

防己의 투여가 비만 유발 쥐의 생리기능과 DNA Chip을 통한 유전자 발현에 미치는 영향에 대한 연구

동국대학교 한의과대학 부인과학교실

조호근, 김동일

ABSTRACT

Effects of *Sinomenium acutum* Extract on Body Weight Gains and the DNA Chip Expression of Obese Rats.

Ho-Geun Joh, Dong-Il Kim

Dept. of Ob&Gy, College of oriental Medicine, Dongguk University

Purpose: This study is to examine anti-obesity effect and cytotoxicity of the long-term oral administration of *Sinomenium acutum* (Bang-gi, SA)

Methods: Using diet-induced obesity C57BL/6 mouse model, anti-obesity effect and DNA chip expression and cytotoxicity of the long-term oral administration of this herbal extract were investigated.

Results: The herbal extract treated groups were arrested in weight increment only when they were lodged together. Such effects were abolished when they kept individually. SA fed mice behaved very rudely and violently. On the basis of histological studies of liver tissues and also in vitro cytotoxicity tests of the liver and kidney cell lines, no significant toxicity was found by 14 weeks of SA treatments. However, we found significant changes in gene expression profile in SA treated group by micro-array analysis. In case of SA group, up-regulated genes were 1,213 and down-regulated ones were 2,558. Some of lipid metabolism related genes also significantly changed in both treatment groups.

Conclusion: SA had effects of increasing the basal metabolic rate by stimulating the sympathetic nervous systems.

Key Words: *Sinomenium acutum*, gene expression, microarray, obese.

I. 서론

비만은 체내에서 요구되는 에너지의 양보다 많은 에너지를 섭취하고 남은 에너지가 지방으로 바뀌어 체내에 축적되어 발생하는 일종의 병리현상으로 체내의 지방조직이 과다하게 증가된 상태를 말한다. 이는 심리적으로나 사회적으로 개인을 위축시킬 뿐만 아니라, 불안, 우울증 등을 나타내기도 한다. 비만 그 자체도 질병이 되지만 고콜레스테롤혈증, 지방간, 비정상 간기능 소견, 협심증, 심근경색증, 동맥경화증, 죽상경화증, 관상동맥 심질환, 뇌졸중, 고혈압, 당뇨병, 고인슐린혈증, 성장호르몬 분비 저하, Pickwick 증후군, 통풍 등 성인병의 위험을 증가시키는 요인으로 지적되고 있다. 그 외에도 비만의 기계적 및 신체적 스트레스는 여러 질병의 원인이 되거나 악화시키는 요인이 되는데, 골관절염, 요통, 혈전증, 열공탈장, 담석증 등이 그러한 예가 된다. 더욱이 비만증 환자의 사망률은 정상인보다 훨씬 높은 것으로 알려져 있다¹⁻³⁾.

생활수준의 향상과 함께 식생활이 변화되면서 점차 비만 환자가 증가하는 추세에 있으며, 비만에 대한 인식도 변화하고 있다. 1997년 세계보건기구의 보고에 따르면 약 12억의 인구가 과체중에 해당하며 미국은 2000년에 이미 성인 인구의 64.5%가 과체중이라고 한다⁴⁾. 우리나라도 소득 수준의 향상 및 식생활 습관의 서구화 경향으로 비만인구가 급증하여 2005년 국민건강 영양조사에 따르면 20세 이상 성인 중 자신이 비만이거나 약간비만 이라고 생각하고 있는 경우가 2001년의 30.6%에서 2005년 34.9% (남자 30.4%, 여자 39.4%)로 증가하였으

며, 체중감소를 위해 노력하는 경우 역시 2001년 24.3%에서 2005년 33.2%로 증가하였다. 그러나 비만에 대한 인식이 높아지고 비만해소에 대한 노력이 늘어났음에도 불구하고 성인의 31.8%가 비만, 4.7%가 저체중, 63.5%가 정상이었으며, 성인 남자의 35.2%, 성인 여자의 28.3%가 비만이었다⁵⁾.

한의학에서는 비만을 肥, 肥人, 肥貴人, 肌膚盛, 肥胖⁶⁻⁸⁾이라고 표현하고 있으며, 비만의 원인에 대해서는 《素問奇病論》⁶⁾에서 “此肥美之所發也 此人必數食甘美而多肥也 肥者令人內熱 甘者令人中滿”이라고 하였으며, 《靈樞逆順肥瘦篇》⁷⁾에서는 “年質壯大 血氣充盈 膚革堅固 人加以邪刺此者 深而留之 此肥人也”라고 하였고, 《衛氣失常篇》⁷⁾에서 “臃肉堅 皮滿者 肥”라고 하여 이미 한의학의 성립 시기부터 비만의 원인, 증상 등에 관한 언급이 있었다.

비만치료에 사용되는 한약은 그 부작용이 양약보다 적은 것으로 인식되어 복합제나 단일제를 활용한 비만치료의 연구가 활발히 진행되고 있다⁸⁻¹³⁾. 따라서 한약에 대한 효능과 안전성에 대해서도 객관적인 기초 연구와 임상연구가 진행될 필요성이 널리 제기되고 있다.

防己(*Sinomenium acutum* Rehder.)는 防己科 (새모래덩굴과)에 속하는 덩굴이 덩굴과 漢防己 및 同屬 近緣植物의 건조된 根莖으로 利水消腫, 祛風止痛의 효능이 있어 水腫脚氣, 小便不利, 濕疹瘡毒, 風濕痺痛의 증상을 개선시키고 항고혈압제, 항알레르기제, 항류마티스제 및 진통제 등으로 활용되고 있다^{14,15)}. 최근에는 진통 및 소염작용, 비만세포의 탈과립, 칼슘 흡수 억제, 수동적 피부 아나필락

시 반응, 히스타민의 방출을 억제하는 항과민작용 등이 보고되고 있다¹⁶⁻¹⁹⁾.

이러한 효과 때문에 防己는 임상에서 비만 환자에 많이 활용되고 있으며, 이에 관한 실험적 연구^{20,21)}와 防己黃儲湯, 防己荻苓湯과 같은 防己를 포함하는 처방에 대한 연구들²²⁾이 있었다.

그러나 防己가 비만관련 유전자의 발현에 어떤 영향을 미치고 있는지에 대한 연구결과는 보고된 바가 없었다. 이에 저자는 DNA chip을 이용하여 防己가 유전자의 발현에 미치는 영향을 연구하여 그 결과를 보고한다.

II. 재료 및 방법

1. 동물 및 세포주

1) 동 물

10주령의 male C57BL/6 mouse를 중앙실험동물(주)로부터 공급받아 22~24℃로 유지되는 사육실에서 조명시간은 12시간으로 하여 2주간의 적응기를 거쳐 실험을 하였으며 고형사료(10% kcal fat diet, SamtakoTM)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 세포주

독성실험을 위해 Chang liver, HEK 293T와 Raw 264.7의 세 가지 cell line을 사용하였다. Chang liver는 사람의 간조직에서, HEK 293T는 사람의 신장조직에서, Raw 264.7은 쥐의 macrophage에서 유래된 것으로 각각의 ATCC No.는 CCL-13, CRL-11268, TIB71이다.

2. 약재 및 시약

1) 약 재

실험에 사용된 防己는 규격품목(건조

절단한 상태)을 전문 약재상(삼성약업사, 부천, Korea)을 통해 구입한 다음 정선, 추출하여 사용하였다.

2) 시 약

실험과 관련하여 Total cholesterol의 농도 측정에는 cholesteyme-v, HDL cholesterol의 농도 측정에는 HDL-C555(신양화학)를 사용했으며, LDL cholesterol의 농도 측정은 Direct LDL cholesterol(randox)을 사용하였다. Microarray profiling에 사용된 cDNA chip은 Oparray Mouse whole 35K oligo chip(㈜지노텍, Ansan Korea)을 사용하였다. 세포독성 시험에 사용한 cell counting kit-8(CCK-8)은 Dojindo Laboratories(Japan)의 제품을 사용하였다.

3. 실험방법

1) 검액의 조제

건조된 防己를 분쇄기를 이용하여 곱게 간 후 냉동기(deep freezer, -60℃, SANYO, Japan)에 보관하였다. 보관된 한약재 각 200g을 취한 후 1,000ml의 증류수를 넣어 100℃로 1시간 가열하였다. 가열된 防己를 filter(Whatman #2)로 액체를 분리하였다. 걸러진 용액을 rotary vacuum evaporator(진공감압농축기: R110, BUCHI, Switzzland)를 이용하여 80℃에서 농축시켰다. 농축 용액 100ml를 취하여 동결건조기(일신, Korea)에 3일간 동결건조 하여 고형성상의 防己 추출물 24.01g을 추출하였고, 수율은 12.005%였다.

이러한 고형의 동결건조추출물을 -20℃에서 보관하며 필요한 만큼 분쇄하여 증류수에 녹여 매일 사용분의 검액을 조제하여 실험에 사용하였다.

2) 실험동물의 분류 및 투여

일반사료 급여군 (lean control; non treated, 이하 normal group)과 고지방사료 급여군 (fat control; non treated, 이하 D.I.O group)은 Cage당 5마리씩을, 고지방사료 급여와 동시에 防己 투여군 (fat control; treated, 이하 SA group)은 Cage당 7마리씩 나누었다. Normal group은 일반사료 (10% Kcal fat diet, SamtakoTM)를, D.I.O group은 고지방사료 (60% Kcal high fat diet, Research DietsTM)를 급여하였으며, SA group은 대조군과 동일한 사료를 급여함과 동시에 防己 추출물을 멸균수에 용해시켜 음용하도록 하였다.

임상처방집²³⁾의 일반적 상용량과 실험동물의 조건 및 실험동물의 일일 음용수의 섭취량은 15 ± 3 ml/일임을 고려하여 FDA guide²⁴⁾에 근거하여 防己의 일일 투여량은 13mg이 되도록 防己는 1.0mg/ml의 수용액을 만들어 공급하였다.

3) 체중 및 식이 섭취량 측정

체중은 실험 개시 후 14주까지 매주 3회(총 20회) 오후 6시에 정기적으로 측정하였으며 약물 섭취량과 지방식 섭취량은 매일 오후 6시에 먹이를 주고 24시간 후 남은 양을 측정하여 전날 준 사료량에서 남은 사료량을 빼는 방식으로 측정하여 일주일 단위로 평균값을 계산하였다. 실험동물의 1일 음용수의 용량은 15 ± 3 ml/day/mouse였다.

4) Cholesterol의 측정

혈청 내 지방질 농도를 측정하기 위해 실험 개시 후 2주, 8주가 지났을 때 mouse로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 혈청내의 total cholesterol 농도를 측정하였다.

5) RNA의 추출

防己의 장기 투여가 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 8주간 계속 약물을 투여한 실험개시 8주후에 실험동물로부터 RNA를 추출하였다.

6) cDNA micro-array data analysis

DNA micro-array data analysis를 위해 실험 시작 8주 후에 간 조직을 분리하여 total RNA를 추출하여 (주)지노텍에 의뢰하였다. DNA 분석과정은 Hybridized slide glass scanning, Spot intensity scatter plot, Spot intensity M vs A plot, Box plot normalization의 과정 등을 통하여 분석하였다.

7) 세포 독성

防己의 세포독성을 알아보기 위해 96-well plate에 cytotoxicity를 확인하기로 결정한 Chang liver, HEK 293T, Raw264.7 cell suspension을 100 μ l씩 (5,000 cells/well) 담았다. 24시간 동안 incubator (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 pre-incubation한 후 culture medium 내로 다양한 농도의 防己 추출물을 10 μ l씩 가하였다. Incubator에서 48시간 동안 배양한 후 상온에서 미리 덩힌 CCK-8 solution을 각각의 well에 10 μ l씩 가하고 incubator에서 1~4시간 동안 배양하면서 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 통계처리

통계 처리는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 평균과 표준편차는 Microsoft[®] Office Excell 2003(Microsoft Korea, Korea)에 수치를 직접 입력하여 계산하였다. 본 실험에서는 표준편차와 표준오차에 의한 판단 시 편차 수치의 2배수 이내는 차이가 없다고 판단하므로 표준편차와 표준오차 범위 내에서의 유의차

가 인정되지 않았다. 단, 통계처리 시 개체 수에 의한 data 처리 범위의 한계성으로 평균값과 표준오차(deviation)을 줄이기 위한 방편)만 처리하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 체중 및 사료섭취량의 변화

1) 체중의 변화

사육실 적응시기를 거쳐 약물투여 효과를 추적하기 시작한 초기(실험개시 0주후~실험개시 2주후)에는 cage당 5~6마리를 집단사육조건에서 사육하였다. 그러나 심각한 흥분상태로 격렬한 싸움을 하였으며 그로인해 심각한 피부 손상이 생겼다. 이로 인해 실험개시 2주 후부터 7주 후까지 실험군을 한 마리씩 개별

사육하였으며 실험개시 8주후부터 개별 사육하던 실험군을 집단사육 하였다.

체중의 변화를 관찰한 결과 normal group의 체중은 실험개시 주(12주령)에 $25.52 \pm 0.74g$, 2주후(14주령) $28.66 \pm 0.89g$, 7주후(19주령) $31.52 \pm 0.74g$, 14주후(26주령) $38.96 \pm 1.07g$ 으로 증가하였고, D.I.O group의 체중은 실험개시 주(12주령)에 $26.68 \pm 0.46g$, 2주후(14주령) $29.66 \pm 0.29g$, 7주후(19주령) $37.48 \pm 0.45g$, 14주후(26주령) $50.00 \pm 1.15g$ 으로 증가하였고, SA group의 체중은 실험개시 주에 $27.27 \pm 0.59g$, 2주후 $28.43 \pm 0.42g$, 7주후 $39.44 \pm 1.60g$ 으로 증가하다 14주후 $37.20 \pm 2.02g$ 으로 감소하였다. 집단사육으로 전환한 이후 SA group의 체중은 D.I.O group에 비해 유의하게 억제되었다(Fig. 1).

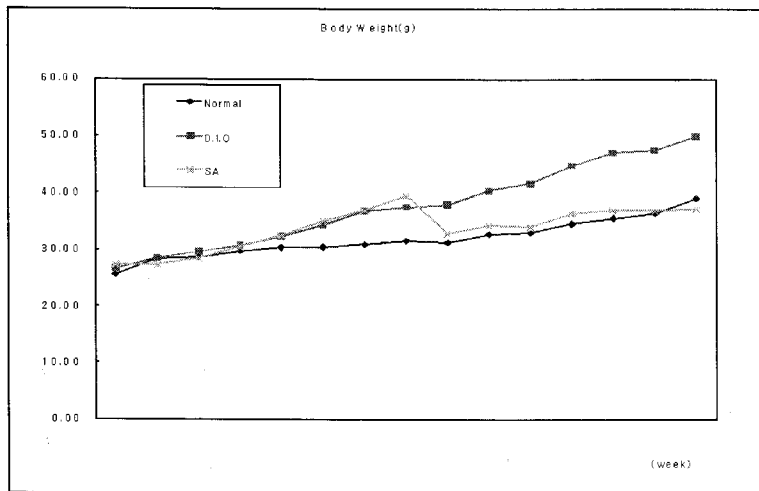


Fig. 1. Body weight of each group
normal : normal diet group, D.I.O : high fat diet group, SA : *Sinomenium acutum* diet group

2) 사료섭취량의 변화

사료섭취량의 변화를 관찰한 결과 normal group의 실험개시 0주, 2주후, 7

주후, 14주후의 일일 사료섭취량은 각각 $3.04 \pm 0.12g$, $2.94 \pm 0.12g$, $3.23 \pm 0.49g$, $3.70 \pm 0.05g$ 이었으며, D.I.O group의 실험개시 0주,

2주후, 7주후, 14주후의 일일 사료섭취량은 각각 $2.60 \pm 0.15g$, $2.44 \pm 0.12g$, $2.70 \pm 0.09g$, $2.44 \pm 0.17g$ 이었으며, SA group의 실험개시 0주, 2주후, 7주후, 14주후의 일일 사료섭취량은 각각 $2.53 \pm 0.12g$, $3.13 \pm 0.12g$, $1.77 \pm 0.07g$, $2.67 \pm 0.04g$ 이었다. 실험기간동안 normal group, D.I.O group, SA group의 일일 평균 사료섭취량은 각각 $3.20 \pm 0.06g$, $2.55 \pm 0.05g$, $2.83 \pm 0.07g$ 이었으며 실험개시 8주후부터 14주후까지의 일일 평균 사료섭취량은 각각 $3.54 \pm 0.08g$, $2.56 \pm 0.07g$, $2.83 \pm 0.07g$ 이었다. 실험개시 8주 이후 SA group의 사료섭취량은 D.I.O group에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

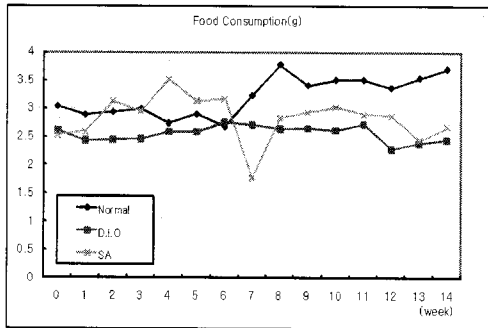


Fig. 2. Food consumption of each group normal : normal diet group, D.I.O : high fat diet group, SA : *Sinomenium acutum* diet group

2. 혈중 지질량의 변화

혈중 지질량을 측정하기 위하여 실험개시 2주 후(비만 초기), 8주 후(비만 후기)에 혈액을 채취하였다. 본 연구에서는 total cholesterol 농도, HDL cholesterol 농도, LDL cholesterol 농도를 측정하였다.

Total cholesterol 농도는 실험개시 2주 후 normal group이 $72.29 \pm 2.07mg/dl$, D.I.O group은 $81.43 \pm 6.33mg/dl$, SA group은

$81.15 \pm 9.59mg/dl$ 였으며, 실험개시 8주 후 normal group이 $70.18 \pm 3.01mg/dl$, D.I.O group이 $79.11 \pm 9.51mg/dl$, SA group은 $76.71 \pm 7.20mg/dl$ 였다(Fig. 3).

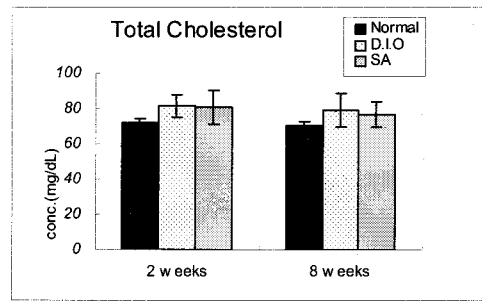


Fig. 3. Total cholesterol after 2&8 weeks normal : normal diet group, D.I.O : high fat diet group, SA : *Sinomenium acutum* diet group

HDL cholesterol 농도는 실험개시 2주 후 normal group이 $68.08 \pm 5.01mg/dl$, D.I.O group이 $76.87 \pm 11.40mg/dl$, SA group은 $73.94 \pm 8.49mg/dl$ 였으며, 실험개시 8주 후 normal group이 $78.39 \pm 10.15mg/dl$, D.I.O group이 $81.60 \pm 7.32mg/dl$, SA group은 $67.04 \pm 8.75mg/dl$ 였다(Fig. 4).

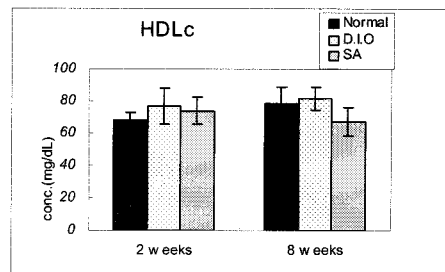


Fig. 4. HDL cholesterol after 2&8 weeks normal : normal diet group, D.I.O : high fat diet group, SA : *Sinomenium acutum* diet group

LDL cholesterol 농도는 실험개시 2주 후 normal group이 $50.50 \pm 3.22mg/dl$, D.I.O

group이 55.61±6.12mg/dl, SA group은 51.37±6.57mg/dl였으며, 실험개시 8주 후 normal group이 42.01±2.57mg/dl, D.I.O group이 60.80±9.48mg/dl, SA group은 53.22±4.93mg/dl였다(Fig. 5).

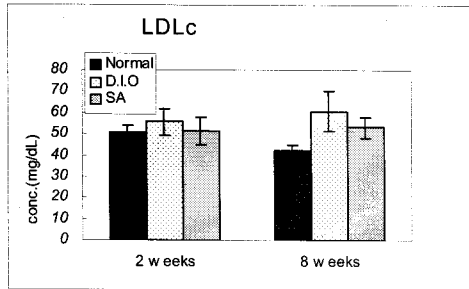


Fig. 5. LDL cholesterol after 2&8 weeks normal : normal diet group, D.I.O : high fat diet group, SA : *Sinomenium acutum* diet group

전체적으로 유의한 콜레스테롤 농도 차이는 없었으므로 SA group은 D.I.O group에 비하여 total cholesterol, HDL

cholesterol과 LDL cholesterol 농도에 유의한 억제효과를 나타내지 못하였다.

3. Total RNA 추출 결과

防己의 장기 투여가 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 8주간 계속 약물을 투여한 실험개시 8주후에 실험 동물로부터 RNA를 추출하였다. D.I.O group, SA group으로부터 각각 2개의 sample을 채취하여 각 sample을 260nm에서 세 번의 흡광도를 측정하여 D.I.O group에서는 0.64, 0.51을, SA group에서는 0.54, 0.33의 값을 얻었으며, 280nm에서 세 번의 흡광도를 측정하여 D.I.O group에서는 0.33, 0.26을, SA group에서는 0.27, 0.17의 값을 얻었다. 이를 근거로 산출한 total RNA의 양은 D.I.O group이 각각 282.19µg, 223.23µg, SA group이 각각 237.89µg, 146.96µg이었다 (Table 1, Fig. 6).

Table 1. Results of total RNA concentration

| sample Name | 260 nm | mean | 280 nm | mean | ratio (260/280) | conc (µg/µl) | total vol(µl) | total RNA(µg) |
|-------------|--------|------|--------|------|-----------------|--------------|---------------|---------------|
| D.I.O-1 | 0.637 | | 0.329 | | | | | |
| | 0.625 | 0.64 | 0.323 | 0.33 | 1.94 | 5.13 | 55.00 | 282.19 |
| | 0.662 | | 0.338 | | | | | |
| D.I.O-2 | 0.510 | | 0.255 | | | | | |
| | 0.504 | 0.51 | 0.254 | 0.26 | 1.98 | 4.06 | 55.00 | 223.23 |
| | 0.508 | | 0.259 | | | | | |
| SA-1 | 0.542 | | 0.278 | | | | | |
| | 0.531 | 0.54 | 0.267 | 0.27 | 1.97 | 4.33 | 55.00 | 237.89 |
| | 0.549 | | 0.279 | | | | | |
| SA-2 | 0.338 | | 0.170 | | | | | |
| | 0.331 | 0.33 | 0.167 | 0.17 | 1.99 | 2.67 | 55.00 | 146.96 |
| | 0.333 | | 0.166 | | | | | |

D.I.O-1 : Sample No.1 of D.I.O group D.I.O-2 : Sample No.2 of D.I.O group
 SA-1 : Sample No.1 of SA group SA-2 : Sample No.2 of SA group

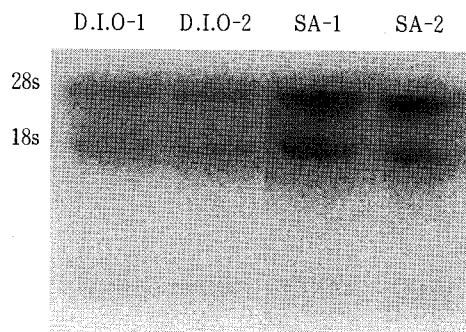


Fig. 6. Total RNA agarose image

4. cDNA micro-array 결과

실험 개시 8주후 간 조직에서의 gene expression의 변화를 cDNA chip analysis 방법으로 확인하였다. 그 결과 SA group에서 2-fold 이상 up-regulation 된 gene은 1,213개, 0.5-fold 이하로 down-regulation된 gene은 2,558개였다(Table 2).

Table 2. Significant up or down regulated genes in mouse liver treated with SA

| Up-regulated gene(>2.0-fold) | | Down-regulated gene(<0.5-fold) | |
|---|---------|--|---------|
| Name | Fold | Name | Fold |
| Ankyrin repeat and SAM domain containing 1 | 550.099 | Carbamoyl-phosphate synthetase 1 | 0.00791 |
| Try10-like trypsinogen (Try10l) | 265.663 | PREDICTED : apolipoprotein B [Mus musculus] | 0.0283 |
| Pancreatic amylase A-1 | 220.895 | Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial | 0.03098 |
| Pancreatic lipase (Pnlip) | 198.526 | hepatic nuclear factor 4, alpha | 0.03111 |
| Transcribed locus, moderately similar to XP_532744.1 | 188.48 | Complement component 4 (within H-2S) (C4) | 0.03245 |
| Try10-like trypsinogen (Try10l) | 178.121 | Carbamoyl-phosphate synthetase 1 | 0.0346 |
| Elastase 1, pancreatic | 174.185 | Complement component 4 (within H-2S) (C4) | 0.03849 |
| Chymotrypsinogen B1 (Ctrb1) | 159.693 | acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 11 | 0.0396 |
| Carboxypeptidase A1 (Cpa1) | 155.788 | Pyruvate kinase liver and red blood cell (Pklr) | 0.04077 |
| C57BL/6J colipase (Clps) | 138.844 | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenz yme A synthase 1 | 0.04201 |

5. 세포 독성 실험 결과

防己 추출물은 cell-line을 이용한 in vitro 조건의 세포독성 평가 결과 HEK-293T에서 LD₅₀ 값이 388 μ g/ml, Chang-liver에서 LD₅₀ 값은 358 μ g/ml, RAW 267.4에서 LD₅₀ 값이 197 μ g/ml 으 로 나타났다(Table 3, Fig. 7).

Table 3. Cytotoxicity of SA treatment (LD₅₀)

| LD ₅₀ (ug/ml) | SA |
|--------------------------|-----|
| Chang liver | 388 |
| HEK 293T | 358 |
| Raw 264.7 | 197 |

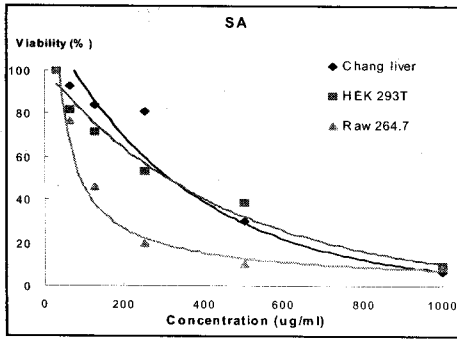
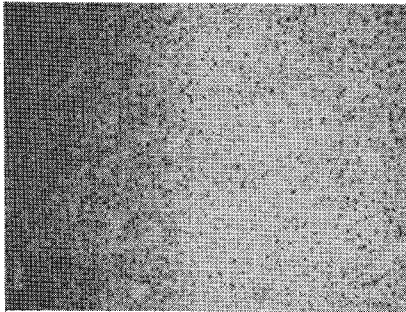
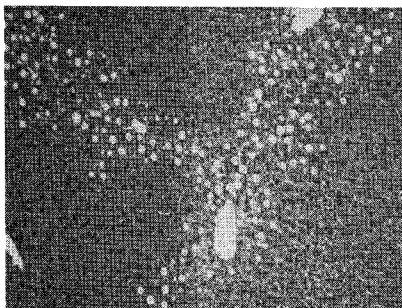


Fig. 7. Cytotoxicity of SA treatment

防己 추출물을 14주간 투여한 후 간 조직의 손상여부를 현미경 관찰법으로 확인한 결과 특이한 변화는 관찰되지 않았으며 약간의 지방간 증후만 보일 뿐 독성에 의한 손상은 거의 보이지 않았다 (Fig. 8).



(A) Normal controlled mouse liver



(B) SA administrated mouse liver

Fig. 8. Histomorphology of mouse liver

비만은 사회 경제적 여건의 변화로 최근 발생 빈도가 점차 증가하는 경향이 있으며, 각종 성인병과 만성질환을 일으키는 질환으로 인식되고 있어 이에 따라 비만의 치료에 많은 관심을 기울이고 있다. 비만은 식요법, 운동요법과 행동수정요법을 병행해야 최상의 치료효과를 거둘 수 있으므로^{4,5)} 시간과 노력이 많이 소모되고 실행이 어렵기 때문에 한의학에서는 한약물의 복용에 의한 비만의 치료에도 관심을 두고 있다²⁵⁻³⁰⁾.

비만의 한방적 치료법을 살펴보면, 治法으로 補氣健脾, 化濕利水去痰, 通腑消導, 活血通絡 등의 治法이 있으며, 虛證인 경우에는 健脾, 益氣, 補腎, 溫陽, 養陰하는 治法을 주로 응용하고, 實證인 경우에는 祛濕(化濕), 化痰(去痰), 利水, 消導, 活血化瘀, 通腑하는 治法이 주로 이용 된다고 한다. 그 외에 疏肝利膽, 升降三焦하는 治法을 응용하는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 虛證에서는 健脾法, 實證인 경우에는 祛濕除痰法이 주로 응용된다고 하였다^{6,31)}. 또한 치료 방법에는 藥物療法, 體鍼療法, 耳鍼療法, 節食療法, 藥膳療法, 按摩療法, 韓藥蒸氣療法과 電氣脂肪分解鍼法 등이 있다³²⁻³³⁾.

防己는 粉防己(*Stephania tetrandra*), 廣防己(*Aristolochia fangchi*), 木防己(땃땃이덩굴, *Cocculus trilobus*), 漢中防己(異葉馬兜鈴, *Aristolochia heterophylla*), 青藤(青風藤, *Sinomenium acutum*), 새모래덩굴(*Menispermum dauricum*) 등의 건조된 根莖으로 우리나라에서는 땃땃이덩굴을 木防己로 사용하고 있으며, 廣防己는 唐防己, 粉防己는 漢防己라고도 한다¹⁶⁻¹⁹⁾.

IV. 고찰

防己는 苦辛·寒·無毒하며 歸經은 膀胱·腎·脾經이며 祛風除濕, 利水消腫, 行氣止痛의 효능으로 風濕痺痛, 利水脚氣, 小便不利, 濕疹瘡毒, 血中濕熱 惡瘡癰腫 등의 치료에 응용되고 있으며^{14,15)} 下焦濕熱을瀉하는 效能으로 水腫鼓脹과 濕熱脚氣, 手足攣痛, 癬疥瘡腫 등을 다스리는데 자주 쓰이는데^{17,18)} 防己의 이러한 효능을 이용하여 임상에서는 肥滿 환자의 치료에 자주 쓰이고 있다^{20,21)}.

그러나 防己 복용과 관련된 연구보고 가운데 Vanherweghem 등³⁴⁾은 체중감량 요법의 일환으로 韓藥材 중 *Stephania tetrandra*(漢防己)와 *Magnolia officinalis*(厚朴) 2가지 약재를 캡슐로 만들어 복용한 경우 腎臟機能에 이상을 초래하였으며, 앞의 두 가지 약재에서 특별한 腎臟毒素를 발견할 수는 없었으나 防己에 포함된 alkaloid계통의 성분이 이러한 이상을 유발한 것으로 추정한다고 보고하였다. 또 Vanhaelen 등³⁵⁾의 보고에서는 防己의 뿌리에서 tetrandine(an alkaloid characteristic of *S. tetrandra*)와 aristolochic acid(characteristic of *Aristolichia spp.*)의 성분을 검출하여 腎臟機能에 이상을 미치는 alkaloid 성분을 이것으로 규정하고 한약재 성분에 대한 정확한 규명이 필요함을 언급하였다. Vanherweghem 등²⁵⁾은 또한 체중감량을 위해 *Stephania tetrandra*를 600mg/day씩 2년 이상 장기간 복용하여 한약재 신염(Chinese herb nephropathy)을 일으킨 환자가 이후 renal pelvic carcinoma가 발생한 경우에 대하여 원인 미상의 chronic interstitial renal fibrosis가 한약재 신염에 의해서도 유발될 수 있으며 이에 따른 이차적인 腎臟의 이상을 초래함을 보고하였다. 그러나 이상의

연구는 防己로 만들어진 캡슐을 적어도 3개월 이상 길게는 2년 정도의 장기복용이 이러한 腎臟機能의 이상을 일으킬 수 있다는 것이다. 또한 片 등²⁶⁾은 白鼠를 대상으로 한 실험에서 木防己와 漢防己의 1회 경구투여를 통하여 사망 사례는 물론 유의할만한 임상증상 및 체중의 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았으며, 木防己와 漢防己의 30일 간의 경구투여를 통하여 일반상태의 관찰에서 유의할만한 임상증상은 관찰되지 않았고, 체중의 경우 木防己 투여군에서 유의성 있게 감소하였다고 하였다.

비만의 발생과 비만치료에 사용되는 약물의 작용기전과 관련한 연구들 중에서 최근 microarray profiling을 이용하여 다양한 연구가 시도되고 있다^{27-30,36,37)}. 그러나 위에서 언급한 바와 같이 防己가 한방 비만치료제로 많이 사용되고 있으나 비만관련 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구를 찾아보기 어려웠다. 이에 DNA chip을 이용하여 防己가 유전자의 발현에 미치는 영향에 관한 실험을 하게 되었다.

본 실험에서는 10주령의 male C57BL/6 mouse 24마리를 normal group과 D.I.O group은 5마리, SA group은 7마리씩 나누었다. 2주간의 적응기를 거친 후 normal group은 일반사료(10% Kcal fat diet, SamtakoTM)를 D.I.O group과 실험군은 고지방사료(60% Kcal high fat diet, Research DietsTM)를 급여하였으며 SA group은 防己추출물을 멸균수에 녹여 14주간 경구투여하며 사육하였다.

사육실 적응시기를 거친 후 약물의 투여 효과를 추적하기 시작한 초기(실험개시 주~실험개시 2주 후)에는 cage당

5~7 마리를 집단사육조건에서 사육하였다. 이 기간 동안 SA group은 normal group과 동일한 체중의 변화를, D.I.O group에 비하여는 약간의 체중 증가 억제 양상을 보였으나, 심각한 흥분 상태로 격렬한 싸움을 하였으며, 그로 인한 심각한 피부 손상이 생겨 실험개시 2주 후부터 7주 후까지 SA group은 피부손상이 안정화된 실험개시 8주후까지 개별 사육 하였다. 그 결과 SA group의 체중은 D.I.O group과 동일한 체중 증가양상을 보였다. 비만 억제에 대한 약물 투여 효과가 소멸된 것이 집단 사육 시 싸움에 의한 기초 대사량의 증가에 기인한 것인지를 확인하기 위하여 실험개시 7주 후부터 다시 집단사육을 한 결과 SA group의 체중은 감소기를 거쳐 normal group과 동일한 체중 양상을 나타내었으며(Fig. 1), 개별사육에서 집단사육으로 전환한 기간 이후 SA group의 체중은 D.I.O group에 비하여 유의성 있게 감소하였음을 알 수 있었다.

사료섭취량의 변화를 관찰한 결과 실험기간 동안 normal group, D.I.O group, SA group의 일일 평균 사료섭취량은 각각 $3.20 \pm 0.06g$, $2.55 \pm 0.05g$, $2.83 \pm 0.07g$ 이었으며, 실험개시 8주 후부터 14주 후까지의 일일 평균 사료 섭취량은 각각 $3.54 \pm 0.08g$, $2.56 \pm 0.07g$, $2.83 \pm 0.07g$ 이었다(Fig. 2). SA group의 사료섭취량은 집단 사육으로 전환한 실험개시 7주 후를 제외하면 D.I.O group에 비하여 유의한 감소를 보이지 않았다.

비만지수가 높으면 혈당과 지방의 함량이 높아지는 것³⁸⁾에 의거하여 혈중 지질함량의 혈액학적 분석을 실시하였다. Cholesterol은 인지질과 더불어 세포막을

구성하는 주요 성분으로 쓸개즙, 부신피질호르몬, 성호르몬 등의 전구물질이 되는 인체 내에서 중요한 성분이지만 cholesterol이 높을 경우 동맥경화증이나 허혈성 심질환의 독립적인 원인이 되며, 비만지수가 높으면 혈청 중 cholesterol 함량이 증가하는 것으로 밝혀져 있어 비만증에서 유의한 의미를 가진다³⁹⁾.

혈중 지질량을 측정하기 위하여 실험개시 2주 후와 8주 후에 혈액을 채취하여 total cholesterol 농도, HDL cholesterol 농도, LDL cholesterol 농도를 측정하였다. SA group은 D.I.O group에 비하여 total cholesterol, HDL cholesterol과 LDL cholesterol 농도에 유의한 억제효과를 나타내지 못하였다.

변 등⁴⁰⁾은 肥減丸이 혈청 중 total cholesterol을 감소시켰고, 혈청 중 HDL cholesterol의 함량이 D.I.O group에 비하여 증가하는 경향성이 있었으나 유의성은 인정되지 않았으며, LDL-cholesterol 함량은 감소하는 경향이 있었다고 하였는데, 이는 防己의 單味에 의한 것이 아니며 防己가 포함된 복합제에 의한 결과이므로 구분이 필요할 것으로 사료된다. 또한 시²¹⁾는 高콜레스테롤 飼料를 食餌한 高脂血症 흰쥐에서 粉防己 투여군은 Tc, HDLc에 모두 유의한 영향이 없었고, 淸風藤 투여군은 Tc, 함량은 저하되었으나 HDLc 함량은 상승하였다고 하였으며, 기 등²²⁾은 防己로서 淸風藤을 사용한 防己茯苓湯 투여군과 防己黃芪湯 투여군에서 Tc 함량이 유의하게 저하되었다고 하여 본 실험의 결과와 다소 상이한 점이 있었다.

防己의 장기 투여가 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 8주간 계

속 약물을 투여한 실험시작 8주후에 실험동물로부터 RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA의 양은 D.I.O group이 각각 282.19 μ g, 223.23 μ g, SA group이 각각 237.89 μ g, 146.96 μ g이었다(Table 1).

DNA chip을 이용한 유전자 발현양상을 확인한 결과 SA group의 D.I.O group에 대비한 유전자 발현 변이는 상당히 많은 수의 유전자들이 발현 변이를 나타내어 총 3,771(10.48%)개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 2 fold 이상 발현 변이를 나타내었다. 그 중에 Egr1, Cxcl1, Btg2, Ube2c, Cd59b, Cd274, Bcl2alc, Isg12, Il18bp gene 등의 host pathogen interactionrelated gene(p-value 2.07e-11) 및 cytokine related gene(p-value 1.01e-10), defense immunity protein related gene(p-value 3.25e-6)을 포함하여 1,213개의 유전자들이 2 fold 이상 over expression을 나타내었다. 그 외에 Mapk14, Bcl6, Mela, Nedd4e, Mafa, Ewsr1, Tnf, Hmx3, Hoxc4 gene 등의 cell growth related gene(p-value 4.12e-20) 및 gene expression regulation related gene (p-value 1.15e-5), lipid metabolism related gene(p-value 0.0368) 등을 포함하여 2,558개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 0.5 fold 이하 down expression을 나타내었다(Table 2).

Cell-line을 이용한 in vitro 조건에서의 防己 추출물의 세포독성 실험결과 SA group에서는 HEK-293T에서 LD₅₀ 값이 388 μ g/ml, Chang-liver에서 LD₅₀ 값은 358 μ g/ml, RAW 267.4에서 LD₅₀ 값이 197 μ g/ml으로 나타나 防己 추출물은 실험동물의 세포에 독성을 나타내지

않는 것으로 관찰되었다(Table 3).

또한 防己 추출물을 14주간 투여한 후 간 조직의 손상여부를 현미경 관찰법으로 확인한 결과 특이한 변화는 관찰되지 않았으며, 약간의 지방간 증후만 보일 뿐 독성에 의한 손상은 거의 보이지 않아 片 등²⁸⁾의 白鼠를 대상으로 한 실험의 경우와 같이 독성은 없었음을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

이상의 실험 결과로 防己 추출물은 D.I.O group에 비하여 체중을 억제하는 효과가 있었으나 이는 개별사육 상태에서는 확인할 수 없었으며, 집단사육 상태에서 확인할 수 있었다. 그러나 혈중 지방 농도의 비교 결과 고지방식에 의한 혈중 지질함량의 유의한 증가는 확인되었지만 防己추출물에 의한 지질농도의 저하는 보이지 않았다. 따라서 防己추출물의 투여에 의한 체중 증가 억제는 직접적인 약리작용에 의한 것으로 판단할 근거는 없었으며, 집단사육에 의한 체중 증가 억제 양상 및 격리 사육 후 정상적 체중 증가를 근거로 교감신경흥분에 의한 운동량 증가와 기초대사량의 증진에 의한 에너지 소모 결과로 체중 증가가 억제되었을 것으로 추정된다. 향후 변화된 유전자의 clustering을 이용한 bioinformatics 정보에 의해 유전자의 선택적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

또한 본 실험에서는 防己 추출물이 cholesterol 함량을 유의하게 억제하지 못하였으며, 개별사육 조건에서는 D.I.O group과 동일한 양상으로 체중이 증가하다 집단사육으로 전환하였을 때 체중의 증가가 억제된 것으로 미루어 본 실험에 사용된 약물의 직접적인 체중억제 보다는 약물이 교감신경을 자극하여 운동량

과 기초대사량이 증가하였고, 이를 통해 에너지 소비를 촉진시키는 것으로 보인다. 따라서 이에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 사료되며, 防己를 실제 비만에 적용하기 위해서는 單味로 사용하는 것보다는 이러한 자극 효과를 완충시킬 수 있는 약물과 함께 복합제로 사용하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

또한 본 실험에서는 성장기에 있는 동물을 모델로 실험하였으나 임상에서는 30대 이후의 경우를 많이 접하게 되므로 사람의 연령으로 환산하여 30대 이후에 해당하는 동물모델을 만들어 실험을 하는 것도 유의할 것으로 사료된다.

본 실험에서 살펴본 gene expression의 변화에 의하면 SA group에 있어서 유도 발현이 증가 혹은 억제된 유전자들의 전체적 연관성은 신호전달계의 활성화와 지방산 생합성 및 소모에 관련하여 나타났다. 이와 같이 mRNA 발현만을 근거로 위에 언급한 비만 억제 효능에 대하여 단정적 결론을 내릴 수는 없었으나 동물 사육과정에서의 체중 변화와 연관하여 체중증가 억제효과는 기초대사량의 증가에 기인한 것으로 판단된다. 따라서 이러한 유전자 발현량의 변화만을 근거로 특정 유전자의 기능 억제 혹은 향진을 통해 비만치료의 표적으로 접근하기에는 systems biology측면의 network에 의한 보다 폭넓은 정보가 필요할 것으로 사료되며 실제 비만환자의 치료에 있어서 防己가 單味로 사용되는 것이 아니라 한약재 복합 처방에 의하므로 이에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

防己추출물의 투여가 비만 유발 male C57BL/6 mouse의 생리기능과 DNA Chip 발현에 미치는 영향을 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 防己 추출물은 비만 유발 male C57BL/6 mouse의 체중을 유의성 있게 억제 하였으나 식이섭취량은 억제하지 못하였으며, 사육조건에 따라 체중조절효과가 다르게 나타났다.
2. 防己 추출물은 비만 유발 male C57BL/6 mouse의 Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol을 유의하게 변화시키지 못하였다.
3. cDNA chip analysis 방법으로 gene expression의 변화를 확인한 결과 防己 추출물은 1,213개의 gene을 up-regulation하며, 2,558개의 gene을 각각 down-regulation 시켰다.
4. 防己 추출물은 지방산, 중성지방의 소모성 유전자의 발현증가와 중성지방 및 아포지단백 관련 유전자의 발현을 억제하는 양상을 보였다.
5. 防己 추출물의 투여에 의한 체중 증가 억제 효과는 직접적인 약리작용에 의한 것으로 판단할 근거는 없으며, 교감신경 흥분에 의한 기초대사량 증가를 통한 에너지 소모에 따른 것으로 추정되었다.
6. 防己 추출물은 독성평가에서 세포 독성이 나타나지 않았다.

- 투 고 일 : 2007년 10월 25일
- 심 사 일 : 2007년 11월 02일
- 심사완료일 : 2007년 11월 06일

V. 결 론

참고문헌

1. 徐舜圭. 성인병·노인병학. 서울: 고려의학. 1995:467-473.
2. 醫學教育研修院. 가정의학. 全訂版 2刷. 서울: 서울대학교출판부. 1995:340-342.
3. 대한비만학회. 임상비만학. 서울: 고려의학. 2001:19-29.
4. Flegal KM et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. JAMA. 2002;228:1723-1727.
5. 보건복지부. 국민건강 영양조사 총괄편. 2005. <http://mohw.go.kr>
6. 裴秉哲 譯. 今釋黃帝內經素問. 서울: 성보사. 1978:305-315,437-444.
7. 楊維傑. 黃帝內經靈樞譯解. 서울: 성보사. 1980:243-416.
8. 강순아 등. 비만관련 한약혼합제제의 비만에 대한 효과. 대한본초학회지. 2003;18(4):59-64.
9. 류은경 등. 백복령이 비만유도 흰쥐의 체중, 부고환, 지방조직, 혈액 및 유전자 변화에 미치는 영향. 한방재활의학과과학회지. 2000;10(2):81-98.
10. 김남수, 송용선. 구기자추출액이 백서의 비만모형에 미치는 영향. 한방재활의학과과학회지. 1997;7(2):65-83.
11. 배정환 등. 대황이 비만유도 백서의 체중과 부고환지방조직 변화에 미치는 영향에 관한 연구. 한방재활의학과과학회지. 1998;8(2):62-76.
12. 오명길, 송용선. 대황 추출액이 백서의 비만모형에 미치는 영향. 한방재활의학과과학회지. 1997;7(2):46-64.
13. 장병수 등. 반하가 비만유도 흰쥐의 체중, 지방조직, 혈액 및 유전자 변화에 미치는 영향. 한방재활의학과 1999;9(1):103-128.
14. 全國韓醫科大學 本草學教授共編著. 本草學. 서울: 영림사. 1991:121-123.
15. 陳瑞準 等. 實用中藥手冊. 上海: 上海科學技術出版社. 1991:532-533.
16. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 北京: 人民衛生出版社. 1982:981-985.
17. 申佶求. 申氏本草. 서울: 壽文社, 1982:23-29, 384-385, 443-447, 600-603.
18. 전국한의과대학 본초학 교실. 本草學. 서울: 永林社, 1994: 291-292, 263-264.
19. 楊倉良. 毒藥本草. 北京: 中國醫藥出版社, 1995: 407-411.
20. 서정임. 고지방식이틀 섭취시킨 흰쥐에서 방기의 항비만 효과. 군산: 군산대학교 대학원. 2004.
21. 시진국. 분방기와 청풍등이 고지혈증, 고혈당증 및 혈전증 흰쥐에 미치는 효과: 방기-황기, 방기-택란 약대를 중심으로. 성남: 경원대학교 대학원. 2003.
22. 기성식, 이영중. 防己黃芪湯 및 防己茯苓湯이 高脂血症 흰쥐에 미치는 효과. 대한한의학회지. 2005;20(2):149-157.
23. 美術公論社 韓醫學事業部. 韓方臨床處方大全 東國大附屬 韓方病院 院內處方篇. 1996.
24. FDA. Guidance for Industry and Reviewers: Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
25. JL. Vanherweghem et al. Chinese herbs nephropathy and renal pelvic carcinoma. Nephrol Dial Transplant

- 1995;10(2):270-273.
26. 片世賢, 朴宰賢. 防己의 安全性에 關한 研究. 東서의학. 1999;24(76): 1-13.
 27. Sun G. Application of DNA microarrays in the study of human obesity and type 2 diabetes. OMICS. 2007 Spring;11(1):25-40.
 28. Lopez IP et al. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes Res.* 2003 Feb; 11(2):188-194.
 29. Taleb S et al. Microarray profiling of human white adipose tissue after exogenous leptin injection. *Eur J Clin Invest.* 2006 Mar;36(3):153-163.
 30. Campion J et al. Differential gene expression and adiposity reduction induced by ascorbic acid supplementation in a cafeteria model of obesity. *J Physiol Biochem.* 2006 Jun;62(2):71-80.
 31. 趙洪健, 金炳卓. 肥滿症의 原因과 病機 및 治法에 關한 文獻的 考察. 大田大論文集. 1992;1(2):61-71.
 32. 월은용. 單純性肥胖證 治用爲列. 陝西中醫. 12. 1991:5.
 33. 진니후. 單純性肥胖證 中醫研究 10年 概況. 북경. 中醫雜誌 3. 1992:139.
 34. JL. Vanherweghem et al. Association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993;341(8842):387-391.
 35. Vanhaelen M et al. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet* 1994;343(8890):174.
 36. Tsuda T et al. Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(8):1184-1197.
 37. Do MS et al. Inflammatory gene expression patterns revealed by DNA microarray analysis in TNF-alpha-treated SGBS human adipocytes. *Yonsei Med J.* 2006 Oct 31;47(5):729-736.
 38. 김공현 등. 종합건강진단수진자의 비만지수에 따른 검사 소견과의 관련성. 대한보건협회학술지. 1993;19(2):64-78.
 39. 손정민 등. 고콜레스테롤혈증 환자에 대한 영양치료요법의 임상 및 비용 효과 분석. 대한영양사협회학술지. 2003;9(1):32-39.
 40. 변성희, 서부일. 비만 치료 및 예방에 대한 한약의 효능 연구(I)-4종 처방이 비만 흰쥐의 생화학적 변화에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21(1):3-10.