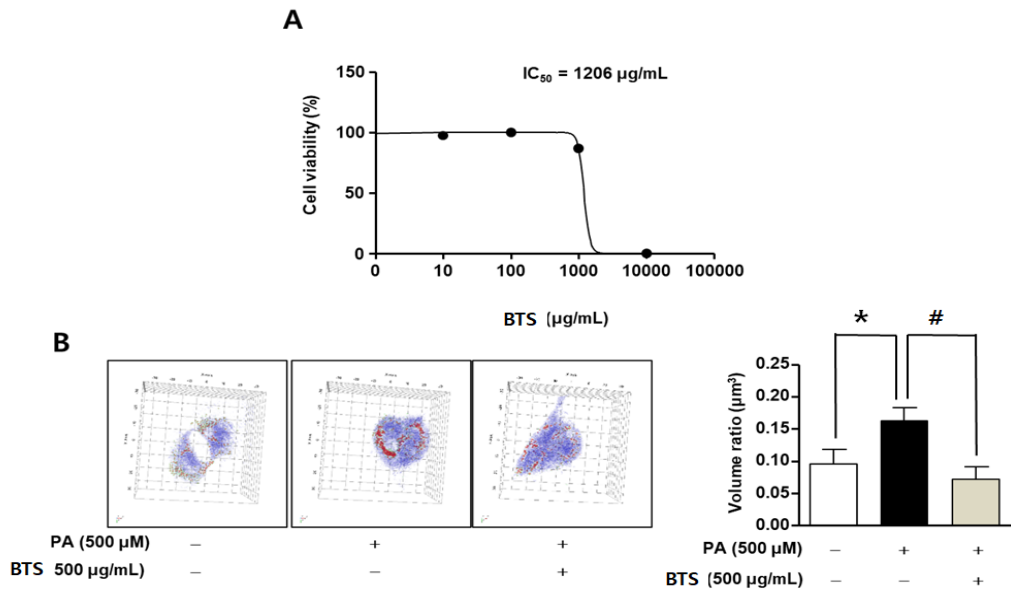


Figure 1. Effect of Bangpungtongsungsan extract (BTS) on palmitic acid (PA) induced lipid accumulation in HepG2 cell. (A) HepG2 cell were treated with BTS. Cell viability was measured by WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene Disulfonate) assay. (B) The lipids were observed using the HT-1S. The volume ratio was calculated by lipid volume /cell volume (um³). The data are expressed as mean percentages relative to the untreated group ± standard deviations. *, *p* < 0.05 vs. untreated group. #, *p* < 0.05 vs. PA group.

Table. 2. Effects of Bangpungtongsungsan extract (BTS) on body weight in high fat diet feeding mice

GROUP	Body Weight (g)		
	INI	8W	20W
Ctrl	13.6±0.7	27.8±0.92	35.5±1.51
HFDF	13.5±0.53	45.4±1.9*	74.1±2.89*
BTST	13.6±0.52	45.5±1.27*	53.3±2.26* #

Abbreviation : Ctrl, General diet feeding C57BL/6 mice; HFDF, High fat diet feeding C57BL/6 mice; BTST, High fat diet feeding C57BL/6 with Bangpungtongsungsan (0.35 mg/kg/day) extract for 12 week; INI, 5th week old mice; 8W, High fat diet feeding mice for 8 weeks; 20W, High fat diet feeding mice for 20 weeks; *, *p* < 0.05 compared with Ctrl; #, *p* < 0.05 compared with HFDF.

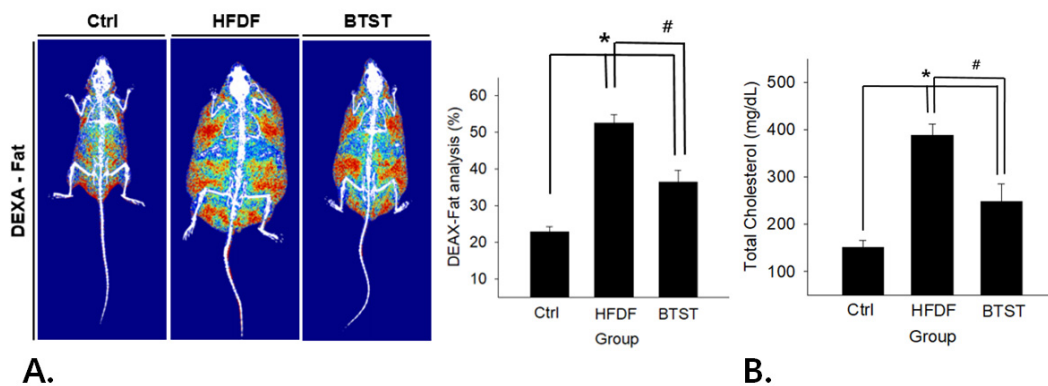


Figure 2. The mitigative effects of Bangpungtongsungsan extract (BTS) in fat distribution of high fat diet feeding mice. A. DEXA-fat. B. Total Cholesterol. Abbreviation : DEXA, Dual energy x-ray absorptiometry; Ctrl, General diet feeding C57BL/6 mice; HFDF, High fat diet feeding C57BL/6 mice; BTST, High fat diet feeding C57BL/6 with BTS (0.35 mg/kg/day) extract for 12 week. *, *p* < 0.05 compared with Ctrl; #, *p* < 0.05 compared with HFDF.

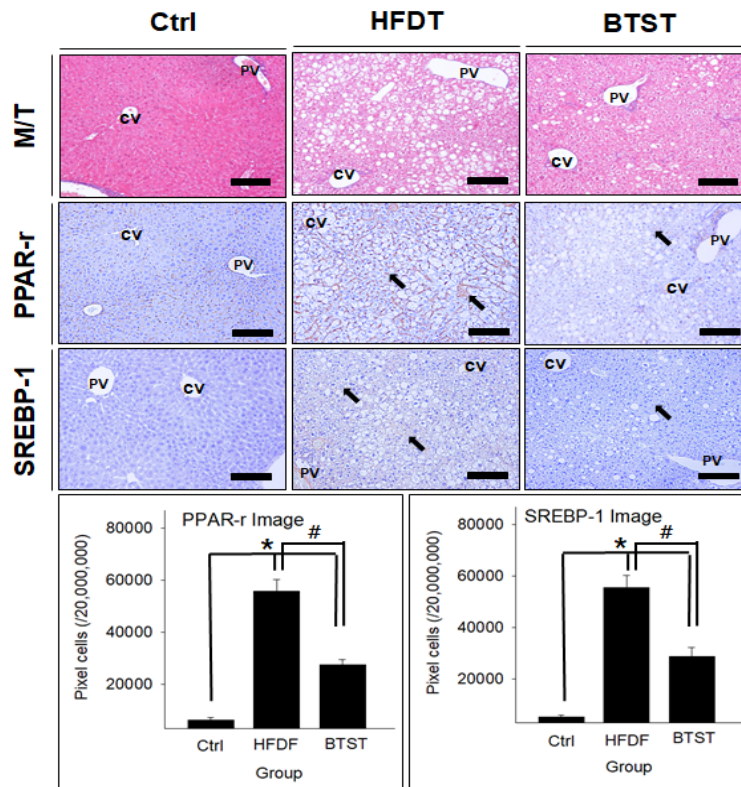


Figure 3. The mitigative effects of Bangpungtongsungsan extract (BTS) in lipid deposition of high fat diet feeding mice.

Abbreviation : M/T, Masson trichrome; PPAR- γ , Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; SREBP-1, Sterol regulatory element-binding transcription protein; CV, central vein; PV, portal vein; arrow, immunohistochemistry positive reaction; Bar size, 50 μ m; *, $p < 0.05$ compared with Ctrl ; #, $p < 0.05$ compared with HFDF. Other abbreviation same as Fig. 2.

PPAR- γ 양성반응은 지방축적 간세포의 핵과 핵막에서 강한 양성으로 관찰되었다. PPAR- γ 양성반응은 Ctrl (6,140 \pm 990)에 비해 HFDF (56,738 \pm 4,527)는 824%, BTST (27,494 \pm 2,027)는 348% 증가하였다. 그러나 HFDF에 비해 BTST의 PPAR- γ 양성반응은 52% 유의성 있게 낮았다 (Fig. 3).

SREBP-1 양성반응은 지방축적 간세포질에서 강한 양성으로 관찰되었다. SREBP-1 양성반응은 Ctrl (5,297 \pm 773)에 비해 HFDF (55,431 \pm 4,706)는 947%, BTST (28,812 \pm 3,364)는 444% 증가하였다. 그러나 HFDF에 비해 BTST의 SREBP-1 양성반응은 48% 유의성 있게 낮았다 (Fig. 3).

IV. Discussion

방풍통성산은 활석, 감초, 석고, 황금, 길경, 방풍, 천궁, 당귀, 적작약, 대황, 마황, 박하, 연교, 망초, 형개,

백출, 치자 생강으로 구성된 청열이습의 대표적 처방이다¹⁸⁾.

방풍통성산 구성 약물을 보면, 방풍, 형개, 박하, 마황은 땀을 나게 하여 상부의 사기(邪氣)를 발산시키고, 대황, 망초, 치자, 활석은 소변을 통해 하부의 사기를 배설시킨다. 또한 길경, 석고는 폐와 위의 열을 다스리고, 천궁, 당귀, 작약은 혈을 맑게 하여 간을 돕는다. 황금은 상중초(上中焦)의 화를 다스리고, 연교는 몸의 열독을 치료한다. 감초는 활석과 함께 소변을 통해 열을 배출한다. 백출은 건비(健脾)시키면서 동시에 온양(溫陽)한다. 이러한 방풍통성산의 최근 연구를 보면, 지방세포 대사에 미치는 영향¹⁹⁾과 고지방식이에서의 체지방구성과 항산화능에 미치는 영향²⁰⁾ 등의 연구가 보고되고 있다.

본 연구에서는 이러한 방풍통성산의 지방대사 조절을 통하여 지방 축적 억제 효과를 알아보고자 하였다.

본 연구에서는 먼저 방풍통성산 추출물이 *in vitro*에서 지방 생성을 조절하는지 조사하였다. PA 처리된

HepG2 세포의 지질 축적은 3차원 굴절률의 분포를 기반으로 3D 단층 촬영을 사용하여 측정되었다. 측정 결과 방풍통성산 추출물은 지질 합성 및 축적을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

체중변화에서는 20주 동안 고지방식을 먹인 HFDF와 BTST 모두 정상식을 섭취한 Ctrl보다 체중이 급격히 증가하였다. 그러나 BTST의 체중 증가는 HFDF의 체중 증가에 비해 유의성 있게 낮았다. 체내 지방비율 역시 Ctrl에 비해 HFDF는 130%, BTST는 56% 증가하였으나, BTST는 HFDF에 비해 32% 낮은 결과가 나왔다. 혈액 내 total cholesterol은 Ctrl에 비해 HFDF, BTST 모두 높았으나, BTST는 HFDF에 비해 36% 정도 유의성 있게 낮은 결과를 보였다. 이러한 결과들은 방풍통성산이 고지방식을 하는 비만한 사람의 급격한 체중 증가 및 체지방 증가를 억제할 수 있는 가능성을 보여준다.

이를 면역조직화학적으로 확인하고자 본 연구에서는 지방축적 간세포들을 관찰하였다. 간 조직에서 PPAR- γ 및 SREBP-1의 발현을 각각 조사하였으며, 이를 통해 방풍통성산은 고지방식이 생쥐의 간 조직에서 PPAR- γ 및 SREBP-1의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다.

HFDF와 BTST에서 지방방울이 가득 찬 그물모양(mesh-like type)의 세포질을 가진 간세포들과 큰 지방방울 덩어리가 세포질에 찬 간세포들이 간조직에서 관찰되었으나, BTST는 HFDF에 비해 훨씬 적은 수의 지방축적 간세포가 관찰되었다.

PPAR- γ 양성반응은 Ctrl에 비해 HFDF는 824%, BTST는 348%로 크게 증가하였으나, HFDF에 비해 BTST의 PPAR- γ 양성반응은 52% 낮았다. SREBP-1 양성반응 역시 HFDF와 BTST 모두 지방축적 간세포질에서 강한 양성으로 관찰되었으나, HFDF에 비해 BTST의 SREBP-1 양성반응은 48% 낮았다.

PPAR- γ 및 SREBP-1은 모두 cholesterol의 항상성과 지질대사를 조절하는 중요한 전사인자이다^{21,22}. 비만이나 NAFLD 같은 지방대사 장애가 있는 사람의 간에서 PPAR- γ 는 일반적으로 증가하는 것으로 나타난다²³. 지질 합성의 억제는 PPAR- γ 및 SREBP-1을 포함한 단백질 발현의 조절로 이어진다²⁴. 최근 연구에서는 전사 인자인 SREBP-1이 비만이나 죽상동맥경화증, NAFLD와 같은 질환에 관여한다고 보고하고 있다²⁵.

본 연구결과를 통해 방풍통성산은 지질대사에 중요한 인자인 PPAR- γ 및 SREBP-1의 발현을 하향 조절하

여 지질 축적을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 방풍통성산이 PPAR- γ 및 SREBP-1 발현을 감소시켜 비만이나 NAFLD 같은 지방대사 장애로 인한 지방축적을 억제시킬 수 있음을 의미한다. 따라서 방풍통성산은 지방 축적을 억제함으로써 비만이나 NAFLD 같은 지방 대사 장애를 충분히 개선시킬 수 있을 것으로 기대된다. 다만 본 연구는 3주된 어린 생쥐를 사용하여 실험하였기에 임상 현장에 적용하기 위해서는 추가적인 임상연구 및 안전성 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. Conclusion

방풍통성산이 고지방식이 유도 어린 비만 생쥐의 지방 축적에 미치는 영향을 확인하기 위해 본 연구는 태령 3주의 어린 수컷 생쥐에 고지방식을 섭취시킨 후 방풍통성산을 투여하여 생쥐의 체중 변화, 체내 지방비율, total cholesterol 변화, PPAR- γ 양성반응, SREBP-1 양성반응 변화를 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. BTST는 지질 합성을 유의성 있게 억제하였다.
2. BTST의 체중 증가는 HFDF의 체중 증가에 비해 25% 유의성 있게 낮았다.
3. 체내 지방비율 증가는 BTST가 HFDF에 비해 32% 유의성 있게 낮았다.
4. 혈액 내 total cholesterol은 BTST가 HFDF에 비해 36% 유의성 있게 낮았다.
5. PPAR- γ 양성반응은 BTST가 HFDF에 비해 52% 유의성 있게 낮았다.
6. SREBP-1 양성반응은 BTST가 HFDF에 비해 48% 유의성 있게 낮았다.

VI. Acknowledgement

이 연구는 2019년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. NRF2019 1A2C1002443).

VII. References

1. Ghosh S, Paul M, Mondal KK, Bhattacharjee S, Bhattacharjee P. Sedentary lifestyle with increased risk of obesity in urban adult academic professionals: an epidemiological study in West Bengal. *Sci Rep.* 2023; 13:4895.
2. Feneberg A, Malfertheiner P. Epidemic trends of obesity with impact on metabolism and digestive diseases. *Dig Dis.* 2012;30:143-7.
3. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia.* 2009;13:9-19.
4. Kasper P, Martin A, Lang S, Kütting F, Goeser T, Demir M, Steffen HM. NAFLD and cardiovascular diseases: a clinical review. *Clin Res Cardiol.* 2021;110: 921-37.
5. Curhan GC, Chertow GM, Willett WC, Spiegelman S, Colditz GA, Manson JE, Speizer FE, Stampfer MJ. Birth weight and adult hypertension and obesity in women. *Circulation.* 1996;94:1310-5.
6. World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii, 1-253.
7. Dietz WH, Gortmaker SL. Preventing obesity in children and adolescents. *Annu Rev Public Health.* 2001;22: 337-353.
8. Bendich A, Deckelbaum RJ. Primary and Secondary Preventive Nutrition. Totowa, N.J: Humana Press; c2001. Chapter 11, Can childhood obesity be prevented?; 185-204.
9. Windt DJ, Sud V, Zhang H, Tsung A, Huang H. The effects of physical exercise on fatty liver disease. *Gene Expr.* 2018;18(2):89-101.
10. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 2014;4(1):177-97.
11. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(8):5495-503.
12. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* 2013; 19(5):557-66.
13. Hong JY. Effects of Bangpungtongseungsan and Monacolin K. on body weight, food consumption, serum and expression of β 3AR in high fat mice. [Doctoral thesis]. [Iksan (Jeollabuk-do)]: Wonkwang University; 2009.
14. Choi EM, Ryu EK. Effects of Fangfengtongsheng-san on obese patients. *J Soc Korean Med Obes Res.* 2001; 1(1):57-62.
15. Ahn JM, Kim SS, Shin HD. Effects of Bangpoongtongsungsan on the weight and lipid metabolism of induced obesity rats. *J Kyung Hee Univ Med Cent.* 1993;9(1): 69-82.
16. Seo IB, Ahn SH, Kim KB. The Effect of Bangpungtongsungsan on insulin resistance induced by non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Pediatr Korean Med.* 2018;32(4):1-12.
17. Son CK. The research of immunological function in liver. *J Korean Orient Med.* 2001;22(1):3-9.
18. Hwang DY. *Bangyakhappyeon.* Seoul: Namsandang. 1987:122.
19. Lee SM, Kim BW, Kwon KR, Rhim TJ, Kim DH. The effect of Bangpungtongsung-san extracts on adipocyte metabolism. *J Pharmacopuncture.* 2008;11(1): 163-76.
20. Lee JC. Effects of Gamibangpungtongseungsan on lipid composition and antioxidant in rat fed high fat. *Kor J Herbology.* 2005;20(2):69-75.
21. Chen H, Tan H, Wan J, Zeng Y, Wang J, Wang H, Lu X. PPAR- γ signaling in nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and therapeutic targets. *Pharmacol Ther.* 2023;245:108391.
22. Aragno M, Tomasinelli CE, Vercellinato I, Catalano MG, Collino M, Fantozzi R, Danni O, Boccuzzi G. SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by western-type high-fat diet plus fructose in rats. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:1067-74.
23. Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c

- induction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:1424-30.
24. Lin Y, Ren N, Li S, Chen M, Pu P. Novel anti-obesity effect of scutellarein and potential underlying mechanism of actions. *Biomed Pharmacother.* 2019;117:109042.
25. Moslehi A, Hamidi-Zad Z. Role of SREBPs in liver diseases: a mini-review. *J Clin Transl Hepatol.* 2018;6(3):332-8.