흑측이 3T3-L1 세포와 비만 유도 흰 쥐에 미치는 영향

신만호¹, 이다은², 장혜연², 이영수²

¹동신대학교 대학원, ²동신대학교 광주한방병원 한방내과

Effects of Pharbitidis Semen on 3T3-L1 Cells and Obesity-induced Rats

Man-ho Shin¹, Da-eun Lee², Hye-yeon Jang², Young-su Lee²

¹Dong-Shin University Graduate School

²Dept. of Oriental Internal Medicine, Dong-Shin University Gwangju Oriental Hospital

ABSTRACT

Objectives: This study was designed to evaluate the efficacy of Pharbitidis Semen (PS) on obesity using 3T3-L1 cells and high-fat-diet rats.

Methods: After the administration of PS at a concentration of 0.125, 0.25, and 0.50 mg/ml in 3T3-L1 cells, the degree of differentiation of adipocytes was measured by Oil Red O staining. The experimental animals were divided into five groups in vivo. Normal group: diet-fed normal group (Normal), Control group (Control): high-fat-diet (HFD)-fed, Positive control group (PC): HFD+Contrave 200 mg/kg, PS_Low group: HFD+PS 250 mg/kg group, PS_High group: HFD+PS 500 mg/kg.

Results: The total cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol (LDL-cholesterol), and triglycerides (TG) content of the PS medication groups were significantly lower than those of the control group. In addition, high density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) tended to increase, and free fatty acid, total lipid, and phospholipid tended to decrease, but the decrease was not statistically significant. The administration of PS inhibited the differentiation of 3T3-L1 adipocytes, and a statistically significant difference was found in the group administered with 0.125 mg/ml. The mRNA expression of PPAR- γ and leptin, which are involved in the differentiation of adipocytes, was observed using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expressions of PPAR- γ and leptin significantly decreased in comparison with the control and the positive control.

Conclusions: PS can be applied clinically against obesity.

Key words: Pharbitidis Semen, 3T3-L1 cell, leptin, adiponectin, PPAR- γ

1. 서 론

비만은 에너지 섭취와 소비간의 불균형에 의해 섭취가 소비보다 증가함으로써 체내에 지방이 과

잉축적된 상태¹로 사회환경 및 유전이나 영양학적 인 측면 등 다양한 원인들이 관여하는 복합 증후군으로 알려져 있다².

2018년 '국가 비만관리 종합대책'에 따르면 비만으로 인한 사회경제적 손실은 최근 10년간 약 2배 증가되었고³, 우리나라 19세 이상 성인중 비만유병률은 지속적으로 증가하여 남자의 경우 2016년 처음으로 40%를 초과한 것으로 조사되었다⁴.

비만은 정상인에 비해 당뇨, 고혈압 등 질병발생 위험증가와 함께 각종 암을 유발하고, 사망위험을

· 투고일: 2019.04.29, 심사일: 2019.07.13, 게재확정일: 2019.07.13
· 교신저자: 이영수 광주광역시 남구 월산로 141
동신대학교 광주한방병원 한방내과
TEL: 062-350-7203 FAX: 062-350-7141
E-mail: hefari92@hanmail.net
· 이 논문은 2019년도 동신대학교 대학원 한의학 박사학위 논문임.

증가시키기 때문에 실질적 삶의 질 향상을 위해서는 건강수명 향상을 위한 적극적인 비만관리가 필요한 실정이다^{1,3,5}.

현대의학은 비만의 유발 원인에 따라 식생활관리, 신체활동량의 조절 및 2차적으로 발생된 각종 성인병을 관리하는 외에 유전적 요인과 지방세포의 분비이상을 개선하는 치료를 진행해 왔고^{5,6}, 한의학에서는 비만을 濕痰이나 濕熱, 氣滯血瘀로 인한 문제로 인식하여 防風通聖散⁷, 體減薏苡仁湯⁸ 등의 辨證類型에 따른 처방과 太陰調胃湯⁹, 調胃升清湯¹⁰ 등의 체질에 따른 처방 및 車前草¹¹, 赤小豆外皮¹², 桑葉¹³ 등의 本草를 활용한 연구가 진행되어 왔다.

흑측(Pharbitidis Semen)은 메꽃과(旋花科)에 속한 1년생 藤性草本인 나팔꽃의 성숙한 種子로 利水通便·祛痰逐飲 효능이 있어 瀉下와 利尿작용 및 평활근 흥분작용이 있는 것으로 알려져 있다¹⁴.

흑측에 대한 선행연구¹⁵⁻¹⁹로 지방흡수억제 및 항산화 활성 등의 생리활성과 항암효과 등이 확인되었으나, 비만에 대한 실험 연구는 현재까지 진행된 바가 없었다. 이에 저자는 흑측의 항비만효과를 실험적으로 알아보고자 고지방 사료의 식이로 비만을 유발한 흰 쥐를 대상으로 체중 및 혈액학적 변화, 지방 축적과 관련된 PPAR- γ , leptin 및 adiponectin의 발현을 관찰하였고, 3T3-L1 세포주를 이용하여 세포의 지방축적 정도를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용된 재료인 흑측(Pharbitidis Semen)은 D대학교 부속한방병원에서 공급받아 사용하였다.

2) 세포주

실험에 사용된 세포주는 생쥐(mouse)의 지방전

구세포인 3T3-L1을 한국세포주 은행에서 분양받아 사용하였다.

3) 동물 및 사육조건

생후 6주령 된 Sprague-Dawley계 수컷 흰 쥐를 샘타코(주)에서 공급 받아 고형사료(Dongaone Co., Korea)와 물을 충분히 공급하면서 1주일 동안 실험실 환경(온도 22 ± 2 °C, 습도 $40\pm 5\%$)에 적응시킨 후 실험에 사용하였다(D대학교 동물실험윤리위원회 승인번호: 2017-07-04).

2. 방 법

1) 시료 추출

흑측 900 g을 증류수 6,000 ml과 함께 100 °C에서 2시간 동안 전탕한 다음 추출액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하고, 이를 동결건조기(Ilshin, Korea)에서 동결건조한 결과 98.12 g의 분말을 획득하였으며 수득율은 10.9%였다.

2) 3T3-L1 세포주를 이용한 항비만 효과

(1) 3T3-L1 세포 배양

Mouse 배아에서 유래된 3T3-L1 지방전구세포는 한국세포주 은행에서 분양받아 사용하였으며 10% calf serum(invitrogen, USA), 1% Anti-biotic Anti-mycotic(Gibco, USA)을 포함한 DMEM media(Gibco, USA)를 사용하여, 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

(2) 세포주 분화유도

3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 유도는 6 well에 6×10^4 cells/well을 seeding 한 다음 100% confluent 되고 이를 후 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(Sigma, USA), 1 μ M dexamethasone(Sigma USA), 5 μ g/ml insulin(Sigma, USA)을 함유한 배지(MDI)로 지방세포로 유도하였으며 2일 후에 MDI 배지는 10% FBS와 5 μ g/mL insulin을 함유한 DMEM 배지로 각 실험 날짜까지 2일에 한번 교환하였다. 시료는 MDI배지 교환부터 이틀에 한번씩 배지 교환 시 함께 투여하여 분화시켰다.

약물 처리 농도의 근거를 설정하기 위하여 3T3-L1 세포에 농도별로(0, 0.0156, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml) 흑축 추출액과 EZ-cytox 10 μ l를 처리한 후 2시간과 3시간 후에 각각 450 nm 측정하여 세포 증식율을 관찰하였고, 최적의 농도로 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.50 mg/ml를 설정하였다.

(3) Oil red O 염색

분화가 완료된 3T3-L1 세포에 배양액 성분을 완전히 제거하기 위하여 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)로 2번 세척하고 10% formalin 용액 (sigma, USA)으로 고정한 다음 60% isopropanol (Yakuri, Japan)로 1회 세척하고 0.5%의 Oil Red O (Sigma, USA) 용액을 넣어 준 후 약 30분 동안 염색하였다. 염색이 완료되면 PBS로 3번 세정한 후 현미경으로 축적중인 지방을 관찰하였다. 촬영이 완료되면 100% isopropanol 0.2 mL을 넣어 oil red O 용액을 용출시키고, 용출시킨 용액을 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) TG 함량 측정

세포 내에 지방 축적을 통한 대사 과정 중 축적된 TG의 함량을 triglyceride kit(cayman, USA)을 통해 확인하였다. 분화가 완료된 지방세포의 배지를 제거 후 PBS로 씻어내어 다음 각 well의 cell을 모아 용해시킨 후 triglyceride kit를 이용하여 530 nm로 흡광도를 측정하였다.

3) 고지방 식이로 비만을 유도한 동물에서의 항비만 효과

(1) 비만 유발

비만 유발은 고지방사료인 60% High Fat Diet (Reserch-Diet, USA)를 8주간 실험동물에게 공급하여 비만을 유발하였다(Table 1).

(2) 실험군 분류

비만을 유발하지 않은 군을 Normal군, 비만을 유발하고 약물 처치를 하지 않은 군을 Control군, 비만을 유발하고 식욕억제제인 콘트라브(Contrave[®], 광동제약) 200 mg/kg를 투여한 군을 Positive control (PC)군, 비만을 유발하고 흑축 250 mg/kg를 투여

한 군을 PS_Low군, 비만을 유발하고 흑축 500 mg/kg를 투여한 군을 PS_High군으로 나누었다. 각 실험군의 개체 수는 Normal 군은 8마리, 그 외 실험군은 각각 9마리로 실험을 시행하였다.

(3) 약물 투여

약물투여는 고지방사료를 투여한 날부터 총 8주간 식염수에 타서 투여하여 음용하도록 하였고, 투여되는 양을 매일 일정한 시간에 점검하였다.

(4) 체중 측정

실험에 따른 체중 변화를 관찰하기 위하여 첫날부터 매주 1회 총 8주간에 걸쳐 총 9회 측정하였다. 체중 측정은 전자저울(HANA, KC-200, Korea)을 이용하였고 마지막 측정은 절식 후 흰 쥐를 희생시키기 직전 시행하였다.

(5) 식이 섭취량 측정

실험 개시 첫날부터 매주 3회씩 사료 섭취량을 재량하였다.

(6) 혈액 및 혈청학적 검사

실험동물을 희생 전 12시간을 절식시킨 후 마취한 다음 심장천자로 혈액을 채집하여 약 100 μ l를 EDTA-bottle에 넣은 후 Multispecies Hematology Analyser(Hemavet, USA)로 WBC, RBC, hemoglobin, platelet을 측정하였다. 나머지 혈액은 원심분리기 (Vision, Korea)에서 3,000 rpm으로 20분간 원심분리를 시행하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 임상검사 전문업체인 (재)씨젠의료재단에 total cholesterol, TG, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, total lipid, free fatty acid, phospholipid 항목 검사를 의뢰하였다.

(7) PCR을 활용한 PPAR- γ , Leptin, Adiponectin 측정

① Total RNA 분리

Total RNA 분리를 위해 흰 쥐의 간조직(50 mg)을 800 μ l TRIZOL reagent(Gibco-BRL, USA)로 homogenization하고 균질화된 용액에 500 μ l의 isopropanol(Sigma, USA)을 첨가하여 실온상태에서 5분간 방치한 후 RNA를 분리하기 위해 4 $^{\circ}$ C의 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 원심분리로

생긴 pellet에 냉장 보된 70% ethanol과 함께 DEPC-treated water(Biosolution, Korea)를 넣고 4 °C, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 pellet만 남기고 모두 제거하였다. 남은 ethanol은 실온에서 10분간 방치시켜 건조시킨 다음 DEPC-treated water에 녹여 Biophotometer(Eppendorf, Germany)에서 260 nm에서 OD 260 값을 읽어 RNA의 순도 농도를 정량했다. total RNA는 사용시 까지 -20 °C에서 보관하였다.

② RT-PCR에 의한 측정

분리된 total RNA 1 µg을 Mastercycler gradient

(Eppendorf, Germany)를 이용하여 50 µl cDNA를 합성하여 PCR 증폭을 위한 template로 사용하였다. Polymerase chain reaction은 cDNA, sense primer, antisense primer, DEPC-treated water를 PCR premix (Bioneer, Korea)에 넣었고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)에서 cDNA를 증폭하였다. 실험에 사용된 primer 종류와 sequences는 아래 표 (Table 1)와 같다.

이렇게 증폭된 RT-PCR 산물은 1.5% agarose gel을 통해 전기영동 후 Gel Imaging system(Davinch-K, Korea)에서 PCR product를 확인하였다.

Table 1. List of Primer Sequences Used for RT-PCR Analysis

Primer	Annealing temp (°C)	Sense	Antisense
PPAR-γ	58 °C	CTCCTGTTGACCCAGAGCAT	CAACCATTGGGTCAGCTCTT
Adiponectin	58 °C	GGAACCTTGTGCAGGTTGGAT	GCTTCTCCAGGCTCTCCTTT
Leptin	59 °C	CCTGTGGCTTTGGTCCTATCT	AGGCAGGCTGGTGAGGACCTG
GAPDH	55 °C	TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC	CAGCAACTGAGGGCCTCTC

3. 통계 처리

수집된 데이터는 평균±표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성을 검증하기 위하여 통계프로그램인 IBM SPSS Statistics 22를 사용하였다. 데이터의 평균 비교는 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 사용하였고, 사후검정은 Tukey 방식을 채택하였으며 p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 동질성 검정

시료를 투여하기 전 실험군으로 분류한 후 각 군간의 체중이 동질하다는 검증을 실시하여 체중에 있어서 동질한 집단임을 확인하였다(Table 2).

Table 2. Test of Homogeneity of Variances

Characteristics	Normal (n=8)	Control (n=9)	PC (n=9)	PS_Low (n=9)	PS_High (n=9)	F	p
Body weight (g)	Mean	193.67	194.89	193.78	193.44	193.89	
	SD	11.43	7.36	7.03	7.92	6.68	.041 .997

2. 체중 변화

실험기간 동안 총 9회 흰 쥐의 체중(g)을 측정 한 결과, Normal군(460.44)에 비해 다른 실험군의

체중이 증가하였고(PC=507.67, PS_Low=503.44, PS_High=501.00), PC군과 PS군에서 모두 Control군(535.67)에 비해 체중이 감소하였으나 통계적인

흑축이 3T3-L1 세포와 비만 유도 흰 쥐에 미치는 영향

유의성은 없었다(Fig. 1).

Fig. 1. Effects of Pharbitidis Semen on the changes of body weight in obese rats.

Body weight was measured 9 times, from the

start of Contrave and Pharbitidis Semen (PS) administration to sacrifice.

Normal : naive group, Control : High-fat diet and no treatment group, PC (Postive Cotrol) : High-fat diet and Contrave treatment group, PS_Low : High-fat diet and Pharbitidis Semen 250 mg/kg treatment group, PS_High : High-fat diet and Pharbitidis Semen 500 mg/kg treatment group. Values are represented as mean±SD of 8 or 9 experiments.

3. 사료섭취량의 변화

실험기간의 사료 섭취량을 1주 단위로 합산하여 분석한 결과, Control군과 다른 실험군들 사이에서는 유의할 만한 섭취량의 차이를 관찰할 수 없었다(Table 3).

Table 3. The Changes of High Fat Feed Intake

Group \ Weeks		1	2	3	4	5	6	7
Normal	Mean (g)	1585	1318	1409	1417	1425	1423	1785
	SD	7.77	38.42	12.74	22.05	30.12	15.04	147.81
Control	Mean (g)	1314	1063	1079	1134	1129	1138	1248
	SD	15.62	10.21	14.36	20.22	29.14	23.50	28.21
PC	Mean (g)	1293	1112	1112	1138	1122	1130	1264
	SD	3.61	17.01	11.02	16.86	10.54	17.56	49.33
PS_Low	Mean (g)	1281	1119	1125	1137	1201	1152	1261
	SD	33.81	37.24	10.54	4.36	46.93	9.85	7.51
PS_High	Mean (g)	1275	1275	1103	1130	1135	1145	1251
	SD	14.53	14.53	23.16	20.60	14.57	25.74	23.52

4. Total cholesterol, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, TG에 미치는 영향

흰 쥐의 total cholesterol 함량(mg/dl)을 측정 한 결과 PC군(62.3)과 PS_Low군(57.0), PS_High군(58.9) 모두 Control군(71.1)에 비해 감소하는 경향이 보였고, 특히 PS_Low군($p=0.012$)과 PS_High군($p=0.045$) 모두 Control군에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보였다(Fig. 2). HDL cholesterol 함량(mg/dl)을 측정 한 결과, Control군(17.6)에 비해 PC군(17.7)과 PS_Low군(17.9), PS_High군

(18.8) 모두 증가하는 경향을 보였지만 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 3). LDL-cholesterol 함량(mg/dl)을 측정 한 결과, PC군(7.1, $p=0.017$), PS_Low군(6.5, $p=0.001$)과 PS_High군(6.4, $p=0.001$)에서 Control군(9.0)에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보였다(Fig. 4). TG 함량(mg/dl)을 측정 한 결과, PC군(33.0, $p=0.002$), PS_Low군(34.4, $p=0.004$)과 PS_High군(27.8, $p=0.000$)에서 Control군(50.4)에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보였다(Fig. 5).

Fig. 2. Effects of PS on levels of total cholesterol level in obese rats.

Normal : naive group, Control : High-fat diet and no treatment group, PC (Postive Cotrol) : High-fat diet and Contrave treatment group, PS_Low : High-fat diet and Pharbitidis Semen 250 mg/kg treatment group, PS_High : High-fat diet and Pharbitidis Semen 500 mg/kg treatment group. Values are represented as mean±SD of 8 or 9 experiments. * : Statistically significance compared with Control group (* : $p < 0.05$).

Fig. 3. Effects of PS on levels of HDL-cholesterol level in obese rats.

Normal : naive group, Control : High-fat diet and no treatment group, PC (Postive Cotrol) : High-fat diet and Contrave treatment group, PS_Low : High-fat diet and Pharbitidis Semen 250 mg/kg treatment group, PS_High : High-fat diet and Pharbitidis Semen 500 mg/kg treatment group. Values are represented as mean±SD of 8 or 9 experiments.

Fig. 4. Effects of PS on levels of LDL-cholesterol level in obese rats.

Normal : naive group, Control : High-fat diet and no treatment group, PC (Postive Cotrol) : High-fat diet and Contrave treatment group, PS_Low : High-fat diet and Pharbitidis Semen 250 mg/kg treatment group, PS_High : High-fat diet and Pharbitidis Semen 500 mg/kg treatment group. Values are represented as mean±SD of 8 or 9 experiments. * : Statistically significance compared with Control group (* : $p < 0.05$). ** : Statistically significance compared with Control group (** : $p < 0.01$).

Fig. 5. Effects of PS on triglyceride levels of level in obese rats.

Normal : naive group, Control : High-fat diet and no treatment group, PC (Postive Cotrol) : High-fat diet and Contrave treatment group, PS_Low : High-fat diet and Pharbitidis Semen 250 mg/kg treatment group, PS_High : High-fat diet and Pharbitidis Semen 500 mg/kg treatment group. Values are represented as mean±SD of 8 or 9 experiments. ** : Statistically significance compared with Control group (** : $p < 0.01$).

5. Free fatty acid, Total lipid, Phospholipid에 미치는 영향

흰 쥐의 free fatty acid 함량($\mu\text{M}/\ell$)을 측정된 결과, Control군(902.6)에 비해 PC군(687.3)과 PS_Low군(735.8), PS_High군(736.3)에서 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 4). Total lipid 함량(mg/dl)을 측정된 결과, Control군

(244.3)에 비해 PS_Low군(218.3), PS_High군(228.3), PC군(221.6)에서 모두 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 4). Phospholipid 함량(mg/dl)을 측정된 결과, Control군(103.8)에 비해 PC군(93.1)과 PS_Low군(95.0), PS_High군(95.3)에서 모두 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 4).

Table 4. The Change of Free Fatty Acid, Total Lipid, Phospholipid Level in Obese Rats

Characteristics		Normal (n=8)	Control (n=9)	PC (n=9)	PS_Low (n=9)	PS_High (n=9)
Free fatty acid ($\mu\text{M}/\ell$)	Mean	1191.3	902.6	687.3	735.8	736.3
	SD	204.7	169.9	171.0	109.0	109.7
Total lipid (mg/dl)	Mean	296.7	244.3	221.6	218.3	228.3
	SD	76.9	22.7	21.9	21.5	14.5
Phospholipid (mg/dl)	Mean	104.7	103.8	93.1	95.0	95.3
	SD	12.1	10.7	13.5	14.7	6.6

Normal : naive group, Control : High-fat diet and no treatment group, PC (Postivie Cotrol) : High-fat diet and Contrave treatment group, PS_Low : High-fat diet and Pharbitidis Semen 250 mg/kg treatment group, PS_High : High-fat diet and Pharbitidis Semen 500 mg/kg treatment group. Values are represented as mean $\pm$ SD of 8 or 9 experiments.

6. 세포 내 지방축적에 미치는 영향

세포 내 지방축적 감소 효과를 확인하기 위하여 3T3-L1 세포와 Oil Red O 용액으로 염색하여 세포 내 지방 축적의 정도를 관찰한 결과, 0 mg/ml 투여군에 비해 모든 PS군에서 지방의 축적이 감소하였고, 특히 0.125 mg/ml에서는 통계적으로 유의성 있는 감소를 보였다(Table 5, Fig. 6).

또한, 지방 대사 과정에서 축적된 세포 내 TG 함량(mg/ml)을 측정하여, 0.0 mg/ml 투여군(66.2237)에 비해 모든 PS군(0.125 mg/ml=36.4868, 0.25 mg/ml=44.3158, 0.50 mg/ml=55.4342)에서 농도에 반비례하는 경향으로 TG 함량이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 7).

Table 5. The Effect of PS on Lipid Accumulation of 3T3-L1 Cells

	Before differentiation	0 mg/ml	0.125 mg/ml	0.25 mg/ml	0.50 mg/ml
Mean	100.00	181.46	153.50	158.36	162.61
SD	6.57	6.90	12.39 *	23.34	16.37

P.S. (+) : after differentiation, P.S. treated group, 0 mg/ml : P.S. 0 mg/ml treated group, 0.125 mg/ml : 0.125 mg/ml treated group, 0.25 mg/ml : 0.25 mg/ml treated group, 0.50 mg/ml : 0.50 mg/ml treated group. * : Statistically significance compared with Control group (* : $P(0.05)$).

Fig. 6. The effect of PS on lipid accumulation of 3T3-L1 cells by oil red O stain.

P.S. (+) : after differentiation, P.S. treated group. 0mg/ml : P.S. 0 mg/ml treated group, 0.125 mg/ml : 0.125 mg/ml treated group, 0.25 mg/ml : 0.25 mg/ml treated group, 0.50 mg/ml : 0.50 mg/ml treated group. * : Statistically significance compared with Control group (* : $P<0.05$).

Fig. 7. The effect of PS on triglyceride level of 3T3-L1 cells.

P.S. (+) : after differentiation, P.S. treated group. 0 mg/ml : P.S. 0mg/ml treated group, 0.125 mg/ml : 0.125 mg/ml treated group, 0.25 mg/ml : 0.25 mg/ml treated group, 0.50 mg/ml : 0.50 mg/ml treated group. Values are represented as mean $\pm$ SD of 4 experiments. * : Statistically significance compared with Control group (* : $P<0.05$). ** : Statistically significance compared with Control group (** : $P<0.01$).

: 0.25 mg/ml treated group, 0.50 mg/ml : 0.50 mg/ml treated group. Values are represented as mean $\pm$ SD of 4 experiments. * : Statistically significance compared with Control group (* : $P<0.05$). ** : Statistically significance compared with Control group (** : $P<0.01$).

7. PPAR- γ , Leptin, Adiponectin에 미치는 영향

지방세포 분화과정에서 발현되는 인자인 PPAR- γ , adiponectin, leptin의 발현에 미치는 영향을 PCR을 이용하여 관찰한 결과, Control군에 비해 PC군 및 PS군에서 PPAR- γ , leptin, adiponectin의 발현이 유의성 있게 감소하였다(Table 6).

Table 6. The Effect of PS on PPAR- γ , Leptin and Adiponectin Level

Characteristics		Normal	Control	PC	PS_Low	PS_High
PPAR- γ	Mean	44.46	56.88	53.59**	51.35***#	47.51***#
	SD	0.35	0.06	0.11	0.19	0.25
Leptin	Mean	81.00	98.43	97.32**	91.35***#	83.95***#
	SD	0.79	0.91	0.45	0.18	0.56
Adiponectin	Mean	58.58	45.64	47.87	45.94	49.11
	SD	1.37	1.92	1.62	0.91	1.15

** : Statistically significance compared with Control group (** : $p<0.01$).

: Statistically significance compared with PC group (# : $p<0.01$).

IV. 고 찰

비만은 만성질환으로서 식생활의 변화와 신체

활동량의 감소로 지속적으로 증가하고 있으며, 심리적으로나 사회적으로 개인을 위축시킬 뿐만 아니라 불안, 우울증 등을 나타내기도 하고, 비만 그

자체가 질병이 되어 간질환, 심장질환, 내분비질환, 관절질환 등이 동반될 위험이 정상인보다 약 2배 더 높게 나타나는 것으로 알려져 있다⁶.

2018년 '국가 비만관리 종합대책'에 의하면 비만으로 인한 사회경제적 손실은 2015년 기준 9.2조원으로 최근 10년간 약 2배('06년 4.8조→'15년 9.2조) 증가되었고, 당뇨, 고혈압 등 질병발생 위험증가와 함께 각종 암을 유발하고 사망위험을 증가시키기 때문에 실질적 삶의 질 향상을 위해서 적극적인 비만관리가 필요하다고 보고되었다³. 또한, 2016년 국민건강영양조사에 의하면 우리나라 19세 이상 성인중 비만유병률(체질량지수 25 kg/m^2 이상인 분율)은 남자가 42.3%, 여자는 26.4%로 1998년 이후 비만인구가 계속적인 증가 추세를 나타내고 있다는 것을 알 수 있다⁴.

현재 비만의 치료대상이 되는 BMI 30이상이거나 위험인자를 지니고 있는 BMI 27이상인 경우에 사용하는 약물은 크게 두 그룹으로 나뉜다. 첫째, 지방축적을 억제하는 식욕억제제와 음식의 흡수나 지방산 생성을 억제하는 제제, 둘째, 지방이용을 자극하는 열생성 혹은 지방분해제이다. 현재 효과와 안정성에서 인정받은 약물은 지방흡수를 억제하는 올리스타트(Orlistat, Xenical[®]), 식욕을 억제하고 발열반응을 일으키는 시부트라민(Sibutramine, Reductil[®]) 등이 있지만, 지방변, 복부불편감, 가스배출 및 교감신경계의 항진을 일으키는 부작용이 있는 것으로 알려져 있다²⁰. 특히 본 논문에서 양성 대조군으로 설정한 콘트라브정(Contrave[®], 광동제약)은 도파민 재흡수 억제제와 오피오이드 수용체 길항제가 혼합된 식욕억제제로 알려져 있다²¹.

그 외 비만치료 약물에 대한 연구는 지방조직에서 분비되는 adipokine을 이용한 중재 연구 뿐만 아니라 장내세균을 이용한 비만치료도 시도되고 있다^{22,23}.

또한, 유전적 요인이 비만의 결정에 4-70%를 차지한다는 보고²⁴에 따라 한의학계에서도 지방세포 분해에 관여하는 비만과 관련된 유전자중 단일 염

기 다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)을 유발하는 UCP, PPAR 등의 단백질 연구를 통해서 한약제의 비만 치료 기전을 밝히려는 시도가 이루어지고 있다²⁵. PPAR(Peroxisome Proliferator Activated Receptor)는 핵 수용체에 속하는 단백질로서 DNA에서 mRNA로의 유전자 정보 전달을 조절하는 역할을 한다. 특히 PPAR- γ 는 지방조직 생성과 당대사에 주된 역할을 하는데, 지방전구세포에서 지방세포로의 분화에 있어 가장 핵심적인 기능을 담당하여 지방조직에서 지방산의 저장을 촉진시키는 것으로 보고되었다^{26,27}.

지방조직은 단순한 에너지 저장소 역할 외에 내분비 기능, 식욕, 인슐린 감수성과 염증 및 면역 등 까지도 조절하는 활성화된 분비 기관임이 밝혀졌고, 비만은 cholesterol의 형태학적 변화까지 일으켜 정도의 만성 염증상태를 유발할 수 있다고 하였다²⁸. 특히 adipokine(adipocytokine)은 지방세포에서 생성, 분비되어 다양한 신호 전달에 관여하는 단백질들의 총칭으로, leptin²⁹, adiponectin³⁰, TNF- α ³¹ 등이 있고, 이러한 adipokine의 분비이상을 개선함으로써 항비만 효과를 기대할 수 있는 연구들이 진행되고 있다.

최근 한의학에서는 비만을脾胃虛로 인한氣虛와濕痰 및濕熱,七情傷과肝의疏泄失調로 인한氣滯血瘀,先天稟賦不足으로 인한腎陽虛 등으로 보고辨證類型에 따라補裨益氣,祛痰行濕,清熱瀉火解毒,疏肝理氣,溫腎健脾하는 치료법^{7,9}과 체질에 따른 처방^{9,10} 및 이뇨효과, 식욕억제 및 에너지소비를 증가시키는 약제들^{11-13,32}이 사용되고 있다.

흑축(Pharbitidis Semen)은 메꽃과(旋花科 Convolvulaceae)에 속한 1년생 藤性草本인 나팔꽃(*Pharbitis nil* (L.) Choisy) 또는 둥근잎나팔꽃(*Pharbitis purpurea* (L.) Voigt)의 성숙한 種子로 苦辛, 寒, 有毒하며 利水通便, 消痰逐飲, 攻積殺蟲 효능이 있어 水腫脹滿, 二便不通, 痰飲積聚, 蟲積腹痛 등에 瀉下와 이뇨작용, 평활근 흥분작용 및 驅蟲작용이 있는 것으로 알려져 있다¹⁴.

최근 흑축에 대한 생리활성연구에 따르면 lipase의 활성을 저해하여 TG 및 cholesterol의 흡수의 감소, 암세포의 증식 저해활성 및 항산화 효소를 활성화시키는 것으로 보고되었다¹⁵⁻¹⁹.

본 실험에서 고지방 식이와 흑축의 투여가 흰 쥐의 체중에 어떠한 영향을 끼치는지 관찰하기 위하여 실험기간 동안 총 9회 흰 쥐의 체중을 측정하고 결과 Normal 군에 비해 다른 실험군의 체중이 증가한 경향을 보였으며, PC군과 PS군에서 모두 Control군에 비해 체중이 감소하는 경향이 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 1).

흑축 투여 후 흰 쥐의 total cholesterol 함량을 측정한 결과, PC군과 PS군에서 모두 Control군에 비해 감소하는 경향이 보였고, 특히 PS_Low군과 PS_High군에서 모두 통계적으로 유의한 감소를 보였다(Fig. 2). HDL-Cholesterol은 Control군에 비해서 PC군과 PS군 모두 증가하는 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았으며(Fig. 3), LDL-cholesterol은 PC군과 PS군에서 모두 Control군에 비해 유의한 감소를 보였으나 PC군과 PS군 사이에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 4). 콜레스테롤은 세포막의 주요 구성성분이지만 증가되는 경우 동맥경화나 순환기 질환의 대표적 원인으로 손꼽히고 있으며³³ 특히, LDL-cholesterol은 동맥경화의 위험인자로 수치가 낮을수록 양호하며, HDL은 동맥경화 방지와 관련되는 콜레스테롤로써 수치가 높을수록 양호한 인자로 인지되고 있어³² 실험 결과 흑축 투여를 통해 total cholesterol 및 LDL은 감소하였고, HDL은 증가하는 경향을 보여 항비만 및 고지질혈증의 치료에 일정 부분 효과가 있음을 관찰할 수 있었다.

콜레스테롤과 마찬가지로 동맥경화성 질환의 대표적 위험 인자인 TG함량을 관찰한 결과 PC군과 PS군에서 모두 Control군에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보였으나 PC군과 PS군 사이에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 5).

비만 연구에서 사용되는 대표적인 혈청 인자³⁴인

free fatty acid, total lipid와 phospholipid 변화를 관찰한 결과 Control군에 비해 PS군에서 모두 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 4).

흑축 투여에 따른 세포 내 지방축적 감소 효과를 확인하기 위하여 2가지 방법을 사용하였다. 지방전구세포인 3T3-L1 세포에 Oil Red O 용액으로 염색하여 관찰하였고, 다른 한편으로는 세포 내에 지방 대사 과정 중 축적된 TG 함량을 triglyceride kit를 이용하여 측정하였다. 3T3-L1 세포는 생쥐의 섬유아세포로부터 유래된 세포주로, in vitro 상에서 지방세포로 분화되는 특징 때문에 지방세포 축적과 관련된 연구에 많이 사용되는데³⁶, Oil Red O 염색에서는 흑축을 처리하지 않은 군(0.0 mg/ml)에 비해 각각 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.50 mg/ml의 흑축을 투여한 3개 군 모두 감소하는 경향을 보였으며, 그 중 0.125 mg/ml 농도 투여군에서 통계적인 유의성을 보였다(Table 5, Fig. 6). Triglyceride kit를 활용한 관찰에서는 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.50 mg/ml 투여군 모두에서 유의한 차이가 보였으며, 특히 저용량인 0.125 mg/ml와 0.25 mg/ml에서 0.50 mg/ml 보다 유의한 감소가 관찰되었다(Fig. 7). 고농도 보다 저농도에서 효과가 더 좋은 결과에 대해서는 항비만에 대한 적절한 농도를 산정할 수 있을 근거가 될 수도 있겠지만 향후 다른 측정 지표의 결과들과 종합하여 그 기전을 연구해야 할 것으로 사료된다.

흑축 투여후 지방세포 분화과정에서 관여하는 인자인 PPAR- γ , adiponectin, Leptin의 mRNA 발현을 RT-PCR을 이용하여 관찰한 결과, PPAR- γ 함량이 Control군에 비해 PC군 및 PS군에서 유의성 있게 감소되었음을 관찰할 수 있었고, Leptin의 발현에 있어서도 Control군에 비해 PC군과 PS군에서 유의성 있는 감소가 관찰되었을 뿐 아니라 PS군이 PC군에 비해서도 유의성 있게 감소하였음을 관찰할 수 있었으며, adiponectin에서는 Control군에 비해 PC군과 PS군이 증가하는 경향이 보였

으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 6). 지방세포분화의 핵심적인 기능을 담당하는 PPAR- γ 는 잉여 에너지원으로부터 TG 합성을 촉진하여 지방과 간 조직에 저장하여 지방생성 및 비만 예방과 관련되는데^{27,37}, 본 연구 결과 유의한 감소를 나타내었으며 이는 본 실험결과에서 나타난 3T3-L1 분화 억제에 향상된 결과와도 연관있다고 볼 수 있다. Leptin은 뇌의 시상하부 수용체와 연계되어 식욕을 조절하고 식이섭취를 감소시키는 역할을 하며, 에너지가 과잉 축적되면 지방세포에서 분비되므로 비만한 경우 대부분 leptin 농도가 증가되어 있다³⁸. 본 연구에서 혈중 Leptin의 함량을 분석한 결과 PS군이 Control군과 PC군에 비해 모두 혈청 Leptin 농도가 감소한 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 연구를 통해 흑축은 혈청 분석 결과 Total-cholesterol과 TG 수치를 낮추며, Leptin 값을 낮추고 PPAR- γ 수치를 높이는 등 비만 관련 단백질 조절 능력이 있음을 확인하였다. 특히, PPAR- γ 와 Leptin에서는 PC군보다 유의한 차이를 보여 비만 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 비록, 동물 실험을 진행하면서 표본수가 적었고, 이에 따라 표준편차가 다소 커서 통계적 유의성은 나타나지 않았으나 비만과 관련된 여러 지표에서 항비만 효과의 경향성을 관찰할 수 있었다. 이번 연구는 본 연구자가 임상에서 항비만 약재로 활용하고 있었던 흑축의 항비만효과를 실험적으로 규명하고자 한 연구였으며, 특히, PPAR- γ , leptin, adiponectin에 대한 영향을 PCR을 이용한 점이 기존 연구와의 차이점이라 할 수 있다.

이상의 결과로 흑축이 항비만효과가 있음을 알 수 있었으며, 본 연구를 기반으로 흑축의 항비만 기전 연구 등의 추가적인 연구를 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

흑축의 항비만 효과를 알아보기 위해 3T3-L1

세포와 고지방식으로 비만이 유발된 흰 쥐를 이용한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 흑축 투여군이 대조군에 비해 체중변화는 통계적인 유의성은 없었으나 감소하는 경향을 보였다.
2. 흑축 투여군은 대조군에 비해 total cholesterol, LDL-cholesterol, TG 함량을 유의성 있게 감소시켰다. 그 외 통계적인 유의성은 없었으나 HDL-Cholesterol은 증가하는 경향, free fatty acid, total lipid, phospholipid은 모두 감소하는 경향을 보였다.
3. 흑축 투여군은 3T3-L1 지방세포분화를 억제하였고, 그 중 0.125 mg/ml 농도 투여군에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다.
4. 흑축 투여군은 PPAR- γ , Leptin의 발현이 대조군과 양성대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다.

흑축의 항비만효과를 관찰한 결과 고지방식으로 유도된 흰 쥐의 혈청 비만지표와 비만관련 인자의 mRNA 발현을 감소시키는 데 유효했고, 지방세포 분화를 감소시키는 것으로 나타나 이를 통해 흑축이 비만에 있어 임상적으로 활용될 가능성이 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2009;9(1):88.
2. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korea rehabilitation medicine. 4th ed. Seoul: Koonja; 2015, p. 295-319.
3. Available at: <https://www.gov.kr/portal/ntnadmNews/1560947>. Accessed February 02, 2019.
4. Available at: <https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/>

- sub01/sub01__05.do. Accessed February 03, 2019.
5. Kasper DL, Fauci AS, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. Harrison's principles of internal medicine 17th edition. Seoul: MIP; 2010, p. 559-70, 1825-30, 2905-21.
6. Committee of Clinical Practice Guideline of the Korean Socceity For The Study Of Obesity (KSSO). *Obesity Treatment Guideline* 2018.
7. Park SA, Bang KS, Chang YN, Lee JH, Jin JS. A review on pharmacological properties of Bangpungtongsung-san in obesity-Focused on Japanese researches. *Herbal Formula Science(HFS)* 2014;22(2):25-34.
8. Choi WH, Seo BI. The Effects Of Chekamuiyiin-tang On Biochemical And Histological Changes Of Rats Fed High Diet. *Journal of Korean Oriental Medicine* 2000;21(3):31-9.
9. Kim HJ, Ahn HS, Oh EH, Kim YL. Effect of Taeumjoweeatang on the Body Composition, Serum Lipid Level and Antioxidant Enzyme Activity of Obese Female College Students. *Journal of Sasang Constitutional Medicine* 2011;23(3):391-401.
10. Lee MJ, Yang GE, Lee JS, Noh HI, Yoon DR, An SM, et al. Effects of Choweseuncheng-tang on Obesity and Hyperlipidemia in High-fat-diet-induced Obese Mice. *Journal of Korean Oriental Medicine* 2011;32(4):37-47.
11. Kim SY, Jeong MJ, Kim YJ, Lee UT, Choo ST, Kim HH, et al. Effect of Plantaginis asiaticae Folium water extract on body fat loss in high fat-induced obese C57BL/6 mice. *Korea Journal of Herbology* 2018;33(2):59-67.
12. Kwak JY, Park JH, Koh YM, Park JM, Ahn TW. The Effect of Phaseolus Angularis Shell on Soyang-in Metabolic Syndrome with Obesity. *Journal of Sasang Constitutional Medicine* 2017;29(2):136-53.
13. Ma YH, Kim HJ, Han YH. The Effects of Mori folium on Insulin Resistance and Adipose Tissue Inflammation in an Experimental Mouse Model of Obesity. *J Int Korean Med* 2016;37(4):609-23.
14. Co-textbook Compilation Committee of Nationwide College of Korean Medicine. Bonchohak. Seoul: Yeonglimsa; 2004, p. 218-20, 285-7, 297-9, 360-1.
15. Kim AK, Cha EJ. Effect of Pharbitidis seed extract on the antioxidant enzyme activity in B16F10 murine melanoma cells by oxidative Stress. *Yakhak Hoeji* 2007;48(1):93-8.
16. Kim KH, Choi SU, Son MW, Lee KR. Two new phenolic amides from the seeds of Pharbitis nil. *Chem Pharm Bull* 2010;58(11):1532-5.
17. Ko SG, Jun CY, Park CH, Bae HS. Anti-cancer effects and apoptosis by Korean medicinal herbs. *Journal of physiology & pathology in Korean Medicine* 2003;17(3):819-25.
18. Ko SG, Koh SH, Jun CY, Nam CG, Bae HS, Shin MK. Induction of apoptosis by Saussurea lappa and Pharbitis nil on AGS gastric cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2004;27(10):1604-10.
19. Choi HD, Yu SN, Park SG, Kim YW, Nam HW, An HH, et al. Biological Activities of Pharbitis nil and Partial Purification of Anticancer Agent from Its Extract. *Journal of Life Science* 2017;27(2):225-32.
20. Korean society for the study of obesity. Clinical bariatrics. Seoul: Korea Medical Book Publishing Company; 2001, p. 19-20, 27-9, 31-56, 75-84, 241, 303-11.
21. Available at: <https://contravehcp.com/how-contrave-works/>. Accessed February 07, 2019.
22. Kim BS, Song MY, Kim HJ. The anti-obesity effect of Ephedra sinica through modulation of

- gut microbiota in obese Korean women. *Journal of Ethnopharmacology* 2014;152(3):532-9.
23. Yu Y, Deng C, Huang XF. Obese reversal by a chronic energy restricted diet leaves an increased Arc NPY/AgRP, but no alteration in POMC/CART, mRNA expression in diet-induced obese rat. *Behavioural Brain Research* 2009; 205(1):50-6.
24. Koeppen-Schomerus G, Wardle J, Plomin R. A genetic analysis of weight and overweight in 4-year-old twin pairs. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25(6):838-44.
25. Lee BJ, Ryu JH, Kim JW, Park JH, Park JW. The Anti-obesity Effects of Gambi-hwan Extract on Obese Rats Induced by High-fat Diet through the Expression of UCP-1 and PPAR- δ . *Kor J Orient Med* 2007;28(4):136-4.
26. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391(6662):82-6.
27. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular cell* 1999;4(4):611-7.
28. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007;132(6):2169-80.
29. Javor ED, Cochran EK, Musso C, Young JR, Depaoli AM, Gorden P. Long-term efficacy of leptin replacement in patients with generalized lipodystrophy. *Diabetes* 2005;54(7):1994-2002.
30. Kim DM, Kim BW, Kim YG, Kim IJ, Kim TH, Park JY, et al. Adiponectin & Vascular disease. *Biowave* 2006;8(11):1-8.
31. Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem* 2008; 114(3):183-94.
32. Lee JM, Seo BI, Park JH, Roh SS. Effects of water extracts from *Phyllostachys Folium* on hyperlipidemia and liver damage induced by alcohol. *Kor J Herbology* 2011;26(3):31-6.
33. Preuss HG, Garis RI, Bramble JD, Bagchi D, Bagchi M, Rao CVS, et al. Efficacy of a novel calcium/potassium salt of (-)-hydroxycitric acid in weight control. *International Journal of Clinical Pharmacology Research* 2005;25(3):133-44.
34. Kim KY, Kim HW, Lee SY, Hwang GS, Choi CH, Yoon GJ, et al. Effects of Herbal Remedy Using Onion (HRO-1) in Body Weight and Serum Level on Obesity in Rats. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 2009;23(3):562-6.
35. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000;14(11):1293-307.
36. Kang SA, Jang KH, Park SK, Lim JP, Jeon H, Cui X, et al. Effect of Herbal Composition on Obese Rats Fed High Fat Diet. *Kor J Herbology* 2003;18(4):59-64.
37. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, et al. 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. *Molecular and cellular biology* 1999;19(8):5495-503.
38. Committee of Clinical Practice Guideline of the Korean Society of Lipid and Atherosclerosis (KSoLA). Korean Guidelines for the Management of Dyslipidemia 4th ed. Seoul: Academy; 2018, p. 31-45, 115-47.