

# GGEx18의 ethyl acetate 분획물에 의한 고지방식이 비만 마우스의 식이효율과 혈중 leptin 농도에 미치는 영향

박기정<sup>1</sup>, 이희영<sup>1</sup>, 이혜림<sup>1</sup>, 윤미정<sup>2</sup>, 박선동<sup>3</sup>, 이용태<sup>4</sup>, 沈志濱<sup>5</sup>, 崔紅花<sup>5</sup>, 신순식<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>동의대학교 한의과대학 방제학교실, <sup>4</sup>생리학교실 및 한의학연구소, <sup>2</sup>목원대학교 바이오건강학부,  
<sup>3</sup>동국대학교 한의과대학 방제학교실, <sup>5</sup>廣東藥學院 中藥學院 中藥化學與分析系

## ABSTRACT

### Ethyl acetate fraction of GGEx18 modulates feeding efficiency ratio and blood leptin level in high fat diet-fed obese mice

Ki-Jeong Park<sup>1</sup>, Hee-Young Lee<sup>1</sup>, Hye-Rim Lee<sup>1</sup>, Mi-Chung Yoon<sup>2</sup>,  
Sun-Dong Park<sup>3</sup>, Yong-Tae Lee<sup>4</sup>, Zhi-Bin Shen<sup>5</sup>, Hong-Hua Cui<sup>5</sup>, Soon-Shik Shin<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dept. of Formula Science and <sup>4</sup>Dept. of Physiology, College of Oriental Medicine  
& Research Institute of Oriental Medicine, Dong-Eui University  
<sup>2</sup>Dept. of Life Sciences, Mok-Won University  
<sup>3</sup>Dept. of Formula Science, College of Oriental Medicine, Dong-Guk University  
<sup>5</sup>Dept. of Chemistry and Analysis of Traditional Chinese Medicine, College of Chinese Materia Medica,  
Guangdong Pharmaceutical University, China

**Objectives** : This study was designed to determine the effects of the GGEx18 ethyl acetate fraction(EF) on body weight gain, feeding efficiency ratio, and obesity-related factors in plasma as well as histology of liver and adipose tissues using high fat diet-fed male C57BL/6N obese mice.

**Methods** : 8 weeks old, high fat diet-fed obese male mice were divided into 5 groups: C57BL/6N

- 
- 교신저자 : 신순식
  - 부산시 부산진구 양정2동 산45-1 동의대학교 한의과대학 방제학교실
  - Tel : 051-850-7414 E-mail : ssshin@deu.ac.kr
  - 접수 : 2011/ 05/ 20 수정 : 2011/ 06/ 02 채택 : 2011/ 06/ 13

normal, control, EF(1), EF(2) and EF(3). After mice were treated with EF for 9 weeks, we measured body weight gain, food intake, feeding efficiency ratio, fat weight, plasma leptin and lipid levels. We also analysed histology of liver and adipose tissues on high fat diet-fed male C57BL/6N obese mice.

**Results :** Compared with control, EF-treated mice had significantly lower body weight gain and feeding efficiency ratio. Consistent with the effects on body weight gain, EF significantly decreased the adipose tissue weight compared with control. Consistent with the effects on feeding efficiency ratio, EF significantly decreased plasma leptin concentrations compared with control. EF reduced the size of adipocytes as well as hepatic lipid accumulation compared with control. EF seems to be safe since not only the plasma levels of ALT and AST are within the normal range, but also EF did not show any toxic effects on organs. EF(3) was most effective among EF(1), EF(2), and EF(3) at doses of 25, 50, and 100 mg/kg, respectively.

**Conclusions :** These results demonstrate that EF effectively reduces body weight gain, feeding efficiency ratio in high fat diet-fed obese mice, leading to the modulation of obesity. In addition, EF decreases the size of adipocytes and improves plasma lipids and controls hepatic lipid accumulation, suggesting that EF may act as a therapeutic agent for obesity.

**Key word :** GGEx18, feeding efficiency ratio, leptin, high fat diet-fed obese mouse, obesity

## 1. 서론

비만의 생리학적 기전은 일반적으로 섭취하는 에너지보다 소비하는 에너지가 부족한 에너지 불균형에 의해서 초래 되며, 하루 500 kcal의 에너지가 남게 되면 한 달에 2 kg의 체중 증가를 보인다고 알려져 있다<sup>1-3)</sup>. 2005년 국민건강영양조사 결과 남자 35.2%, 여자 28.3%, 전체 31.8%가 비만으로 나타나 우리나라의 비만 인구가 점점 증가하고 있고<sup>4)</sup>, 이에 따르는 합병증의 유병률도 증가하고 있는 상태이다. 따라서 비만의 문제를 해결할 수 있

는 한의학적 방안을 모색하는 일은 필요하다고 생각한다.

輕身降脂丸<sup>18</sup>(gyeongshingangjeehwan<sup>18</sup>, GGEx18)은 軟堅散結, 消痰, 利水の 효능이 있는 昆布와 發汗散寒, 宣肺平喘, 利水消腫의 효능이 있는 麻黃 및 瀉熱通腸, 涼血解毒, 逐瘀通經의 효능이 있는 大黃의 세 가지 한약재<sup>5)</sup>로 구성된 한약제제이다. 이 한약제제는 임상에서 비만조절효과가 있는 것으로 알려져 일부 임상 개업가에서 응용되고 있으며, 동물실험과 세포실험에서도 그 비만조절효과가 있음이 보고되었다. 형질전환 비만모델인 ob/ob

마우스와<sup>6)</sup> 고지방식이 비만마우스 모델을<sup>7)</sup> 이용하여 GGEx18은 식욕조절과 지방조직, 간과 골격근에서 PPAR $\alpha$ 의 활성을 촉진함으로써 비만조절효과가 있음이 보고되었고, C2C12 골격근세포에서 PPAR $\alpha$ 와 PPAR $\delta$  reporter 유전자 발현을 촉진하고, 지방산 산화를 촉진하는 효소의 발현을 증가시키며, 에너지 소비를 증가시키는 UCP3 발현을 증가시키고 골격근 세포의 지방축적을 억제함으로써 비만조절효과가 있음도 보고되었다<sup>8)</sup>. 그러나 GGEx18의 분획물에서도 전체 추출물과 유사하게 고지방식이 비만마우스 모델에서 비만조절효과가 있는지를 검증하는 것이 필요하다고 판단되었고, GGEx18의 ethyl acetate 분획물에 대한 비만조절 효과는 아직 보고되어 있지 않아 연구에 착수하게 되었다.

본 연구에서는 8주령의 수컷 C57BL/6N 마우스 고지방식이 비만모델을 이용하여 GGEx18의 ethyl acetate 분획물의 투여가 체중증가량, 식이효율, 혈중 비만조절관련 지표와 독성지표에는 어떤 영향을 주는지, 부검후 간조직과 지방조직의 조직학적인 차이가 어떻게 나타나는지, 실험종료후 부검했을 때 지방무게에는 어떤 차이가 있는 지에 대해서 조사하였다.

## II. 실험재료 및 연구방법

### 1. 실험재료

#### 1) 실험동물

공시동물로서는 KOATECH(Gyeonggi province, South Korea)에서 공급한 8주령의 C57BL/6N 수컷 마우스 40마리를 사용하였다. 각 군 당 8마리를 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 군 분리를 실시하고, 이를 실험에 사용하였다.

사육환경은 온도 21±2 °C, 습도 55±5 %, 환기 횟수 15~17 회/hour, 조도 150~300 lux, 그리고

조명은 12시간 명암(점등: 06:00, 소등: 18:00)으로 조정하여 실험 기간동안 일정하게 SPF(specific pathogen free) 상태로 유지하였다. 고행사료(Harlan, USA)와 물은 자유 급이와 급수를 시켰다.

#### 2) 실험물질

실험물질은 輕身降脂丸(GGEx18)의 EtOAc 분획물(EF)을 사용하였다. 그 제조과정은 다음과 같다(Table 1, 2).

(1) 경신강지환18의 조성약물은 화림제약(Busan, South Korea)에서 구입하고, 동의대학교 한의과대학 방제학교실에서 정선한 뒤 분말하였다.

(2) 분쇄한 GGEx18(1 kg)을 냉각기를 부착한 삼각플라스크에 담고 70% EtOH를 1.5 L 넣은 후 2시간 동안 열추출한다(1.5 L × 6).

(3) 추출액을 여과하고, rotary vacuum evaporator를 사용하여 농축한다.

(4) 70% EtOH 농축액(306.48g)을 H<sub>2</sub>O로 녹이고 분액깔때기에 부은 후, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 넣어 흔든 다음 평형화 시킨다(나머지 70% EtOH 농축액은 보관).

(5) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층(하층)은 모아서 sodium sulfate로 처리한 다음 여과하여 농축하고, EtOAc를 H<sub>2</sub>O층에 넣어 흔든 다음 평형화 시킨다.

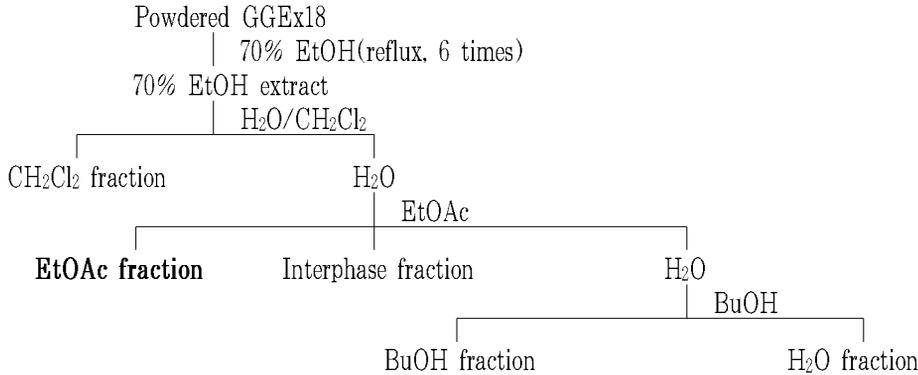
(6) EtOAc층(상층)은 모아서 sodium sulfate로 처리한 다음 여과하여 농축하고, BuOH를 H<sub>2</sub>O층에 넣어 흔든 다음 평형화 시킨다.

(7) BuOH층(상층)과 H<sub>2</sub>O층(하층)을 각각 따로 모아 sodium sulfate로 처리한 다음 여과하고 농축하여 48.71g과 194.4g을 얻었다.

Table 1. The composition of GGEx18

한약명	Ingredient	%
麻 黃	<i>Ephedra sinica Stapf.</i>	40
昆 布	<i>Laminaria japonica Aresch</i>	40
大 黃	<i>Rheum palmatum L.</i>	20
Total amounts		100

Table 2. Ethanol extraction and fractionation of GGEx18



## 3) 실험군 및 투여방법

군당 8마리 수컷을 공시하였으며, EF는 25, 50과 100mg/kg의 용량으로 9주간 사료에 혼합하여 투여하였다(Table 3).

Table 3. Experimental groups

Group	Treatment	Number	Sex
Normal	Low fat	8	male
	High fat(45kcal%) + EF(mg/kg BW)		
Control	0	8	male
EF(1)	25	8	male
EF(2)	50	8	male
EF(3)	100	8	male

## 2. 연구방법

## 1) 체중증가량 측정

EF(1), EF(2)와 EF(3)이 체중증가량에는 어떤 변화를 주는지 알아보기 위하여 매주 2회 9주 동안 체중을 측정하고, 이를 근거로 하여 체중증가량을 계산하였다.

## 2) 식이효율 측정

EF(1), EF(2)와 EF(3)이 식욕과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 체중은 매주 2회, 사료섭취량은 매주 1회 9주 동안 측정하였고, 이를 근거로

하여 식이효율을 계산하였다.

식이효율은 아래의 공식에 대입시켜 최종 체중증가량을 총 사료섭취량으로 나누어 산출하고 통계분석하였다.

식이효율(feeding efficiency ratio: FER%) = 체중증가량(g)/사료섭취량(g)×100<sup>9,10)</sup>

식이효율의 공식에서 의미하는 바와 같이 사료를 섭취하는 양이 많음에도 불구하고 체중의 증가가 적다는 것은 비만조절효과가 있는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 식이효율은 비만을 나타내는 하나의 척도로 사용할 수 있고, 식이효율의 수치가 적을수록 비만조절효과가 있다고 할 수 있다.

## 3) 혈액생화학 분석

혈액 채취는 실험시작 9주 후 12시간 절식한 뒤 diethyl ether로 마취한 다음 개복하여 복대정맥에서 혈액 1ml을 채취하였으며, 고속원심분리기(Micro 12, Hanil, Korea)를 이용하여 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 혈장은 냉동고(-20℃)에 보관하고 혈액생화학분석기(Selectra 2, Vitalab, Netherlands)를 사용하여 asparate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase(ALT), triglyceride (TG), total cholesterol(TC), high density lipoprotein cholesterol(HDL-cholesterol), low density lipoprotein cholesterol(LDL-cholesterol), free fatty acid(FFA), glucose, insulin과 leptin의 혈중 농도를 각각 측정

하였다.

#### 4) 동물 부검

채혈한 뒤에 부검하여 지방조직, 간장, 췌장, 비장, 심장과 신장의 무게를 측정하고, 이들의 크기와 색깔을 관찰하였다.

#### 5) 조직의 형태학적 분석

마우스에서 분리한 조직은 10% phosphate-buffered formalin에서 하루 이상 고정하며 12시간 이상 흐르는 물에서 formalin을 세척한 후 60% ethanol에서 1시간, 70% ethanol에서 1시간, 80% ethanol에서 1시간, 90% ethanol에서 1시간, 95% ethanol에서 1시간, 100% ethanol에서 1시간 씩 단계적으로 탈수시켰다. Xylen에 1시간씩 3번의 투명과정 후 paraffin에 1시간 씩 2번 침투과정을 실시한다. 포매과정(embedding)을 거쳐 약 3  $\mu$ m의 두께로 박절(paraffin-section)하여 slide 위에 조직을 얹고 건조시킨 후 hematoxylin-eosin염색을 하였다. Slide의 물기를 없애고 mounting medium(Sigma, MO, USA)을 떨어뜨린 후 조직과 cover glass 주위에 공기가 생기지 않도록 주의하면서 cover glass를 덮어 영구보존 할 수 있도록 하였다. 조직의 사진 촬영과 지방세포의 수 및 크기분석은 image analysis system(Image Pro-Plus, MD, USA)을 이용하였다.

### 3. 통계분석

모든 값은 mean  $\pm$  standard deviation(SD)으로 표시하며, OriginLab Version 7.5(OriginLab Corporation, MA, USA)의 ANOVA one way를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

## III. 실험 결과

### 1. 체중 변화량

EF(1)은 대조군에 비하여 49일째부터 통계적으로 유의하게 체중증가량이 감소하기 시작하여 마지막 63일째까지 계속되었다( $P<0.001$ ).

EF(2)는 대조군에 비하여 10일째부터 통계적으로 유의하게 체중증가량이 감소하기 시작하여( $P<0.05$ ) 17일째까지 계속되었고, 그 이후 38일째까지 감소 변화가 없다가, 다시 42일째부터 45일째까지 완만하게 감소하였다( $P<0.05$ ). 그 이후 49일째부터 마지막까지는 그 감소량이 더 증가하였다( $P<0.001$ ).

EF(3)은 대조군에 비하여 42일째부터 45일째까지 통계적으로 유의하게 체중증가량이 감소하기 시작하였고( $P<0.01$ ), 그 이후 49일째부터 마지막까지는 그 감소량이 더 증가하였다( $P<0.001$ )(Fig. 1).

이를 백분율로 환산할 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 23.89%, EF(2)는 29.61%, EF(3)은 46.44%의 체중 감량효과가 있는 것으로 나타났으며, 세 농도 중 EF(3)에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다.

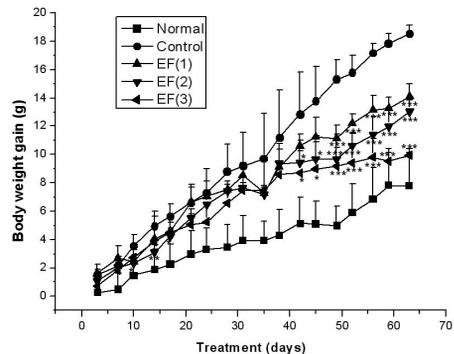


Fig. 1. Changes in body weight gain of high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  significantly different from control. EF = EtOAc fraction of 70% ethanol-extracted GGEx18.

### 2. 식이효율

식이효율은 아래의 공식에 대입시켜 최종 체중증가량을 총 사료섭취량으로 나누어 산출하고 통계처리하였다.

식이효율(feeding efficiency ratio: FER%) = 체중증가량(g)/사료섭취량(g) $\times 100^{(9,10)}$

식이효율의 공식에서 의미하는 바와 같이 사료

를 섭취하는 양이 많음에도 불구하고 체중의 증가가 적다는 것은 비만조절효과가 있는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 식이효율은 비만을 나타내는 하나의 척도로 사용할 수 있고 식이효율의 수치가 적을수록 비만조절효과가 있다고 할 수 있다.

식이효율은 EF(2)와 EF(3)에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났으며, 두 농도 중 EF(3)에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났(P<0.001)(Fig. 2).

이를 백분율로 환산할 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 13.70%, EF(2)는 23.46%, EF(3)은 40.10%의 식이효율이 낮은 것으로 나타났으며, 세 농도 중 EF(3)에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났.

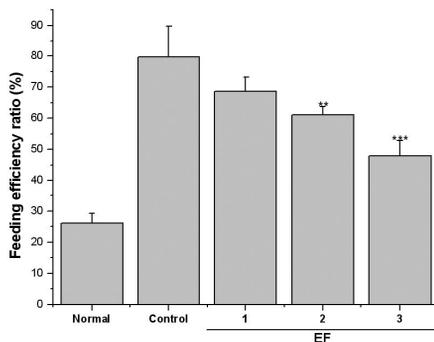


Fig. 2. Reduction of total feeding efficiency ratio in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

### 3. 지방무게

9주 동안 약물을 투여한 뒤에 부검하여 생식기 주변 백색지방조직(epididymal adipose tissue, EAT), 후복벽 주변 백색지방조직(retroperitoneal adipose tissue, RAT), 사타구니 주변 피하지방조직(inguinal adipose tissue, IAT)과 갈색지방조직(brown adipose tissue, BAT)의 무게를 측정하였다. EAT의 무게는 EF(2)와 EF(3)에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 적은 것으로 나타났으며, RAT의

무게는 EF(1), EF(2)와 EF(3) 모두에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 적은 것으로 나타났다. IAT의 무게는 EF(3)에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 적게 나가는 것으로 나타났으며(P<0.01), BAT의 무게는 EF(1), EF(2)와 EF(3) 모두에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 적은 것으로 나타났다(Fig. 3). EAT, RAT, IAT와 BAT의 무게는 EF(1), EF(2)와 EF(3) 중 EF(3)에서 대조군에 비하여 통계적인 유의성의 정도가 더 큰 것으로 나타났다.

이를 백분율로 환산하면, EAT의 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 6.62%, EF(2)는 11.00%, EF(3)은 33.60%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났고, RAT의 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 7.92%, EF(2)는 10.08%, EF(3)은 34.72%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났으며, IAT의 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 6.78%, EF(2)는 1.74%, EF(3)은 28.30%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났으며, BAT의 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 10.66%, EF(2)는 18.98%, EF(3)은 39.66%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났다. 세 농도 중 EF(3)에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다.

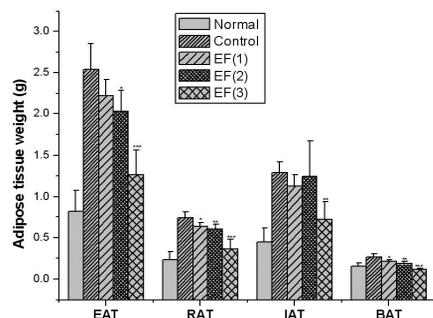


Fig. 3. Adipose tissue weights in high fat diet-fed obese mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD.

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1. EAT = epididymal adipose tissue; RAT = retroperitoneal adipose tissue; IAT = inguinal adipose tissue; BAT = brown adipose tissue.

#### 4. 혈액생화학분석

##### 1) 혈중 aspartate aminotransferase(AST) 측정

실험시작 9주 후 혈장 내 AST의 양을 측정한 결과, 그 값이 EF(1)은 대조군에 비하여 낮게, EF(2)는 높게, EF(3)은 비슷하게 나타났으나 모두 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 4).

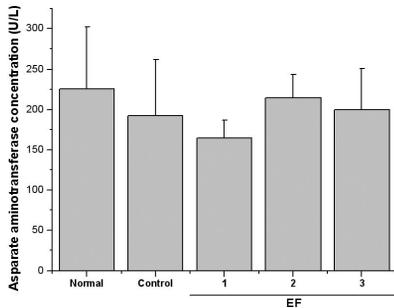


Fig. 4. Fasting plasma AST levels in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. Abbreviations as in Fig. 1. AST = aspartate aminotransferase.

##### 2) 혈중 alanine aminotransferase(ALT) 측정

실험시작 9주 후 혈장 내 ALT의 양을 측정한 결과, 그 값이 EF(1)과 EF(3)은 대조군에 비하여 낮게, EF(2)는 높게 나타났으나 모두 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 5).

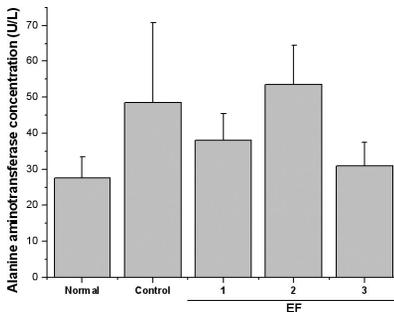


Fig. 5. Fasting plasma ALT levels in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. Abbreviations as in Fig. 1. ALT = alanine aminotransferase.

##### 3) 혈중 HDL-cholesterol 측정

실험시작 9주 후 혈장 내 HDL-cholesterol의 양을 측정한 결과, 그 값이 EF(1)과 EF(3)은 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났다(Fig. 6).

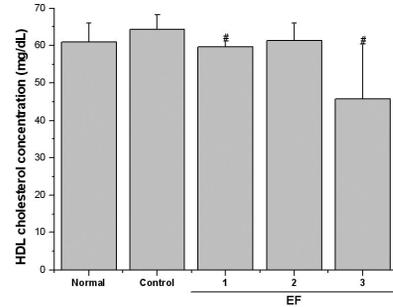


Fig. 6. Fasting plasma HDL-cholesterol levels in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. <sup>#</sup>P<0.05 significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1. HDL = high density lipoprotein.

##### 4) 혈중 LDL-cholesterol 측정

실험시작 9주 후 혈장 내 LDL-cholesterol의 양을 측정한 결과, 그 값이 EF(1), EF(2)와 EF(3)은 모두 대조군에 비하여 낮은 것으로 나타났으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 7).

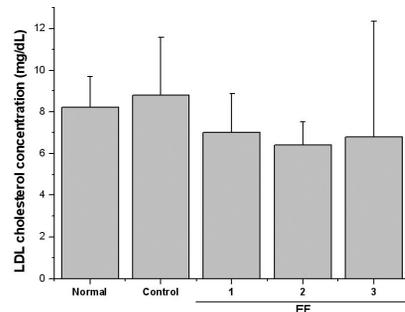


Fig. 7. Fasting plasma LDL-cholesterol levels in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. Abbreviations as in Fig. 1. LDL = low density lipoprotein.

## 5) 혈중 total cholesterol 측정

실험시작 9주 후 혈장 내 total cholesterol의 양을 측정한 결과, 그 값이 EF(1), EF(2)와 EF(3)은 모두 대조군에 비하여 낮은 것으로 나타났으나 EF(3)에서만 통계적인 유의성이 있었다(Fig. 8).

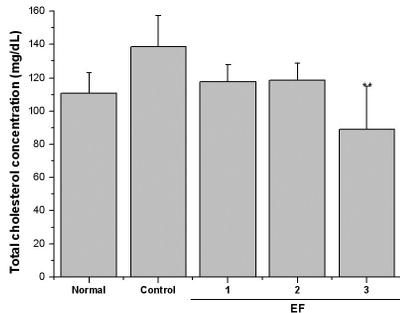


Fig. 8. Fasting plasma total cholesterol levels in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$  significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

## 6) 혈중 triglyceride 측정

실험시작 9주 후 혈장 내 triglyceride의 양을 측정한 결과, 그 값이 EF(1)과 EF(2)는 대조군에 비하여 높았으며 EF(3)은 낮은 것으로 나타났으나 EF(1)에서만 통계적인 유의성이 있었다(Fig. 9).

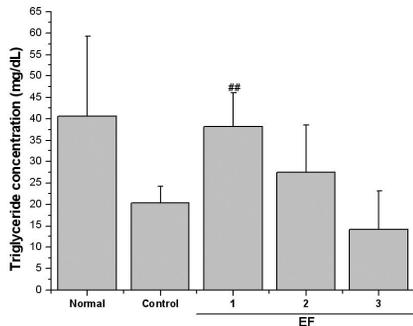


Fig. 9. Fasting plasma triglyceride levels in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. ## $P < 0.01$  significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

## 7) 혈중 free fatty acid 측정

실험시작 9주 후 혈장 내 free fatty acid의 양을 측정한 결과, 그 값이 EF(1), EF(2)와 EF(3)은 모두 대조군에 비하여 높은 것으로 나타났으나 EF(2)에서만 통계적인 유의성이 있었다(Fig. 10).

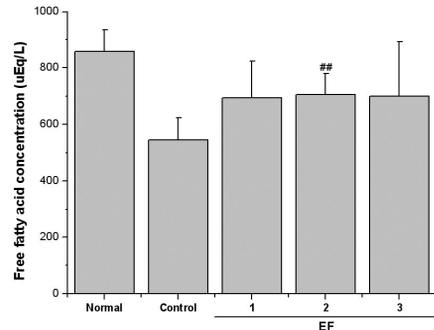


Fig. 10. Fasting plasma free fatty acid levels in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. ## $P < 0.01$  significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

## 8) 혈중 glucose 측정

실험시작 9주 후 혈장 내 glucose의 양을 측정한 결과, 그 값이 EF(1), EF(2)와 EF(3)은 모두 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났으며, 세 농도 중 EF(3)에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다(Fig. 11).

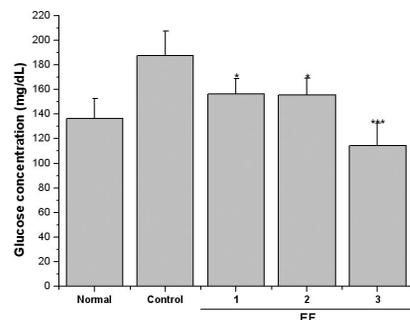


Fig. 11. Fasting plasma glucose levels in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

9) 혈중 insulin 측정

실험시작 9주 후 혈장 내 insulin의 양을 측정한 결과, 그 값이 EF(1), EF(2)와 EF(3)은 모두 대조군에 비하여 낮은 것으로 나타났으나, EF(3)에서만 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다 (Fig. 12).

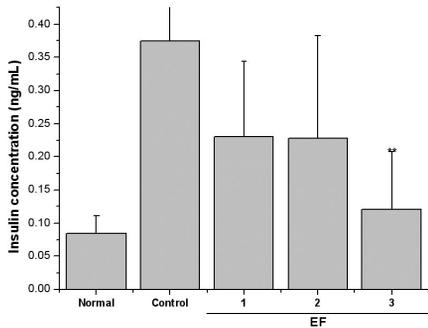


Fig. 12. Fasting plasma insulin levels in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. \*\*P<0.01 significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

10) 혈중 leptin 측정

실험시작 9주 후 혈장 내 leptin의 양을 측정한 결과, 그 값이 EF(1), EF(2)와 EF(3)은 모두 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났으며, 세 농도 중 EF(3)에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다(Fig. 13).

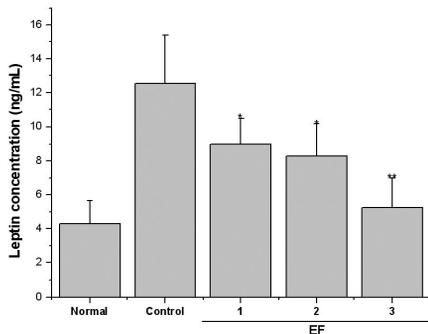


Fig. 13. Fasting plasma leptin levels in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. \*P<0.05, \*\*P<0.01 significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

5. 지방조직 및 간조직의 histology와 morphology 변화

1) 지방조직의 histology와 morphology 변화

대조군과 비교하여 몸무게 및 지방무게의 감소가 가장 큰 EF(3)에서 지방세포의 크기가 20% 감소하였으며 통계적으로 유의하였다(Fig. 14).

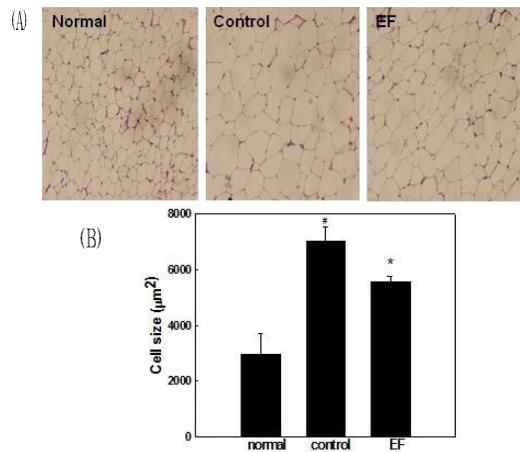


Fig. 14. Histology of epididymal white adipose tissue.

(A) Representative hematoxylin and eosin sections of epididymal adipose tissue(original magnification X 100). (B) Size of epididymal adipocytes. The size of adipocytes in a fixed area(1,000,000  $\mu\text{m}^2$ ) were quantified by an image analysis system. All values are expressed as the mean  $\pm$  SD. #p<0.05 compared with normal group. \*p<0.05 compared with control group.

2) 간조직의 지방축적 변화

대조군과 비교하여 몸무게 및 지방무게의 감소가 가장 큰 EF(3)에서 지방간이 크게 감소하였다(Fig. 15).

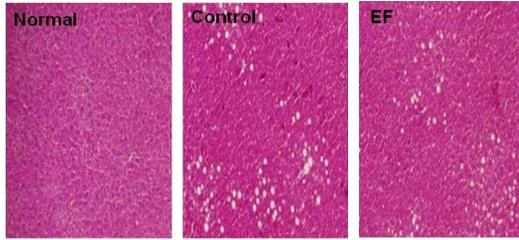


Fig. 15. Inhibition of hepatic lipid accumulation by GGEx18 fraction EF in high fat diet-fed obese mice.

Representative hematoxylin- and eosin-stained sections of livers are shown (original magnification X 100).

## 6. 장기의 무게

실험종료 후 부검시 간장(liver), 심장(heart), 비장(spleen), 신장(kidney), 췌장(pancreas)의 무게를 잰 결과, 간장은 EF(1), EF(2)와 EF(3) 모두에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났으며, 췌장은 EF(1)과 EF(2)에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났다. 심장, 비장과 신장은 EF(1), EF(2)와 EF(3) 모두에서 대조군에 비하여 통계적인 유의성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 16).

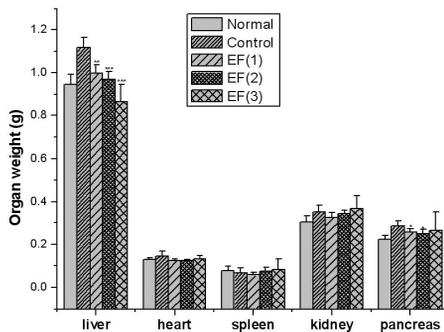


Fig. 16. Organ weights in high fat diet-fed obese mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  significantly different from control. Abbreviations as in Fig. 1.

## IV. 고찰

고지방식이 비만 마우스 모델을 이용하여 GGEx18의 ethyl acetate 분획물(EF)의 투여가 체중증가량, 식이효율과 체지방의 변화에 어떤 영향을 미치는 지에 대해서 알아보았다.

체중증가량의 경우, EF(1)은 대조군에 비하여 49일째부터 통계적으로 유의하게 체중증가량이 감소하기 시작하여 마지막 63일째까지 계속되었다( $P < 0.001$ ). EF(2)는 대조군에 비하여 10일째부터 통계적으로 유의하게 체중증가량이 감소하기 시작하여( $P < 0.05$ ) 17일째까지 계속되었고, 그 이후 38일째까지 감소 변화가 없다가, 다시 42일째부터 45일째까지 완만하게 감소하였다( $P < 0.05$ ). 그 이후 49일째부터 마지막까지는 그 감소량이 더 증가하였다( $P < 0.001$ ). EF(3)은 대조군에 비하여 42일째부터 45일째까지 통계적으로 유의하게 체중증가량이 감소하기 시작하였고( $P < 0.01$ ), 그 이후 49일째부터 마지막까지는 그 감소량이 더 증가하였다( $P < 0.001$ ). 이를 백분율로 환산할 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 23.89%, EF(2)는 29.61%, EF(3)은 46.44%의 체중 감량효과가 있는 것으로 나타났으며, 체중증가량의 감소폭은 세 농도 중 EF(3)에서 더 현저하였다.

식이효율은 EF(2)와 EF(3)에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났으며, 두 농도 중 EF(3)에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다( $P < 0.001$ ). 이를 백분율로 환산할 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 13.70%, EF(2)는 23.46%, EF(3)은 40.10%의 식이효율이 낮은 것으로 나타났으며, 세 농도 중 EF(3)에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다. 사료를 섭취하는 양이 많음에도 불구하고 체중의 증가가 작다는 것은 비만조절효과가 있는 것으로 생각할 수 있기 때문에 식이효율은 비만을 나타내는 하나의 척도로 사용할 수 있고, 식이효율의 수치가 작을수록 비만조절효과

가 더 있다고 할 수 있다. 따라서 EF의 처리가 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 식이효율은 낮고 체중증가량은 감소하는 것으로 보아 EF는 식이조절을 통하여 체중감량효과를 나타내는 것으로 생각된다.

지방무게의 경우, 9주 동안 EF를 투여한 뒤에 부검하여 생식기 주변 백색지방조직, 후복벽 주변 백색지방조직, 사타구니 주변 피하지방조직과 갈색지방조직의 무게를 측정하였다. EAT의 무게는 EF(2)와 EF(3)에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 적은 것으로 나타났으며, RAT의 무게는 EF(1), EF(2)와 EF(3) 모두에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 적은 것으로 나타났다. IAT의 무게는 EF(3)에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 적게 나가는 것으로 나타났으며 ( $P<0.01$ ), BAT의 무게는 EF(1), EF(2)와 EF(3) 모두에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 적은 것으로 나타났다. EAT, RAT, IAT와 BAT의 무게는 EF(1), EF(2)와 EF(3) 중 EF(3)에서 대조군에 비하여 통계적인 유의성의 정도가 더 큰 것으로 나타났다. 이를 백분율로 환산하면, EAT의 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 6.62%, EF(2)는 11.00%, EF(3)은 33.60%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났고, RAT의 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 7.92%, EF(2)는 10.08%, EF(3)은 34.72%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났으며, IAT의 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 6.78%, EF(2)는 1.74%, EF(3)은 28.30%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났으며, BAT의 경우, 대조군에 비하여 EF(1)은 10.66%, EF(2)는 18.98%, EF(3)은 39.66%로 그 무게가 감소되어 있는 것으로 나타났다. 세 농도 중 EF(3)에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다. 따라서 체중증가량의 감소와 일치하게 지방조직무게의 감소가 있음을 알 수 있다.

EF의 처리가 혈중 간장독성지표인 AST와 ALT, 체중조절과 관련된 지표인 triglyceride, total cholesterol,

HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, free fatty acid, glucose, insulin과 leptin의 농도를 조사하였다. 왜냐하면 이들 EF 처리의 비만조절효과가 약리작용에 의한 경우도 있지만 이의 독성으로도 생길 수 있기 때문이다.

AST와 ALT의 값은 생리적인 범위 안에 있고, AST의 경우 EF(1)은 대조군에 비하여 낮게, EF(2)는 높게, EF(3)은 비슷하게 나타났으나 모두 통계적으로 유의한 차이는 없었다. ALT의 경우 EF(1)과 EF(3)은 대조군에 비하여 낮게, EF(2)는 높게 나타났으나 모두 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

실험종료 후 부검 시 간장, 심장, 비장, 신장과 췌장의 무게를 잰 결과, 간장은 EF(1), EF(2)와 EF(3) 모두에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났으며, 췌장은 EF(1)과 EF(2)에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났다. 심장, 비장과 신장은 EF(1), EF(2)와 EF(3) 모두에서 대조군에 비하여 통계적인 유의성이 없는 것으로 나타났다.

따라서 EF는 간장독성으로부터는 안전한 것으로 판단된다. 다만, 보다 더 안전성을 확보하려면 단회투여와 반복투여의 독성시험과 같은 안전성 검증이 추가로 요구된다.

EF(1)은 대조군에 비하여 혈중 triglyceride와 free fatty acid의 농도 값은 높게 나타났고, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, total cholesterol, glucose, insulin과 leptin의 농도 값은 낮게 나타났으나 HDL-cholesterol, triglyceride, glucose와 leptin에서 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났다. EF(2)는 대조군에 비하여 혈중 triglyceride, free fatty acid의 농도 값은 높게 나타났고, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, total cholesterol, glucose, insulin과 leptin의 농도 값은 낮게 나타났으나 free fatty acid, glucose와 leptin에서 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났다. EF(3)은 대조군에 비하여 혈중 free fatty acid의 농도 값은 높게 나타났고, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, total cholesterol,

triglyceride, glucose, insulin과 leptin의 농도 값은 낮게 나타났으나 total cholesterol, glucose, insulin과 leptin에서 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났다. 따라서 체중감량효과와 일치하게 지질 대사와 관련된 혈중 비만지표는 EF(1), EF(2)와 EF(3)에 모두 반영되어 있으나 EF(3)에서 더 현저하였다. EF(1), EF(2)와 EF(3)에서 식이효율이 낮은 것과 일치하게 혈중 glucose, insulin과 leptin의 농도 값이 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났으며, 특히 EF(3)에서 더 뚜렷하게 나타났다는 것은 체중감량효과가 식이조절에 의하여 이루어지고 있음을 시사한다.

GGE<sub>x</sub>18 분획물 EF가 지방세포와 간세포의 조직학적, 형태학적 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 지방조직과 간조직을 hematoxylin-eosin 염색법으로 염색한 후 현미경 및 image analysis system으로 관찰하였다. 지방세포의 크기와 지방간의 축적은 저지방식이 정상마우스 그룹에 비하여 고지방식이 비만마우스 그룹에서 증가하였다. 몸무게 및 지방무게의 감소가 가장 큰 EF(3)에서 대조군과 비교하여 지방세포의 크기는 통계적으로 유의하게 20% 감소하였고, 지방간은 크게 감소하였다. 이와 같은 결과로 보아 GGE<sub>x</sub>18 분획물 EF는 지방세포의 크기를 줄임으로써 지방무게 및 몸무게를 조절하는 것은 물론이고 지방간을 개선하는 데에도 일조를 할 것으로 생각된다.

따라서 GGE<sub>x</sub>18 분획물 EF는 식욕억제, 혈중 지질대사 개선, 지방세포의 크기 감소와 지방간의 억제를 통하여 체중감량효과가 나타나는 것으로 추정되고, 이의 세부적인 작용기전은 분자생물학적인 분석을 통해 검증되어야 한다.

## V. 결 론

수컷 마우스 C57BL/6N의 고지방식이 비만모델을 이용하여 GGE<sub>x</sub>18 ethyl acetate 분획물(EF)의

투여에 의한 체중증가량, 식이효율, 혈중 비만관련 지표의 변화를 측정하고, 그리고 지방조직 및 간조직의 조직학과 형태학적 변화를 관찰하여 다음의 결론을 얻었다.

1. EF는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 체중증가량은 감소하였고, 식이효율은 낮은 것으로 나타났다.
2. EF는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 지방조직의 무게는 체중증가량의 감소와 일치하게 적게 나가는 것으로 나타났다.
3. EF는 대조군에 비하여 식이효율이 낮은 것과 일치하게 혈중 leptin 농도값이 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났다.
4. EF는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 지방세포의 크기는 감소되었고, 간의 지방축적은 감소하였다.
5. EF는 혈중 AST와 ALT의 농도값이 생리적인 범위안에 있고 장기는 이상이 없는 것으로 나타나 독성으로부터 안전한 것으로 생각된다.
6. 위의 결과들은 25, 50과 100mg/kg의 농도로 각각 표시되는 EF(1), EF(2)와 EF(3) 중에서 EF(3)에서 가장 현저하였다.

결론적으로 GGE<sub>x</sub>18 ethyl acetate 분획물 EF는 식욕억제, 혈중 지질대사 개선, 지방세포의 크기 감소와 지방간의 억제를 통하여 체중감량효과가 나타나는 것으로 추정되고, 이의 세부적인 작용기전은 분자생물학적인 분석을 통해 검증되어야 한다.

## 감사의 글

이 논문은 2011학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(2011AA123).

## 참고문헌

1. Speakman JR, Selman C. Physical activity and resting metabolic rate. *Proc Nutr Soc.* 2003; 62(3):621-34.
2. Kim DK, Park HW. Relationship between resting metabolic rate and VO<sub>2</sub> max in obese women. *J Kor Sports Med.* 2005;23(2):131-6.
3. Park HS. Pathophysiology of obesity and energy control for obesity treatment. *J Korean Acad Fam Med.* 2000;22(8):1287-95.
4. Korean Ministry of Health and Welfare. The Third Korea National Health and Nutrition Examination Survey. 2005.
5. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 『본초학』. 초판 발행. 서울:영림사. 2004:154-6, 285-7, 510-1.
- 6.尹琦現. Ob/Ob 마우스에서 GGEx18의 비만 조절 지방산 산화효소 유전자 발현 촉진. 東義大學校大學院. 韓醫學博士學位論文. 2009:12-65.
- 7.楊裕仁. 고지방식이 비만마우스에서 GGEx18이 체중감량과 PPAR alpha 표적유전자 발현에 미치는 영향. 東義大學校大學院. 韓醫學博士學位論文. 2009:8-50.
- 8.車昌敏. C2C12 골격근세포에서 GGEx18에 의한 지방산  $\beta$ -산화효소 유전자발현의 조절. 東義大學校大學院. 韓醫學碩士學位論文. 2009:9-21.
9. 오창호. 『비만억제자인  $\alpha$ -MSH 유사체의 합성 및 약효분석』(신약개발연구개발사업 최종보고서). 서울:보건복지부. 2003:21.
10. Garrido-Polonio C, Garcia-Linares MC, Garcia-Arias MT, Lopez-Varela S, Garcia-Fernandez MC, Terpstra AH, Sanchez-Muniz FJ.. Thermally oxidised sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. *Br J Nutr.* 2004. Aug; 92(2):257-65.