

輕身降脂丸18의 분자생물학적인 비만조절 기전에 관한 연구

이희영¹, 윤기현¹, 서부일⁴, 박규열⁴, 윤미정², 沈志濱³, 崔紅花³, 신순식^{1*}

- 1 : 동의대학교 한의과대학 및 한의학연구소 방제학교실,
2 : 목원대학교 바이오건강학부,
3 : 中國 廣東藥學院 中藥學院 中藥化學與分析系,
4 : 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실

Molecular biologic mechanism of obesity by GGEx18

Hee-Young Lee¹, Ki-Hyeon Yoon¹, Bu-Il Seo⁴, Gyu-Ryeol Park⁴, Mi-Chung Yoon²,
Zhi-Bin Shen³, Hong-Hua Cui³, Soon-Shik Shin^{1*}

- 1 : Dept. of Formula Science, College of Oriental Medicine
and Research Institute of Oriental Medicine, Dongeui University,
2 : Dept. of Life Sciences, Mokwon University, Korea,
3 : Dept. of Chemistry and Analysis of Traditional Chinese Medicine,
College of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, China,
4 : Department of Oriental Herbology, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : This study was undertaken to verify the modulation mechanism of Gyeongshingangjeehwan18 (GGEx18) in ob/ob male mice.

Methods : Eight-week old mice (wild-type C57BL/6J and ob/ob) were used for all experiments. Wild-type C57BL/6J mice were used as lean control and obese ob/ob mice were randomly divided into 5 groups : obese control, GGEx15 (*Ephedra sinica Stapf* + *Rheum palmatum L.*), GGEx16 (*Ephedra sinica Stapf* + *Laminaria japonica Aresch*), GGEx17 (*Rheum palmatum L.* + *Laminaria japonica Aresch*), and GGEx18 (*Ephedra sinica Stapf* + *Laminaria japonica Aresch* + *Rheum palmatum L.*). After mice were treated with several kinds of GGEx for 11 weeks, the mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes and uncoupling protein (UCP) were measured. In addition, PPAR α and PPAR β transactivation was examined in NMu2Li hepatocytes, C2C12 myocytes, and 3T3-L1 preadipocytes using transient transfection assays.

Results : 1. Hepatic PPAR α target genes, such as ACOX and VLCAD mRNA levels were significantly increased by GGEx18 compared with obese controls. In skeletal muscle, LCAD mRNA expression was stimulated by GGEx16, GGEx17, and GGEx18, whereas MCAD mRNA expression by GGEx17 and GGEx18. PPAR β target LPL mRNA levels were also increased by GGEx16, GGEx17, and GGEx18 in skeletal muscle, but adipose LPL mRNA levels were decreased. In addition, GGEx18 upregulated UCP mRNA expression in skeletal muscle. 2. PPAR α reporter gene expression was increased by GGEx18 in NMu2Li cells compared with vehicle. PPAR α and PPAR β reporter activities were also increased by all GGEx treatments in C2C12 and 3T3-L1 cells.

Conclusions : These results suggest that GGEx can act as PPAR α and PPAR β activators, and that GGEx may regulate obesity by stimulating PPAR α , PPAR β , and UCP activity. Of the 4 compositions, GGEx18 seems to be most effective in improving obesity and lipid disorders.

Key Words : Ob/Ob mouse, Gyeongshingangjeehwan18 (GGEx18), PPAR α , PPAR β , obesity

*교신저자 : 신순식. 동의대학교. 방제학교실.
· Tel : 051-850-7414, · E-mail : ssshin@deu.ac.kr,
· 접수 : 2011년 2월 1일 · 수정 : 2011년 3월 5일 · 채택 : 2011년 3월 10일

서론

에너지대사의 불균형으로 에너지 섭취가 에너지 소비보다 클 때 비만 질환은 발생하며, 비만은 체형의 변화를 가져와서 미용에 부담을 줄 뿐만아니라, 고혈압, 당뇨, 심혈관 질환, 암 등을 유발함으로써 인간의 건강을 위협하고 있다¹⁾.

한의학에서는 비만의 원인을 濕, 痰, 瘀血, 氣滯 등의 원인으로 발생한다고 인식하여, 식욕억제와 행동요법을 시행하는 외에도, 주로 약물요법으로 行氣血, 祛痰, 活血祛瘀 등의 치료법을 실시하여 임상에 활용하고 있다. 輕身降脂丸은 한방 임상에서 비만 치료로 활용되고 있는 처방으로, 발한과 이뇨, 진해거담의 효능을 가지고 있는 麻黃, 혈중지질대사 개선작용, 고지혈증을 치료하고 清熱化痰하는 효능을 지니고 있는 昆布, 活血去瘀하고 通便하며 고지혈증에 효과가 있는 大黃으로 이루어져 있으며, 이미 ob/ob 마우스에서 우수한 비만조절효과가 있는 것으로 밝혀졌다²⁾.

따라서, 이번 연구에서는 輕身降脂丸의 비만조절 작용이 어떠한 작용기전을 통하여 발휘되는지를 밝혀 보고자, *in vitro*와 *in vivo*에서 대사조절과 관련된 peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)와 에너지 소모와 관련된 uncoupling protein (UCP)의 분자생물학적 분석을 실시하여, 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 하였다.

실험재료 및 연구방법

1. 실험재료

1) 실험동물

공시동물로서는 중앙실험동물 (Seoul, South Korea)에서 공급한 8주령의 C57BL/6J mouse (lean control) 수컷 5마리, ob/ob mouse 수컷 25마리를 사용하였다. 각 군 당 5마리를 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 기간 동안 일정하게 SPF (specific pathogen free) 상태로 유지하였다. 고행사료 (Harlan, USA)와 물은 자유 급이와 급수를 시켰다.

2) 실험약물

실험물질은 麻黃 + 大黃 (GGE_x15), 麻黃 + 昆布 (GGE_x16), 大黃 + 昆布 (GGE_x17)와 麻黃 + 昆布 + 大黃 (GGE_x18)을 사용하였고, 대조물질은 autoclaved water (멸균수)를 사용하였다. 麻黃, 昆布와 大黃은 화림 제약 (Busan, South Korea)에서 구입하고, 동의대학교 한의과대학 방제학 교실에서 정선한 뒤 분말하여 사용하였다. GGE_x15, GGE_x16, GGE_x17과 GGE_x18은 Table 1에 제시한 배합비율에 맞추어 혼합한 뒤 각 500 g을 만들어 증류수 5,000 cc를 붓고 95°C에서 22시간 동안 추출한 뒤에 이를 여과한 후 Ilshin Programmable Freeze Dryer (Ilshin Lab Co., Ltd., South Korea)를 이용하여 동결 건조하였다. GGE_x15

의 수율은 19.1%, GGE_x16의 수율은 17.4%, GGE_x17의 수율은 23.4%, GGE_x18의 수율은 24.2%를 각각 얻었다 (Table 1).

Table 1. The composition of GGE_x

GGE _x	한약명	Ingredient	Ratio (%)	Yield (%)
GGE _x 15	麻黃	<i>Ephedra sinica</i> Stapf.	40	19.1
	大黃	<i>Rheum palmatum</i> L.	60	
GGE _x 16	麻黃	<i>Ephedra sinica</i> Stapf.	40	17.4
	昆布	<i>Laminaria japonica</i> Aresch	60	
GGE _x 17	大黃	<i>Rheum palmatum</i> L.	40	23.4
	昆布	<i>Laminaria japonica</i> Aresch	60	
	麻黃	<i>Ephedra sinica</i> Stapf.	40	
GGE _x 18	昆布	<i>Laminaria japonica</i> Aresch	40	24.2
	大黃	<i>Rheum palmatum</i> L.	20	

3) 실험군 및 투여방법

군당 5마리 수컷을 공시하였으며, GGE_x15, GGE_x16, GGE_x17과 GGE_x18은 각각 1200mg/kg의 용량으로 11주간 사료에 혼합하여 투여하였다 (Table 2).

Table 2. Experimental groups

Group	Number	Sex	
Lean control	5	male	
Ob/Ob	control	5	male
	GGE _x 15	5	male
obese mice	GGE _x 16	5	male
	GGE _x 17	5	male
	GGE _x 18	5	male

2. 연구방법

1) Target gene 발현분석

a. Total RNA 분리

Total RNA는 Trizol (Invitrogen, USA)을 사용하여 간, 지방과 근육조직으로부터 추출하며, 간단히 설명하면 다음과 같다. Total RNA를 추출하기 위해서 Trizol 1 ml에 조직 100 mg을 넣고 homogenizer를 이용하여 20초 동안 조직을 갈며, 균질화된 용액을 상온에서 5분간 방치하였다. 여기에 chloroform (Sigma, USA) 200 μ l를 첨가한 후에 chloroform이 전체적으로 잘 섞이도록 15초 동안 혼합하며, 상온에서 3분간 방치한 후 원심분리 (13,000 rpm, 4°C, 15분) 하였다. 원심분리 된 용액에서 맑은 상층액만을 새로운 튜브에 분리하고 여기에 동량의 isopropanol (Sigma, USA)을 첨가하여 상온에서 10분간 방치한 후 원심분리 (13,000 rpm, 4°C, 10분) 하였다. 원심분리로 튜브 바닥에 형성된 RNA pellet에 70% ethanol 1 ml를 첨가하여 2회 세척하였으며 (4,500 rpm, 4°C, 5분), RNA pellet이 완전히 건조되면 0.01% DEPC로 처리된 증류수를 150 μ l 첨가하여 RNA pellet을 용해시켰다.

b. cDNA 준비

이 연구에 사용된 cDNA는 다음과 같다 (Table 3).

Table 3. cDNA used for Northern blot analysis

cDNA	Enzyme	Size of cDNA probe (bp)
ACOX	XbaI/XhoI	1037
Thiolase	XbaI/XhoI	1017
VLCAD	EcoRI	559
LCAD	EcoRI	526
SCAD	EcoRI	2000
MCAD	PstI	2100
LPL	EcoRI	1450
aP2	NotI	500
UCP2	EcoRI	239
UCP3	EcoRI	504
β -actin	pUC18	1150

c. Northern hybridization

분리된 RNA 10 μ g을 0.22 M formaldehyde-1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 gel blotter를 이용한 down-load capillary 방법에 의해 20 X SSC (3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate · 2H₂O, pH 7.0)에 적신 Nytran membrane (Schleicher & Schuell, Germany)으로 RNA를 이동시켰다. Membrane에 이동된 RNA는 UV-crosslinker (1.5 J/cm², 4분)를 사용하여 membrane에 고정시킨 후 비특이결합을 막기 위해 prehybridization용액과 반응시켰다. Membrane과 여러 종류의 cDNA probe를 Northern hybridization 시키며, SSC용액으로 세척하였다. Probe가 결합된 membrane을 phosphorImager screen에 노출시키고, Molecular Dynamic Storm 860 PhosphorImager System (Molecular Dynamics, USA)을 사용하여 image를 영상화 하였다. 이 실험에 사용된 cDNA probe들은 Ready-to-Go DNA Labeling kit (Amersham-Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 random-primer 방식으로 ³²P를 표지하였으며, mRNA signal의 강도는 ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics, USA)를 사용하여 측정하였다.

d. Reverse transcription-polymerase chain reaction

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 mRNA의 양을 측정하였다. Complementary DNA는 total RNA 2 μ g과 reverse primer 0.5 μ g을 혼합하여 최종 양 14 μ l를 준비하여 75°C에서 15분 동안 열처리 (heating)한 후, 5분 동안 얼음 속에 보관하였다. 여기에 5X M-MLV reaction buffer, 10 mM dNTP mixture, 200 units M-MLV RT (Promega, USA)를 첨가하여 최종 양이 25 μ l가 되게 한 후, 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. RT reaction 5 μ l에 10X reaction buffer (Mg²⁺ 포함), 10mM dNTP, 5 unites Taq polymerase (Solgent, Korea), 그리고 10 μ M primer를 첨가하여 최종 50 μ l가 되게 한 후, PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, USA)를 이용하여 PCR을 실시하였다. Table 4는 RT-PCR에 사용된 primer와 product size 이다.

Table 4. PCR primers and conditions used for RT-PCR

probe	Species	Sequences	AT (°C)	PCR product (bp)
UCP1	Rat	F : 5'-gtccgccttcagatccaaggtg-3'	58	777
		R : 5'-catcagctctttctcagct-3'		
UCP2	Rat	F : 5'-ctgagctgtgacctatgac-3'	58	310
		R : 5'-caagctgctcaatagtgac-3'		
UCP3	Mouse	F : 5'-ccatcctgactatggtgogcaca-3'	58	504
		R : 5'-ctgtggcacagaagccagctcc-3'		
β -actin	Rat	F : 5'-tggatcctgtggatccatgaaac-3'	58	350
		R : 5'-taaaacgcagctcagtaacagctcg-3'		

AT, Annealing temperature

2) Reporter gene 발현분석

a. Cell culture

간세포주인 NMu2Li 세포, 골격근세포주인 C2C12 세포와 지방전구세포주인 3T3-L1 세포를 사용하였다 (Table 5). 모든 세포주는 10% fetal bovine serum (Gibco-Brl, USA), penicillin G (100U ml⁻¹), streptomycin sulfate (100 μ g ml⁻¹), amphotericin B (0.25 μ gml⁻¹), 그리고 2-mercaptoethanol (50 μ m)이 포함되어 있는 DMEM 배지에서 배양하며, 37°C 온도와 5% CO₂가 공급되는 습윤한 조건을 유지시킨 후, transfection 24 시간 전에 6-well tissue culture plate에 well 당 2.7 X 10⁵개의 세포수로 seeding 하였다.

Table 5. Cell lines used for transient transfection assays

Name	Species	Source/Application	Morphology	Growth Mode
NMu2Li	mouse	liver	epithelial	adherent
C2C12	mouse	muscle	fibroblast	adherent
3T3-L1	mouse	embryo	fibroblast	adherent

b. Transient transfection assay

모든 transfection의 경우 well 당 각각 200 ng의 plasmid가 사용되고, lipofectamine (Life technologies, USA)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 transfection하였다. 반응 6시간 후 신선한 배지 (1ml)를 첨가하고, 해당 화학물인 GGE_x를 처리하며, 처리한지 24시간 후 배지를 제거하고 배양한 세포를 수확하였다.

Luciferase와 β -galactosidase 활성은 kit (Promega, USA)를 사용하여 제조사의 지시에 따라서 측정하며, 간략히 설명하면 다음과 같다. β -galactosidase와 luciferase 분석에 사용되는 시약들은 냉동실에서 꺼내어 녹인 후 내용물이 잘 섞이도록 흔들어 사용하였다. 6-well의 세포들은 배지를 제거한 후 PBS를 이용해서 2회 세척하며, 각각의 plate에 1 X reporter lysis buffer (300 μ l)를 넣고 상온에서 15분간 방치해서 세포를 용해시켰다. 세포가 완전히 용해되면 plate로부터 세포들을 모으며, 완전히 용해된 세포를 원심분리 (12,000 rpm, 4°C, 5분)하여 용해성 단백질을 포함한 상층액을 분리하였다. Luciferase 활성은 luciferase assay system을 이용하여 분석하며, luciferase를 포함한 상등액 (20 μ l)과 substrate (30 μ l)를 혼합하여 luminometer로 측정하였다. Luciferase 활성을 보정하기 위해 β -galactosidase 활성을 조사하였다 (Promega's β -galactosidase enzyme assay system). 96 well plate에 분리된 상층액과 2 X assay buffer를 20 μ l씩 동량으로 분주하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 반응색이 노랗게 변하면 1 M sodium carbonate (50 μ l)를 넣고 반응을 정지시켜 spectrophotometer (405 nm)로 흡광도를 측정하였다.

3) 통계분석

모든 값은 mean ± standard deviation (SD)으로 표시하며, OriginLab Version 7.5 (OriginLab Corporation, MA, USA)의 ANOVA one way, SigmaPlot 2001 (SPSS, USA)의 unpaired, student's t-test를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

실험결과

1. GGEx 비만 조절의 in vivo 분자생물학적 분석

1) GGEx에 의한 간의 PPAR α 표적유전자 발현

GGEx에 의한 비만억제 효과가 간의 PPAR α 표적유전자의 발현 때문인지를 알아보기 위하여 PPAR α 의 표적으로서 peroxisome에서 지방산의 β -산화에 관여하는 효소인 acyl-CoA oxidase (ACOX)와 3-ketoacyl-CoA thiolase (thiolase)와 간의 mitochondria에서 작용하는 very long chain (VLCAD), long chain (LCAD), medium chain (MCAD)와 short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) mRNA 수준을 측정하였다. ob/ob 대조군과 비교하여 GGEx18 처리에 의한 간의 ACOX mRNA 발현 ($p < 0.05$)과 VLCAD mRNA 수준 ($p < 0.01$)이 통계적으로 유의하게 증가하였다 (Figs. 1 and 2).

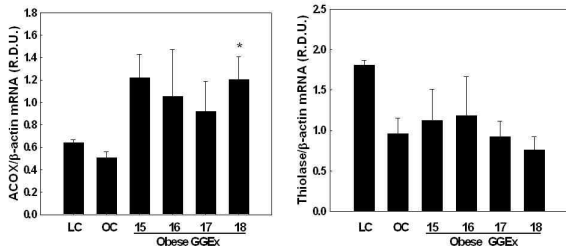


Fig. 1. Modulation of liver peroxisomal PPAR α target gene expression by GGEx in ob/ob mice. Wild-type C57BL/6J and ob/ob mice received a chow diet or the same chow diet supplemented with GGEx for 11 weeks. RNA was extracted from the liver, and mRNA levels of peroxisomal PPAR α target enzymes and β -actin were measured as described in Materials and Methods. All values are expressed as mean \pm SD of R.D.U. (relative density units) using β -actin as a reference. * $p < 0.05$ significantly different from obese control group. LC, lean control ; OC, obese control.

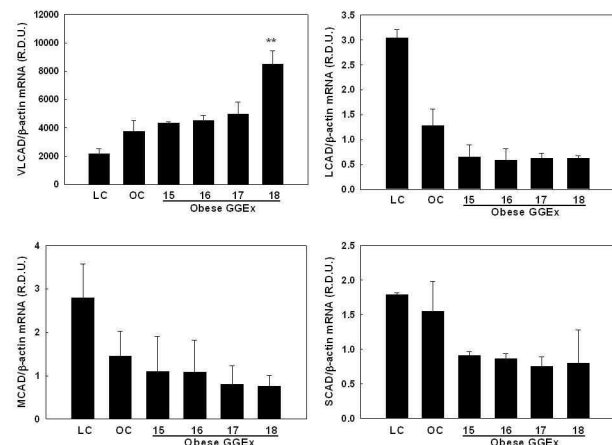


Fig. 2. Modulation of liver mitochondrial PPAR α target gene expression by GGEx in ob/ob mice. Wild-type C57BL/6 and ob/ob mice received a chow diet or the same chow diet supplemented with GGEx for 11 weeks. RNA was extracted from the liver, and mRNA levels of mitochondrial PPAR α target enzymes and β -actin were measured as described in Materials and Methods. All values are expressed as mean \pm SD of R.D.U. (relative density units) using β -actin as a reference. * $p < 0.05$ significantly different from obese control group. LC, lean control ; OC, obese control.

Fig. 2. Modulation of liver mitochondrial PPAR α target gene expression by GGEx in ob/ob mice. Wild-type C57BL/6 and ob/ob mice received a chow diet or the same chow diet supplemented with GGEx or reductil for 11 weeks. RNA was extracted from the liver, and mRNA levels of mitochondrial PPAR α target enzymes and β -actin were measured as described in Materials and Methods. All values are expressed as mean \pm SD of R.D.U. (relative density units) using β -actin as a reference. * $p < 0.01$ significantly different from obese control group. LC, lean control ; OC, obese control.

2) GGEx에 의한 골격근의 PPAR α 와 PPAR β 표적 유전자 발현

GGEx가 골격근에서 지방산 산화와 triglyceride metabolism에 관련된 PPAR α 와 PPAR β 의 작용을 조절함으로써 비만을 억제하는지 조사하고자 이들 표적유전자의 발현을 조사하였다. 미토콘드리아에서 fatty acid- β oxidation을 촉진하는 PPAR α 의 표적유전자인 LCAD mRNA의 경우 GGEx16, GGEx17과 GGEx18 처리에 의해, MCAD mRNA 발현은 GGEx17과 GGEx18에 의하여 통계적으로 유의하게 증가되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 3). PPAR β 의 표적유전자인 lipoprotein lipase (LPL) mRNA 농도 역시 GGEx16, GGEx17, GGEx18에 의하여 크게 증가되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 4).

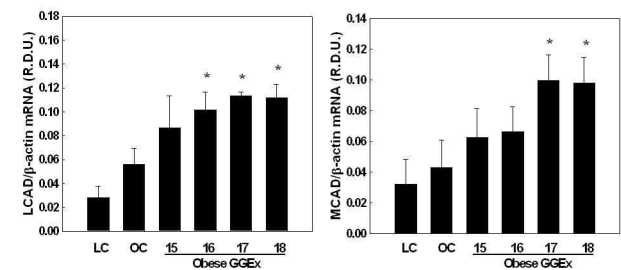


Fig. 3. Modulation of muscle mitochondrial PPAR α target gene expression by GGEx in ob/ob mice. Wild-type C57BL/6J and ob/ob mice received a chow diet or the same chow diet supplemented with GGEx for 11 weeks. RNA was extracted from the muscle, and mRNA levels of mitochondrial PPAR α target enzymes and β -actin were measured as described in Materials and Methods. All values are expressed as mean \pm SD of R.D.U. (relative density units) using β -actin as a reference. * $p < 0.05$ significantly different from obese control group. LC, lean control ; OC, obese control.

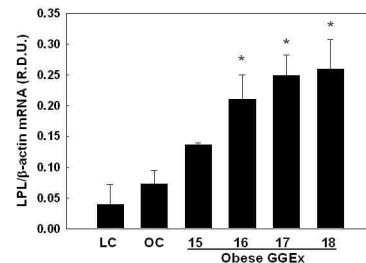


Fig. 4. Modulation of muscle PPAR β target gene expression by GGEx in ob/ob mice. Wild-type C57BL/6 and ob/ob mice received a chow diet or the same chow diet supplemented with GGEx for 11 weeks. RNA was extracted from the muscle, and mRNA levels of LPL (lipoprotein lipase) and β -actin were measured as described in Materials and Methods. All values are expressed as mean \pm SD of R.D.U. (relative density units) using β -actin as a reference. * $p < 0.05$ significantly different from obese control group. LC, lean control ; OC, obese control.

3) GGE α 에 의한 지방조직의 PPAR γ 표적유전자 발현 지방전구세포 (preadipocyte)는 지방세포 (adipocyte)로 분화함에 따라 지방세포의 표지유전자 (marker gene)들을 발현하며, 비만이 진행됨에 따라 지방세포 표지유전자들의 발현이 증가하게 된다. 따라서 지방세포의 크기를 감소시킨 GGE α 의 결과를 기초로, GGE α 가 생식기주변의 지방조직에서 지방세포의 표지유전자인 fatty acid transport protein (aP2)와 LPL 발현을 낮출 수 있는지 조사하였다. GGE α 처리에 의하여 aP2 mRNA 수준에는 큰 영향을 나타내지 않았으나 LPL mRNA은 GGE α 16 ($p < 0.01$), GGE α 17 ($p < 0.05$), GGE α 18 ($p < 0.01$) 수준을 크게 감소시켰다 ($p < 0.01$) (Fig. 5).

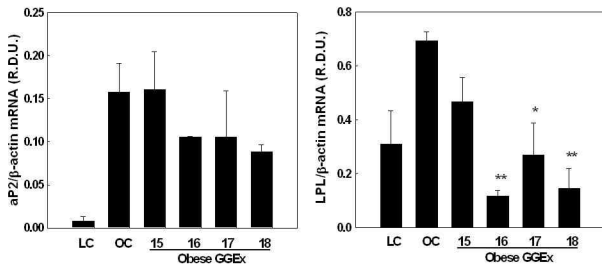


Fig. 5. Modulation of PPAR γ target gene expression by GGE α in epididymal adipose tissue of ob/ob mice. Wild-type C57BL/6J and ob/ob mice received a chow diet or the same chow diet supplemented with GGE α for 11 weeks. RNA was extracted from the epididymal adipose tissue, and mRNA levels of PPAR γ target enzymes and β -actin were measured as described in Materials and Methods. All values are expressed as mean \pm SD of R.D.U. (relative density units) using β -actin as a reference. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different from obese control group. LC, lean control ; OC, obese control.

4) GGE α 에 의한 UCP 유전자 발현

Uncoupling protein (UCP)은 에너지소비를 촉진함으로써 비만을 억제하는 것으로 알려져 있으므로 GGE α 에 의한 비만 억제가 UCP에 의해 조절되는지 조사하였다. UCP에는 3종류가 있어 다양한 작용을 나타내는데 UCP1은 갈색지방조직, UCP2는 간과 백색지방조직, 그리고 UCP3는 골격근에서 주로 발현되어 작용을 나타내므로 이들 기관에서 GGE α 에 의한 이들 유전자들의 mRNA 발현을 측정하였다. GGE α 처리는 간과 지방조직의 UCP2 유전자발현에 변화를 나타내지 않았으나 (Figs. 6 and 7), GGE α 18은 골격근의 UCP3 mRNA 발현을 통계적으로 유의하게 증가시킴으로써 골격근 UCP3 조절을 통해 비만을 조절할 수 있을 것으로 생각된다 ($p < 0.05$) (Fig. 8).

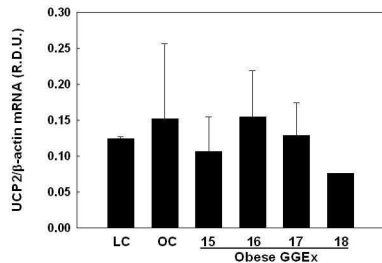


Fig. 6. Modulation of liver UCP2 gene expression by GGE α in ob/ob mice. Wild-type C57BL/6J and ob/ob mice received a chow diet or the same chow diet supplemented with GGE α for 11 weeks. RNA was extracted from the liver and mRNA levels of UCP2 and β -actin were measured as described in Materials and Methods. All values are expressed as mean \pm SD of R.D.U. (relative density units) using β -actin as a reference. LC, lean control ; OC, obese control.

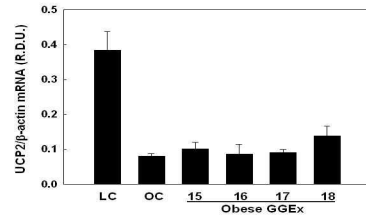


Fig. 7. Modulation of adipose UCP2 gene expression by GGE α in ob/ob mice. Wild-type C57BL/6J and ob/ob mice received a chow diet or the same chow diet supplemented with GGE α for 11 weeks. RNA was extracted from epididymal fat and mRNA levels of UCP2 and β -actin were measured as described in Materials and Methods. All values are expressed as mean \pm SD of R.D.U. (relative density units) using β -actin as a reference. LC, lean control ; OC, obese control.

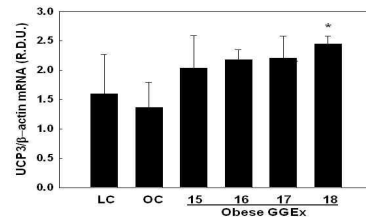


Fig. 8. Modulation of muscle UCP3 gene expression by GGE α in ob/ob mice. Wild-type C57BL/6J and ob/ob mice received a chow diet or the same chow diet supplemented with GGE α for 11 weeks. RNA was extracted from the muscle and mRNA levels of UCP3 and β -actin were measured as described in Materials and Methods. All values are expressed as mean \pm SD of R.D.U. (relative density units) using β -actin as a reference. * $p < 0.05$ significantly different from obese control group. LC, lean control ; OC, obese control.

2. GGE α 비만조절의 in vitro 분자생물학적 분석

1) 간세포에서 GGE α 에 의한 PPAR α reporter 유전자 발현 간세포주인 NMu2Li 세포에 PPAR α 와 RXR α expression construct 그리고 쥐 ACOX 유전자의 PPRE luciferase reporter construct (PPRE3-tk-luc)를 transfection 시킨 후 PPAR α reporter 유전자발현을 측정하였다. 간에서의 in vivo ACOX 발현에 미치는 효과와 유사하게, vehicle 만을 처리한 PPAR α 대조군과 비교하여 GGE α 18 처리군에서 PPAR α reporter 유전자발현을 통계적으로 유의하게 증가되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 9).

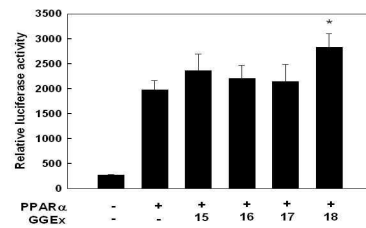


Fig. 9. Regulation of PPAR α reporter gene expression by GGE α in NMu2Li liver cells. Cells were transiently transfected with expression plasmids for PPAR α , a luciferase reporter gene construct containing 3 copies of the PPRE from the rat acyl-CoA oxidase gene and β -galactosidase gene. Cells were treated with several kinds of GGE α at the initial time of culture. Following incubation for 24 h, cells were harvested, lysed and were subsequently assayed for luciferase and β -galactosidase activities. All values are expressed as the mean \pm SD of relative luciferase units/ β -galactosidase activity. Experiments were performed at least three times. * $p < 0.05$ significantly different from PPAR α only.

2) 근육세포에서 GGEx에 의한 PPAR α 와 PPAR β reporter 유전자 발현

근육세포주인 C2C12 세포에 PPAR α 와 RXR α expression construct 그리고 쥐 ACOX 유전자의 PPRE luciferase reporter construct (PPRE3-tk-luc)를 transfection 시킨 후 PPAR α reporter 유전자 발현을 측정하였다. Vehicle를 처리한 PPAR α 대조군에 비하여 GGEx15 (p<0.05), GGEx16 (p<0.05), GGEx17 (p<0.01), GGEx18 (p<0.05)은 PPAR α reporter 유전자 활성을 크게 증가시켰다 (Fig. 10).

근육세포주에 PPAR β 와 RXR α expression construct 및 luciferase reporter construct (PPRE3-tk-luc)를 transfection 시킨 후 PPAR β reporter gene 발현을 측정하였다. PPAR α reporter 유전자 발현에 대한 효과와 유사하게 vehicle를 처리한 PPAR β 대조군에 비하여 GGEx15 (p<0.05), GGEx16 (p<0.05), GGEx17 (p<0.05), GGEx18 (p<0.01) 모두에 의하여 통계적으로 유의하게 증가되었다 (Fig. 11).

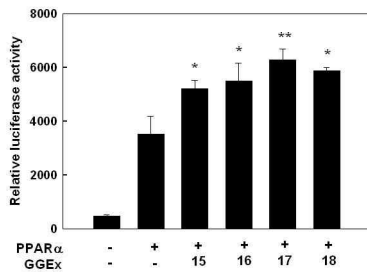


Fig. 10. Regulation of PPAR α reporter gene expression by GGEx in C2C12 muscle cells. Cells were transiently transfected with expression plasmids for PPAR α , a luciferase reporter gene construct containing 3 copies of the PPRE from the rat acyl-CoA oxidase gene and β -galactosidase gene. Cells were treated with several kinds of GGEx at the initial time of culture. Following incubation for 24 h, cells were harvested, lysed and were subsequently assayed for luciferase and β -galactosidase activities. All values are expressed as the mean \pm SD of relative luciferase units/ β -galactosidase activity. Experiments were performed at least three times. * p<0.05, ** p<0.01 significantly different from PPAR α -only.

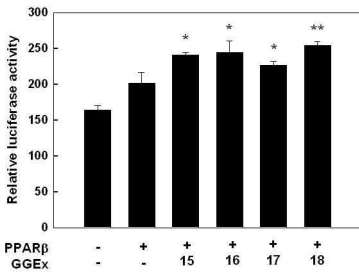


Fig. 11. Regulation of PPAR β reporter gene expression by GGEx in C2C12 muscle cells. Cells were transiently transfected with expression plasmids for PPAR β , a luciferase reporter gene construct containing 3 copies of the PPRE from the rat acyl-CoA oxidase gene and β -galactosidase gene. Cells were treated with several kinds of GGEx at the initial time of culture. Following incubation for 24 h, cells were harvested, lysed and were subsequently assayed for luciferase and β -galactosidase activities. All values are expressed as the mean \pm SD of relative luciferase units/ β -galactosidase activity. Experiments were performed at least three times. * p<0.05 significantly different from PPAR β -only.

3) 지방전구세포에서 GGEx에 의한 PPAR α 와 PPAR β reporter 유전자 발현

지방전구세포주인 3T3-L1 세포에 PPAR α 와 RXR α expression construct 그리고 쥐 ACOX 유전자의 PPRE luciferase reporter construct (PPRE3-tk-luc)를 transfection 시킨 후 PPAR α reporter 유전자 발현을 측정하였다. Vehicle를 처리한 PPAR α 대조군에 비하여 GGEx15 (p<0.01), GGEx16 (p<0.01), GGEx17 (p<0.05), GGEx18 (p<0.01)은 PPAR α reporter 유전자 활성을 크게 증가시켰다 (p<0.01) (Fig. 12).

지방전구세포주에 PPAR β 와 RXR α expression construct 및 luciferase reporter construct (PPRE3-tk-luc)를 transfection 시킨 후 PPAR β reporter gene 발현을 측정하였다. Vehicle를 처리한 PPAR β 대조군에 비하여 GGEx15, GGEx16, GGEx17, GGEx18 모두에 의하여 PPAR β reporter gene 발현이 통계적으로 유의하게 증가되었다 (p<0.01) (Fig. 13).

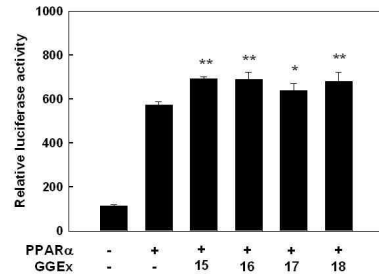


Fig. 12. Regulation of PPAR α reporter gene expression by GGEx in 3T3-L1 preadipocytes. Cells were transiently transfected with expression plasmids for PPAR α , a luciferase reporter gene construct containing 3 copies of the PPRE from the rat acyl-CoA oxidase gene and β -galactosidase gene. Cells were treated with several kinds of GGEx at the initial time of culture. Following incubation for 24 h, cells were harvested, lysed and were subsequently assayed for luciferase and β -galactosidase activities. All values are expressed as the mean \pm SD of relative luciferase units/ β -galactosidase activity. Experiments were performed at least three times. * p<0.05, ** p<0.01 significantly different from PPAR α -only.

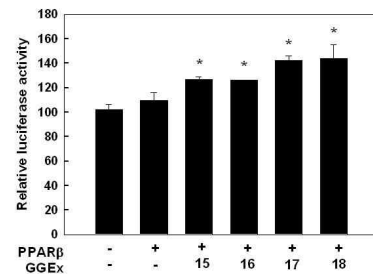


Fig. 13. Regulation of PPAR β reporter gene expression by GGEx in 3T3-L1 preadipocytes. Cells were transiently transfected with expression plasmids for PPAR β , a luciferase reporter gene construct containing 3 copies of the PPRE from the rat acyl-CoA oxidase gene and β -galactosidase gene. Cells were treated with several kinds of GGEx at the initial time of culture. Following incubation for 24 h, cells were harvested, lysed and were subsequently assayed for luciferase and β -galactosidase activities. All values are expressed as the mean \pm SD of relative luciferase units/ β -galactosidase activity. Experiments were performed at least three times. * p<0.05 significantly different from PPAR β -only.

고찰

PPAR α 는 간과 근육에서 지방산 산화를 통해 에너지 저장을 줄이는 기능을 맡고 있고, PPAR γ 는 간과 지방에서 lipogenesis에 관여하여 지질을 저장하고 특히 지방에서는 adipogenesis, adipokine production에 관여하며 근육에서는 전신의 인슐린 민감도 조절에 있어 중추적 기능을 담당하는 것으로 보인다. PPAR δ 는 지방과 근육에서 지방산 산화와 energy uncoupling을 통하여 에너지 저장을 줄이게 된다³⁾. 설치류와 인간에서 PPAR α 는 신장, 심장, 골격근과 갈색 지방조직 등 대사적 활성을 보이는 여러 조직에서 발현된다^{4,5)}. 특히 체내에서 PPAR α 의 발현은 간세포에서 가장 활발하게 일어나며 지방대사 조절과 관련되어 광범위한 연구가 진행되고 있다. PPAR α 를 활성화시키는 대표적인 리간드로 Wy14643과 linoleic acid가 알려져 있으며, 이 밖에도 지방 대사 저해제로 작용하는 hypolipidemic fibrate 등 구조적으로 다양한 지방대사물의 변형체를 포함하는 compound들이 PPAR α 에 결합한다고 보고되었다⁶⁾. PPAR α 의 표적 유전자의 대부분은 지방산의 세포내 유입과 지방대사물의 산화를 조절하는 중요한 효소들이다. PPAR α 는 간에서 지방산의 분해를 통해 에너지 저장을 줄이는 기능을 담당하는 반면, PPAR γ 는 지방조직에서 지방산의 저장을 촉진시키는 기능을 담당한다. PPAR γ 는 지방조직에서 다량으로 발현하여, 지방세포의 분화과정 중 초기단계에 그 발현이 증가된다.

지방세포 분화기전 연구에 있어 연구결과를 종합하여 보면 C/EBP α 와 더불어 PPAR γ 는 지방전구세포에서 지방세포로의 분화에 있어 가장 핵심적인 기능을 담당한다⁷⁾고 알려져 있다. PPAR α 와 유사하게 높은 농도의 지방산들에 의해 PPAR γ 도 활성화되지만, 생체내에서 합성되는 PPAR γ 의 리간드로는 prostaglandin 15-deoxy- Δ ^{12,14} prostaglandin J₂가 있다. 이들에 비하여 높은 친화력을 갖는 PPAR γ 의 리간드로는 최근 당뇨병 치료제로 사용되는 합성물질인 thiazolidinediones (TZDs) 계열의 화합물이 있다. 따라서 PPAR γ 의 활성화로 지방세포의 분화를 유도하며, 이 외에도 인슐린민감도 조절에 있어 중추적 기능을 담당하는 것으로 보인다. PPAR γ 의 표적 유전자로는 lipoprotein lipase⁸⁾, adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP 혹은 aP2)⁹⁾, PEPCK¹⁰⁾ 및 fatty acid transport protein (FATP)와 CD36¹¹⁾ 등이 있다. 이들 표적 유전자들은 PPAR α 의 표적 유전자가 대부분 지방산 분해를 관장하고 있는 것과는 달리 대부분 체내 지방대사물의 합성에 관여하는 lipogenic enzyme 들이다.

PPAR δ 로 알려진 PPAR β 는 현재까지 거의 모든 조직에서 발현되는 것으로 보고되었으며 포화지방산과 불포화지방산 모두 PPAR β 를 어느 정도 수준으로 활성화시킬 수 있는 리간드로 보고되었다¹²⁾. PPAR β 의 합성 리간드인 GW501516은 reverse cholesterol의 이동을 유발하며 비만을 보이는 실험 원숭이에서 혈중 지단백과 중성지방 수치를 낮추는 역할을 한다¹³⁾. 특히 비만모델에서 PPAR β 의 활성화에 의한 HDL-cholesterol 수치상승은 PPAR α 의 리간드로 알려진 fibrate에 의한 상승효과보다 훨씬 높게 나타났다. PPAR β 에 관한 최근의 다수연구에서 PPAR β 는 태반형성, 비만, 결장암, 당뇨 등과의 연관성이 보고되고 있다¹³⁾.

설치류에서 UCP1에 의한 갈색지방세포의 thermogenesis는 에너지균형을 이루기 위한 에너지 소비의 중요한 부분을 차지한다. 비만인 실험쥐의 갈색지방조직에서 교감신경의 활성이 감소¹⁴⁾되어 있으며 이들에 leptin을 주입하면 갈색지방조직의 교감신경 활성을 증가시키고 UCP1의 발현을 증가시킨다. 이는 leptin 발현이 감소되는 공복시 갈색지방조직의 교감신경의 활성 및 UCP1의 발현이 저하됨을 의미한다^{15,16)}. 갈색지방조직을 제거한 실험 생쥐에서 비만이 유발되기 때문에 체중 조절에 갈색지방조직이 중요한 기능을 하는 것을 알 수 있다. 이와 대조적으로 UCP1 null mice의 경우, 비만하지는 않았으나 추위에 노출시켰을 때 체온 저하가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 UCP1이 직접적으로 체중 조절을 담당하는 지에 대한 의문을 남긴다. 그러나 UCP1 이외의 다른 UCP 단백질이 UCP1의 체중 조절 효과를 대신할 가능성은 여전히 남아 있다¹⁷⁾. 또한 백색지방세포에 UCP1을 과다 발현시키면 고지방식이 섭취에 의한 비만유도가 감소되었다는 보고¹⁸⁾ 등은 UCP1에 의한 에너지 소비가 비만의 예방 및 억제에 유효하다는 증거를 제시한다.

인간의 경우 성인에서 갈색지방조직은 거의 존재하지 않지만 갈색지방조직에 다량 분포하여 UCP1의 활성화와 전사를 유도하는 주요 자극 (noradrenaline)의 수용체인 β 3-adrenergic receptor가 그 기능을 담당하고 있으며 다수 보고에서 비만 및 체중 감소와 BAT 및 β 3-adrenergic receptor의 유전적 다형성과의 관계가 보고되고 있다¹⁹⁾. 이에 대한 agonists를 만성적으로 처리한 결과 갈색지방의 양이 증가되었다는 보고와 백색지방조직 사이에 갈색지방세포가 다수 확산되어 있다는 보고²⁰⁾들 때문에 에너지 균형에 중요한 역할을 하는 BAT 및 UCP system이 비만치료의 새로운 표적으로 대두되고 있다.

UCP2는 거의 대부분의 조직에서 발현되며 고지방식을 한 실험쥐의 백색지방에서 발현이 증가된다²¹⁾. UCP3는 주요하게 골격근과 갈색지방조직에서 발현된다. Yeast와 mammalian cell에서 수행된 UCP2와 3의 기능적 연구에 의하면 이러한 이형체 역시 uncoupler로 기능한다고 규명되었다. Human UCP2와 3을 yeast에서 발현시켰을 때 이들은 thermogenesis를 유발하였으며 또한 UCP3 null mice 골격근의 미토콘드리아에서 state 4 respiratory rate이 낮아져 있고 높은 proton conductance를 보임을 관찰하여 UCP3 역시 uncoupling을 지니는 것으로 보인다²²⁾. 골격근은 체중의 40%를 차지하며 개개인의 대사를 차이의 많은 부분이 골격근의 에너지 소비에 의해 유발된다. 또한 adrenaline의 주입시 골격근의 에너지 소비가 증가하며, 골격근은 기본적인 에너지 요구량 및 수축시 요구되는 에너지가 많은 조직으로, 이에 요구되는 에너지가 UCP2와 3에 의해 제공된다²³⁾. 다른 조직에서는 ATP 이용가능성을 조절함으로써 세포의 항상성을 조절한다. 일례로 췌장세포에서는 ATP에 의해 인슐린 분비가 조절되며 이에 UCP2가 관여하여 UCP2가 과다 발현된 경우 인슐린 분비가 감소하였음이 보고되었다²⁴⁾.

최근 UCP 유전자와 비만에 관련된 연구에 의하면 인간과 실험쥐의 UCP2 유전자는 고인슐린혈증, 고혈당, 당뇨와 연관된 위치에 자리하고 있으며 UCP2 유전자 다형성과 에너지 소비, 대사효율, 지방산화, 지방의 분포 등과 연관되어 있다고 보고²⁵⁾되기도 한다. 고지방식을 섭취한 UCP2와 UCP3

과다 발현 실험동물에서 에너지 산화율이 증가되기도 하였다. UCP1 null mice의 BAT에서 UCP2의 발현이 유도되었고 이는 cold-sensitive하며 비만이 유도되지 않았다는 연구결과²⁶⁾로 사람에서 비만을 치료하기 위한 표적으로 주목할 만하다.

UCP2는 인슐린 분비에 있어서 음성 조절자로서 작용하는 것으로 알려져 있기 때문에 UCP2가 고인슐린증, 고혈당, 당뇨병 등과 관련이 되어 있다는 것을 알 수 있다. 특히 UCP1 null mice에서 UCP2의 발현이 증가되어 있어 이들의 또 다른 기능을 밝혀야 할 것으로 여겨진다. 근육에서 UCP3가 과다 발현된 실험용 생쥐가 정상에 비해 몸무게가 24% 감소되었다는 연구결과를 통해 UCP3가 비만과 관련되어 있음을 알 수 있다.

GGE_x에 의한 비만조절 효과가 간의 PPAR α 표적유전자의 발현 때문인지를 조사한 결과, 비만 대조군과 비교하여 GGE_x18 처리에 의한 간의 ACOX mRNA 발현 ($p < 0.05$)과 VLCAD mRNA 수준 ($p < 0.01$)이 통계적으로 유의하게 증가하였다. 이런 결과는 GGE_x18이 간의 지방산 β -산화 촉진을 한다는 것을 보여준다.

GGE_x가 골격근에서 지방산 산화와 triglyceride metabolism에 관련된 PPAR α 와 PPAR β 의 작용을 조절함으로써 비만을 조절하는지 조사한 결과, 미토콘드리아에서 fatty acid- β oxidation을 촉진하는 PPAR α 의 표적유전자인 LCAD mRNA의 발현은 GGE_x16, GGE_x17과 GGE_x18에 의해, MCAD mRNA 발현은 GGE_x17과 GGE_x18에 의하여 통계적으로 유의하게 증가되었다 ($p < 0.05$). PPAR β 의 표적유전자인 lipoprotein lipase (LPL) mRNA 농도 역시 GGE_x16, GGE_x17과 GGE_x18에 의하여 크게 증가되었다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 GGE_x가 골격근에서 PPAR α 를 통해 지방산 β -산화를 증가시키고, PPAR β 를 통해 triglyceride 농도를 낮춤으로써 비만을 억제할 수 있음을 시사한다.

지방세포의 크기를 감소시킨 GGE_x의 결과를 기초로, GGE_x가 생식기주변의 지방조직에서 지방세포의 표지유전자인 fatty acid transport protein (aP2)와 LPL 발현을 낮출 수 있는지 조사한 결과, GGE_x 처리에 의하여 aP2 mRNA 수준에는 큰 영향을 나타내지 않았으나 LPL mRNA는 GGE_x16 ($p < 0.01$), GGE_x17 ($p < 0.05$)와 GGE_x18 ($p < 0.01$) 수준을 크게 감소시켰다($p < 0.01$).

Uncoupling protein (UCP)은 에너지소비를 촉진함으로써 비만을 조절하는 것으로 알려져 있으므로 GGE_x에 의한 비만 조절이 UCP에 의해 조절되는지 조사한 결과, GGE_x 처리는 간과 지방조직의 UCP2 유전자발현에 변화를 나타내지 않았으나, GGE_x18은 골격근의 UCP3 mRNA 발현을 통계적으로 유의하게 증가시킴으로써 골격근 UCP3 조절을 통해 비만을 조절할 수 있을 것으로 생각된다($p < 0.05$).

이상의 결과로 보아 GGE_x18은 간과 골격근의 PPAR α , 골격근의 PPAR α 와 PPAR β 활성화를 통해 지방산 산화를 촉진하고, 골격근의 UCP 발현 증가를 통해 에너지소비를 촉진함으로써 비만을 억제 할 수 있을 것으로 생각된다.

간세포주인 NMu2Li 세포에서 GGE_x에 의한 PPAR α reporter 유전자 발현을 조사한 결과, GGE_x 처리는 간에서의 in vivo ACOX 발현에 미치는 효과와 유사하게, vehicle 만을 처리한 PPAR α 대조군과 비교하여 GGE_x18 처리군에

서 PPAR α reporter 유전자발현이 통계적으로 유의하게 증가되었다 ($p < 0.05$)

근육세포주인 C2C12 세포에서 GGE_x에 의한 PPAR α 와 PPAR β reporter 유전자 발현을 조사한 결과, vehicle을 처리한 PPAR α 대조군에 비하여 GGE_x15 ($p < 0.05$), GGE_x16 ($p < 0.05$), GGE_x17 ($p < 0.01$)과 GGE_x18 ($p < 0.05$)은 PPAR α reporter 유전자 활성을 크게 증가시켰다. PPAR α reporter 유전자 발현에 대한 효과와 유사하게 vehicle를 처리한 PPAR β 대조군에 비하여 GGE_x15 ($p < 0.05$), GGE_x16 ($p < 0.05$), GGE_x17 ($p < 0.05$)과 GGE_x18 ($p < 0.01$) 모두에 의하여 PPAR β reporter 유전자 활성이 통계적으로 유의하게 증가되었다.

지방전구세포주인 3T3-L1 세포에서 GGE_x에 의한 PPAR α 와 PPAR β reporter 유전자 발현을 조사한 결과, vehicle을 처리한 PPAR α 대조군에 비하여 GGE_x15 ($p < 0.01$), GGE_x16 ($p < 0.01$), GGE_x17 ($p < 0.05$)과 GGE_x18 ($p < 0.01$)은 PPAR α reporter 유전자 활성을 크게 증가시켰으며 ($p < 0.01$), vehicle을 처리한 PPAR β 대조군에 비하여 GGE_x15, GGE_x16, GGE_x17과 GGE_x18 모두에 의하여 PPAR β reporter gene 발현이 통계적으로 유의하게 증가되었다 ($p < 0.01$).

이러한 결과들로 미루어 볼 때, GGE_x는 PPAR α 와 PPAR β ligand 혹은 activator로 작용할 수 있음을 시사하며, 간 조직, 근육조직 및 지방조직에서 GGE_x에 의한 PPAR α 와 PPAR β transactivation을 촉진시킴으로써 비만이 조절될 수 있음을 시사한다. 특히 4종류의 배합 중 GGE_x18이 가장 효과적인 것으로 보인다.

결론

수컷 ob/ob 마우스 비만모델을 이용하여 GGE_x15 (麻黃 + 大黃), GGE_x16 (麻黃 + 昆布), GGE_x17 (大黃 + 昆布)와 GGE_x18 (麻黃 + 昆布 + 大黃)의 투여에 의한 in vivo와 in vitro에서 분자생물학적인 분석을 하여 다음의 결론을 얻었다.

1. *In vivo*에서 비만 대조군과 비교하여 GGE_x18 처리에 의한 간의 ACOX mRNA 발현과 VLCAD mRNA 수준이 통계적으로 유의하게 증가하였고, 미토콘드리아에서 fatty acid- β oxidation을 촉진하는 PPAR α 의 표적유전자인 LCAD mRNA 발현은 GGE_x16, GGE_x17과 GGE_x18에 의해, MCAD mRNA 발현은 GGE_x17과 GGE_x18에 의하여 통계적으로 유의하게 증가되었다. PPAR β 의 표적유전자인 lipoprotein lipase (LPL) mRNA 농도 역시 GGE_x16, GGE_x17과 GGE_x18에 의하여 크게 증가되었다. GGE_x 처리에 의하여 aP2 mRNA 수준에는 큰 영향을 나타내지 않았으나 LPL mRNA는 GGE_x16, GGE_x17과 GGE_x18의 수준을 크게 감소시켰다. GGE_x 처리는 간과 지방조직의 UCP2 유전자발현에 변화를 나타내지 않았으나, GGE_x18은 골격근의 UCP3 mRNA 발현을 통계적으로 유의하게 증가시켰다.

2. *In vitro*에서, 간세포주인 NMu2Li 세포에서 vehicle 만을

처리한 PPAR α 대조군과 비교하여 GGE \times 18 처리에서 PPAR α reporter 유전자발현이 통계적으로 유의하게 증가되었고, 근육세포주인 C2C12 세포와 지방전구세포주인 3T3-L1 세포에서 vehicle을 처리한 PPAR α 대조군과 PPAR β 대조군에 비하여 GGE \times 15, GGE \times 16, GGE \times 17과 GGE \times 18에서는 PPAR α reporter 유전자와 PPAR β reporter 유전자의 발현이 통계적으로 유의하게 증가되었다.

결론적으로 위의 결과들은 GGE \times 가 PPAR α 와 PPAR β ligand 혹은 activator로 작용할 수 있음을 시사하며, 간조직, 근육조직 및 지방조직에서 GGE \times 에 의한 PPAR α 와 PPAR β activity를 촉진시킴으로써 비만이 조절될 수 있음을 시사한다. 특히 4종류의 배합 중 GGE \times 18이 가장 효과적인 것으로 보인다.

Acknowledgement

This research was supported by Korea Science and Engineering Foundation(grant No. NRF-2010-0027498).

참고문헌

- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 Apr 6 ; 404(6778) : 635-43.
- 윤기현, 이희영, 정양삼, 서부일, 박규열, 윤미정, 신순식. Ob/Ob 마우스에서 輕身降脂丸의 비만조절. *大韓本草學會誌* 2010 ; 25(3) : 1-9.
- Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004 Apr ; 10(4) : 355-361.
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) : tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996 ; 137 : 354-66.
- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver receptor alpha in humans. *Diabetes* 1997 ; 46 : 1319-27.
- Linton, M.F., Fazio, S.K. Re-emergence of fibrates in the management of dyslipidemia and cardiovascular risk. *Curr. Atheroscler*. 2000 ; Rep 2 : 29-35.
- Rosen E.D. et al. PPAR is required for differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 1999 ; 4 : 611-7.
- Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, et al. PPAR alpha and PPAR gamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in lipoprotein lipase gene. *EMBO J*. 1996 ; 15 : 5336-48.
- Tontonoz P, Hu E, Graves R, et al. The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J. Med. Chem* 1996 ; 39 : 665-68.
- Tontonoz P, Hu E, Devine J, et al. PPAR gamma2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol* 1995 ; 15 : 351-7.
- Sfeir Z, Ibrahim A, Amri E, et al. Regulation of FAT/CD36 gene expression : further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1997 ; 57 : 17-21.
- Oliver et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999 ; 96 : 6102-6.
- Winegar, D.A., Effects of fenofibrate on lipid parameters in obese rhesus monkeys. *J. Lipid. Res*. 2001 ; 42 : 1543-51.
- Bukwoiecki, L.J., Folley, N., Lupien, J. & Paradis, A., Metabolic relationships between lipolysis and respiration in rat brown adipocytes. The role of long chain fatty acids as regulators of mitochondrial respiration and feedback inhibitors of lipolysis. *J. Biol. Chem*. 1981 ; 256 : 12840-12848.
- Himms-Hagen, J., Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. *Prog. Lipid. Res*. 1989 ; 28 : 67-115.
- Collins, S et al. Role of leptin in fat regulation. *Nature* 1996 ; 380 : 677.
- Lowell, B.B. et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation brown adipose tissue. *Nature* 1993 ; 366 : 740-742.
- Baumruk F, Flachs P, Horakova M, Floryk D, Kopecky J., Transgenic UCP1 in white adipocytes modulates mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 1999 ; 444 : 206-210.
- Evas D, Minouchehr S, Hagemann G et al. Frequency of and interaction between polymorphisms in the beta 3-adrenergic receptor and in uncoupling proteins 1 and 2 and obesity in Germans. *Int J Obes* 2000 ; 24 : 1239-1245.
- Cusin, I et al. Chronic central leptin infusion enhances insulin-stimulated glucose metabolism and favors the expression of uncoupling proteins. *Diabetes*. 1998 ; 249 : 107-110.
- Fleury C, Neverova M, Collins S et al. Uncoupling protein 1 : A novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 1997 ; 15 : 269-272.

22. Hagen T, Zhang CY, Sliker LJ, Chung WK, Leibel RL, Lowell BB. Assessment of uncoupling activity of the human uncoupling protein 3 short form and three mutants of the uncoupling protein gene using a yeast heterologous expression system. *FEBS Lett* 1999 ; 454 : 201–206.
23. Zurlo, F., Larson, K., Bogardus, C, & Ravussin, E., Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J. Clin. Invest.* 1990 ; 86 : 1423–1427.
24. C.B. Chan, P.E. MacDonald, M.C. Saleh, D.C. Johns, E. Marban, M.B. Wheeler. Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes* 1999 ; 48 : 1482–1486.
25. Elbein SC, Leppert M, Hasstedt S. Uncoupling protein 2 region in chromosome 11q13 is not linked to markers of obesity in familial type 2 diabetes. *Diabetes* 1997 ; 46 : 2105–2107.
26. Enerback, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., M.E. et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 1997 ; 387 : 90–94.