

지방전구세포와 고지방식이비만마우스에서 가미곽향정기산의 전탕액과 발효액의 항비만효과

김주희 · 박은정

원광대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Antiobese Effects of Gamikwakyangjungkisan and Fermented GamiKwakyangjungkisan in Preadipocytes and Mice Fed High Fat Diet

Kim Ju Hee · Park Eun Jung

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives

This experimental study was designed to investigate the antiobese effects of Gamikwakyangjungkisan and Fermented GamiKwakyangjungkisan.

Methods

The cellular lipid contents were assessed by Oil-Red-O staining. The expression of PPAR γ and C/EBP α were determined by real time RT-PCR and western blotting. In addition, body weight gain and serum lipid levels were measured in the mice with obesity induced by the high fat-diet for four weeks.

Results

Gamikwakyangjungkisan and Fermented GamiKwakyangjungkisan is reduced 3T3-L1 cells' differentiation and the expressions of PPAR γ and C/EBP α in high concentration group. High-fat diet + Fermented GamiKwakyangjungkisan group significantly reduced body weight gain. High-fat diet + Fermented GamiKwakyangjungkisan group significantly increased HDL-cholesterol contents and reduced LDL-cholesterol contents. Furthermore, Fermented GamiKwakyangjungkisan is excellent antiobese effects than Gamikwakyangjungkisan.

Conclusions

These results demonstrate that Gamikwakyangjungkisan and Fermented GamiKwakyangjungkisan exerts antiobese effect in 3T3-L1 cells and mice fed high fat diet. Furthermore, Fermented GamiKwakyangjungkisan is excellent antiobese effects than Gamikwakyangjungkisan.

Key words : GamiKwakyangjungkisan, Fermented, Obesity, 3T3-L1 cell, Adipocyte differentiation, PPAR γ , C/EBP α , Serum lipid

I. Introduction

비만은 에너지 섭취가 에너지 소비량보다 초과시에 잉여 에너지가 체내 지방조직 내에 축적되어 발생하는 질환으로, 최근 대중적인 관심에도 불구하고 점차 증가하고 있으며, 특히 소아와 청소년의 비만율도 빠르게 증가하고 있어 이에 대한 사회적, 의학적 관심이 높아지고 있다¹⁻³⁾.

비만은 성인이 되어 형성되기도 하나 대부분 식습관이 형성되는 소아의 비만이나 체중과다가 쉽게 성인 비만으로 이행되어⁴⁾ 고혈압, 뇌졸중, 당뇨, 동맥경화, 고지혈증, 관상동맥질환, 호흡기 질환, 간경화 등 각종 질병의 이환율을 높인다⁵⁾. 또한 소아기에 비만이 시작된 사람은 지방세포 수가 증가되어 있어 치료가 어렵고⁶⁾, 비만의 정도가 심하며 비만의 합병증도 더 심하고 신체적인 건강문제 뿐만 아니라 심리사회적인 문제를 동반할 수 있으므로^{7,8)} 보다 적극적인 치료가 필요하다.

지방세포 (adipocyte)는 비만과 밀접한 관계를 가지고 있는 생리적 요소로서 지방 세포내의 중성지방 양이 증가하거나 지방세포의 수가 늘어나 비만을 유발하게 된다⁹⁾. 지방세포는 일생을 통해 지방전구세포 (preadipocyte)의 증식과 분화과정을 통해 지방 세포로 지속적으로 전환되는데 지방전구세포에서 완벽히 성숙된 지방세포로 분화되는 과정에는 인슐린 등을 포함한 호르몬 자극과, 지방세포 유전자의 조절부위에 PPAR γ , C/EBP α 등의 중요한 전사인자들 발현의 증가가 있다¹⁰⁾. 이들 전사인자들은 상호전사를 유도함으로써 지방세포 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 따라서 지방세포의 증식과 지방세포에서 분비되는 물질들에 대한 이해와 그 생체 내 조절 기전에 대한 규명이 비만 및 그로 인한 여러 질병을 이해하고 효과적인 치료제를 개발할 수 있는 근거가 될 것으로 여겨지고 있다¹¹⁾.

韓醫學에서 肥滿은 肥, 肥胖, 肥人, 肉人, 肥貴人 등으로 표현하였는데¹²⁾, <黃帝內經> <素問通評虛實論>에서는 “肥貴人即膏粱厚味之疾也”라 하고 <素問 奇病論>에는 “人必數食甘味而多肥也”라 하여 膏粱珍味와 甘味の 음식을 많이 먹어서 생긴다 하였고¹³⁾, 이후 여러 문헌에서는 先天稟賦, 飲食失調, 久臥久坐, 活動減少, 外感濕邪, 內傷七情 등의 원인으로 氣虛, 氣滯, 痰濁, 水濕, 瘀血 등이 유발되어 비만과 연관된다고 하

였다¹⁴⁻⁷⁾. 治法으로는 補氣健脾, 化濕利水, 去痰, 通腑消導, 活血通絡 등이 활용되고 있다^{18,19)}.

최근 비만에 대한 치료로 한의학에서는 太陰調胃湯, 淸肺瀉肝湯, 葛根承氣湯, 承氣調胃湯 등의 四象方과 五苓散, 防風通聖散, 防己黃芪湯 등의 後世方을 사용하였다²⁰⁾. 그러나 이들 대부분은 성인비만을 대상으로 한 연구이고 소아의 비만은 체중감량을 목표로 하는 성인 비만과는 달리 성장을 고려해야 한다.

곽향정기산은 正氣를 補하고, 正氣를 通暢시키며, 아울러 利氣, 理氣, 調氣하여 氣를 暢利 平順하게 하여 정상상태로 회복시키는 처방²¹⁾인데, 곽향정기산에 관한 실험적 보고로는 위장관기능 및 알레르기과 관련한 보고²²⁾, 위장관 기능에 관한 실험연구²³⁾, 위장관 기능과 관련한 소음인방과의 비교연구²⁴⁾, 항암 및 면역조절 작용에 관한 연구²⁵⁾, 가미방의 비만관련 연구²⁶⁾ 등이 보고된 바 있다. 그러나 가미방의 비만관련 연구에서도 가미방 전탕액과 가미방을 발효시킨 가미곽향정기산발효액에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 곽향정기산에 황기, 의이인, 나복자, 저령, 택사, 산수유, 구기자, 인진, 울금, 삼릉, 봉출 약재를 加味한 가미곽향정기산과 이 처방을 발효시킨 가미곽향정기산발효액이 지방세포의 분화 및 증식기전 조절효과와 지방세포에서 분비되는 물질에 대한 조절 효과, 비만유도 생쥐의 체중 및 지질대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 실험하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. Materials and methods

1. 재료

1.1 약재

본 실험에 사용된 가미곽향정기산 전탕액과 가미곽향정기산 발효액은 원광대학교 부속 전주 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 가미곽향정기산 발효액은 가미곽향정기산을 다음과 같은 방법으로 발효하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다 (Table 1).

1.1.1 가미곽향정기산의 발효방법

가미곽향정기산 2첩에 물을 1,500 ml 넣어서 발효기 (서울 우성금속 제작)에서 100 °C 로 끓여서 85 °C

로 온도를 낮추어 약 10시간 달인 후 50 °C 로 식힌 상태에서 복합 발효균 (청주 중앙미생물 연구소 제품: 바실러스 효모 유산균 포함)을 넣어서 스위치를 끄고 48시간 발효 숙성하여 나온 발효액 400 ml를 얻었다.

1.1.2 검액의 조제

가미곽향정기산 2첩에 증류수를 1,500 ml 넣어서 2시간 동안 가열 한 960 ml 전탕액과 가미곽향정기산 2첩에 물을 1,500 ml 넣어서 발효시킨 960 ml 발효액을 동결건조해서 각각 분말 21.7 g씩을 얻었다.

1.2 동물

실험동물은 식이로 비만이 유도되는 형질을 가진 C57/BL6종의 4주령 된 생쥐 30마리를 대한 바이오 링 크로부터 구입하여 사용하였다. 실험시작 전 1주일 동안 일반 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경 (23 ± 2 °C, 습도 55 ± 5%)으로 유지하고 12시간 씩 명암을 자동 조절하여 적응시켰다.

1.3 실험군의 식이와 검액의 투여 방법

실험시작부터 5마리는 일반식을 급여하고, 10마리는 고지방식을 4주간 급여하여 비만을 유도하고

5주째부터 비만식이에 약제를 섞어서 12주간 급여하였다.

동물군은 총 6군 즉 1) 일반식이, 2) 고지방식이, 3) 가미곽향정기산, 4) 가미곽향정기산발효액, 5) 고지방식이 + 가미곽향정기산, 6) 고지방식이 + 가미곽향정기산발효액을 투여한 군으로 설정하였다.

마우스에 4주간 60% 고지방식을 통해 비만 유도 후 5주째부터 16주까지 각 약제를 100 mg/kg/day 용량 (성인 60 kg일 때 하루 섭취량 (≈8 g/60 kg/day)을 기준으로 산정)으로 투여한 약물 투여군과 고지방사료만 투여한 대조군에서 몸무게 변화를 측정하였다. 일반식 이과 고지방식이의 kg 당 조성의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 2).

1.4 지방세포 배양

3T3-L1 세포를 배양액을 이용하여 5%로 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 온도는 37 °C로 배양한다. 세포 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제 (antibiotics)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)을 사용한다. 3-4일 간격으로 배양세포에 0.25% 트립신 (trypsin)을 넣고 처리하여 세포를 탈착시켜 계대 배양한다. 세포를 개별 실험에 사용할 때

Table 1. The Composition of Gamikwakyangjungkisan

Herb Name	Crude drugs name	Dose (g)
곽향	Agastache rugosa	6
소엽	Perilla frutescens var. acuta Kudo	6
백지	Angelica dahurica Benthams et Hooker	2
대북피	Areca catech L.	6
백복령	Poria cocos (Schw.) Wolf	6
후박	Magnolia officinalis Rehder et Wilson	2
백출	Atractylodis japonica Koidz.	4
진피	Citrus unshiu Markovich	6
반하	Pinellia ternata (Thunb.) Breitenbach	4
길경	Platycodon grandiflorum A. (Jacq) DC.	4
자감초	Glycyrrhiza glabra L.	4
황기	Astragalus membranaceus	8
의이인	Coicis semen	20
나복자	Raphani semen	6
저령	Polyporus umbellatus	6
택사	Alisma canaliculatum	6
산수유	Cornus officinalis	4
구기자	Lycium chinense	4
인진	Artemisia capillaris	6
울금	Curcuma aromatic	6
삼릉	Scirpus flaviatilis	4
봉출	Curcuma zedoaria	4



Table 2. Composition of Experimental Diets (g/kg)

Consistents	Con	HFD*
Casein	200.0	265.0
L-Cystine	3.0	4.0
Corn Starch	397.486	-
Maltodextrin	132.0	160.0
Sucrose	100.0	90.0
Lard	-	310.0
Soybean Oil	70.0	30.0
Cellulose	50.0	65.5
Mineral Mixa	35.0	48.0
Calcium Phosphate, dibasic	-	3.4
Vitamin Mixb	10.0	21.0
Choline Bitartrate	2.5	3.0
TBHQ, antioxidantc	0.014	-
Blue Food Color	-	0.1

는 분화유도물질인 인슐린 (1 $\mu\text{g/ml}$), dexamethasone (DEX, 1 μM), 1-methyl-3-methylxanthine (IBMX, 0.5 mM) 이 함유된 분화유도 배양액으로 교환하여 2일간 배양하여 지방세포로 분화를 유도한다. 배양 2일 후 인슐린만 함유하는 배지로 교환하고 약물을 처리하여 2일간 배양하고, 다시 인슐린만 함유한 배지로 교환한 후 2일간 배양한다.

2. 방법

2.1 Oil-Red-O 염색법

세포를 10% 포르말데하이드 (formaldehyde)로 1시간 동안 고정시킨 후 60% 이소프로판올 (isopropylalcohol) 액으로 세척한다. 세포를 60% Oil-Red-O로 30분간 염색한다. 세포질 내 붉은색 과립이 있는 세포를 분화된 지방 세포로 간주하고, 염색된 Oil-Red-O를 100% 이소프로판올로 녹여내어 500 nm에서 흡광도를 측정하여 지방세포

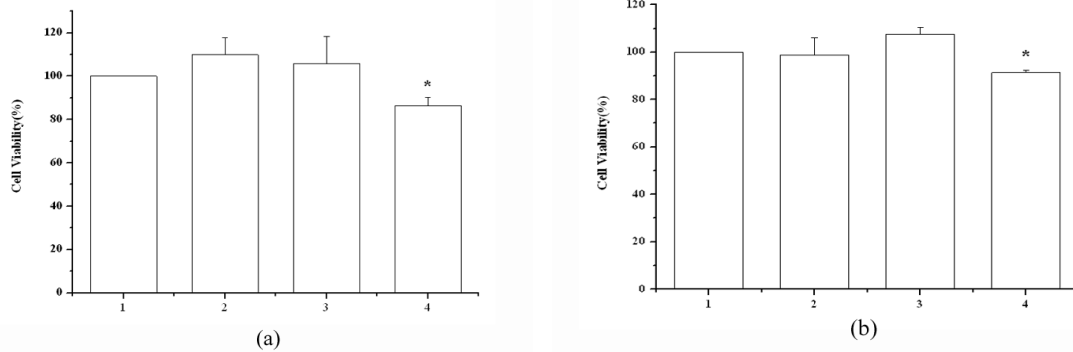


Fig. 1. Effect of Gamikwakhyangjungkisan, Fermented GamiKwakhyangjungkisan on the inhibition of cell viability in 3T3-L1 preadipocytes

Cells were incubated with Gamikwakhyangjungkisan, Fermented GamiKwakhyangjungkisan at the indicated concentration (0.01, 0.1 and 1 mg/mL) for 48h; growth rate was assessed by MTS assay. All values are mean SD. *, $P < 0.05$ compared with control.

(a) 1: Blank; 2: Gamikwakhyangjungkisan 0.01 mg/ml; 3: Gamikwakhyangjungkisan 0.1 mg/ml; 4: Gamikwakhyangjungkisan 1 mg/ml
 (b) 1: Blank; 2: Fermented GamiKwakhyangjungkisan 0.01 mg/ml; 3: Fermented GamiKwakhyangjungkisan 0.1 mg/ml; 4: Fermented GamiKwakhyangjungkisan 1 mg/ml

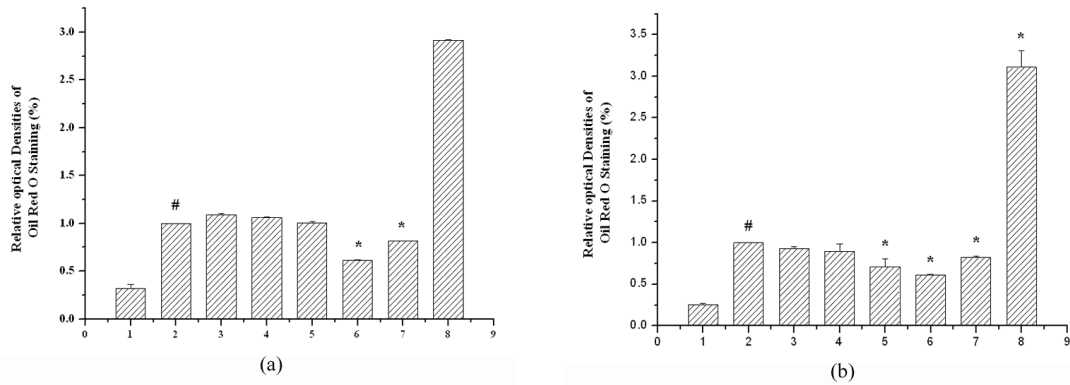


Fig. 2. Effect of Gamikwakhyangjungkisan, Fermented GamiKwakhyangjungkisan on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes

3T3-L1 preadipocytes were incubated with MDI differentiation medium for 2 days with the indicated concentrations of Gamikwakhyangjungkisan, Fermented GamiKwakhyangjungkisan. At day 6, the cells were fixed and stained with Oil Red O. The cellular lipid content was assessed by Oil Red O staining. All values are mean SD. *, $P < 0.05$ compared with control.

(a) 1: Blank; 2: Control; 3: Gamikwakhyangjungkisan 0.01 mg/ml; 4: Gamikwakhyangjungkisan 0.05 mg/ml; 5: Gamikwakhyangjungkisan 0.1 mg/ml; 6: EGCG; 7: GW9662; 8: Troglitazone

(b) 1: Blank¹⁾; 2: Control²⁾; 3: Fermented GamiKwakhyangjungkisan 0.01 mg/ml; 4: Fermented GamiKwakhyangjungkisan 0.05 mg/ml; 5: Fermented GamiKwakhyangjungkisan 0.1 mg/ml; 6: EGCG³⁾; 7: GW9662⁴⁾; 8: Troglitazone⁵⁾

의 분화 정도를 측정한다. 이 실험은 지방세포로 분화된 세포내의 지방을 염색하여 분화 정도를 측정하기 위해 수행하였다.

2.2 Real-time RT-PCR

지방세포를 분화시켜 약물을 농도별로 처리한 후, QIAzol Lysis reagent를 사용하여 RNA를 추출한다. 추출한 RNA를 template로 power cDNA synthesis kit (Intron)를 이용하여 single stranded cDNA를 제조하였다. 발현 정도는 DNA에 유전자를 특이적으로 증폭하는 PPAR γ , C/EBP α 를 넣어 Real-time PCR을 이용하여 측정한다. 이 실험은 지방 분화 진행 중 발현되는 전사 인자인 PPAR- γ 와 CEBP- α 에 미치는 영향을 알아보기 위해 수행하였다.

2.3 Western blotting

지방세포를 분화시켜 약물을 농도별로 처리한 후, 3T3-L1 세포를 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 0.1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride)로 용해시킨 후 8% SDS-polyacrylamide gel 전기 영동한 다음 PVDF membrane에 transfer 한다. 5% skim milk로 blocking한 후 여러 가지 1차 항체 (PPAR γ , CEBP/P α) 및 horseradish peroxidase (Jackson Lab.)가 부착된 2차 항체로 반응시키고 ECL 용액 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)을 사용하여 목적 단백질을 확인한다.

2.4 체중 변화 및 혈중 지질 측정

동물군은 총 6군 즉 1) 일반식이, 2) 고지방식이, 3) 가미곽향정기산, 4) 가미곽향정기산발효액, 5) 고지방식이 + 가미곽향정기산 6) 고지방식이 + 가미곽향정기산발효액 군으로 설정하였다. 마우스에 4주간 60% 고지방식을 통해 비만 유도 후 5주째부터 16주까지 100 mg/kg/day 용량으로 각 약제를 섞은 고지방식을 자유롭게 섭취하게 한 후, 16주째에 동물의 체중 변화 및 혈청에서 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, Triglyceride를 측정하였다.

1) 3T3-L1 전지방세포.

2) 지방전구세포를 지방세포로 유도한 것이다.

3) EGCG; 녹차에서 추출한 성분이다. 여러 논문에서 3T3-L1에 억제효과를 확인한 바 있어 가미곽향정기산과 가미곽향정기산발효액 약물의 효과가 어느 정도 있는지 입증된 약물을 통해서 비교, 검증하는 역할을 한다.

4) GW9662; PPAR γ 의 antagonist로써 많이 알려진 것이다. 어느 생체작용물질의 수용체에 결합해서 그 물질이 갖는 작용과 같은 (또는 유사한) 작용을 하는 물질 또는 약제, 혹은 수용부위의 활성을 억제하므로, 3T3-L1에서 지방세포로의 발현을 억제 시키는 것이다.

5) Troglitazone; PPAR γ 의 agonist로써 많이 알려진 것이다. 어느 생체작용물질의 수용체에 결합해서 그 물질이 갖는 작용과 같은 (또는 유사한) 작용을 하는 물질 또는 약제, 혹은 수용부위의 활성을 유도하므로, 3T3-L1에서 지방세포로의 발현을 높이는 것이다.

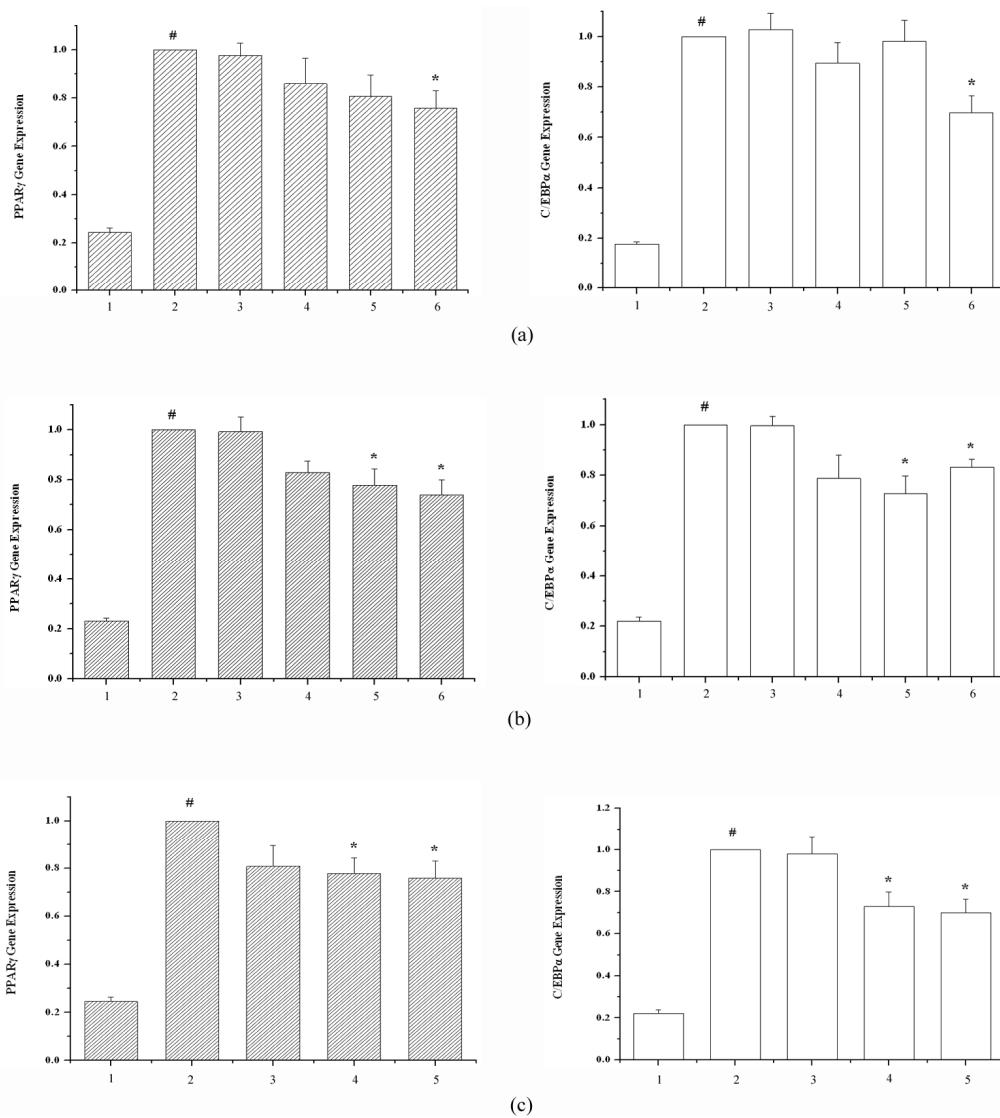


Fig. 3. Gamikwakyangjungkisan and Fermented GamiKwakyangjungkisan inhibited 3T3-L1 adipocyte differentiation

The PPAR γ and C/EBP α mRNA levels on day 6 of differentiation were determined by the real-time RT-PCR. All values are mean SD. *, $P < 0.05$ compared with control.

(a) 1: Blank; 2: Control; 3: Gamikwakyangjungkisan 0.01 mg/ml; 4: Gamikwakyangjungkisan 0.05 mg/ml; 5: Gamikwakyangjungkisan 0.1 mg/ml; 6: EGCG

(b) 1: Blank; 2: Control; 3: Fermented GamiKwakyangjungkisan 0.01 mg/ml; 4: Fermented GamiKwakyangjungkisan 0.05 mg/ml; 5: Fermented GamiKwakyangjungkisan 0.1 mg/ml; 6: EGCG

(c) 1: Blank; 2: Control; 3: Gamikwakyangjungkisan 0.1 mg/ml; 4: Fermented GamiKwakyangjungkisan 0.1 mg/ml; 5: EGCG

2.5 통계분석

실험 결과는 각 실험에 대한 평균값 \pm S.E.M. 로 표기하였고, 각 그룹간의 차이를 결정하기 위한 통계 분석은 Independent samples T Test를 이용하였다. 모든 통계분석은 SPSS v14.0 statistical analysis software를 이용해서 수행되었다. $P < 0.05$ 인 값을 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. Results

1. 세포독성시험

실험에 사용된 각 약물이 지방세포의 생존률에 미치는 영향을 관찰하기 위해 MTS assay를 진행하였다. 그 결과 각 약물별 1 mg/ml에서 세포독성이 있음을 확인하였다 (Fig. 1).

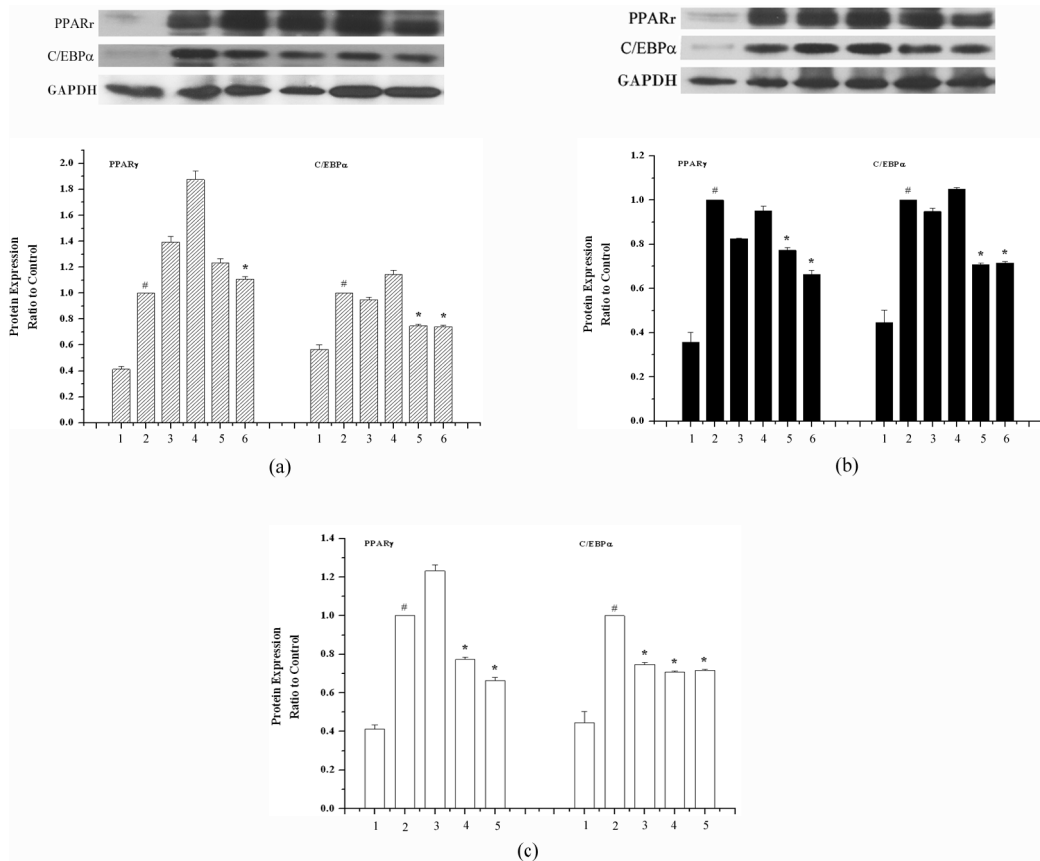


Fig. 4. Effects of Gamikwakhyangjungkisan, Fermented GamiKwakhyangjungkisan on fat accumulation and the expressions of adipogenic proteins

The expression levels of master regulators of adipocyte differentiation; Ppar γ , C/ebp α after induction were measured by western blotting. The 3T3-L1 preadipocytes were treated with or without Gamikwakhyangjungkisan, Fermented GamiKwakhyangjungkisan (0.01, 0.05 and 0.1 mg/ml) during differentiation for 6 days (Ppar γ and C/ebp α) after they had become confluent.

The results are shown as the mean \pm SD. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, Welch's t-test).

(a) 1: Blank; 2: Control; 3: Gamikwakhyangjungkisan 0.01 mg/ml; 4: Gamikwakhyangjungkisan 0.05 mg/ml; 5: Gamikwakhyangjungkisan 0.1 mg/ml; 6: EGCG

(b) 1: Blank; 2: Control; 3: Fermented GamiKwakhyangjungkisan 0.01 mg/ml; 4: Fermented GamiKwakhyangjungkisan 0.05 mg/ml; 5: Fermented GamiKwakhyangjungkisan 0.1 mg/ml; 6: EGCG

(c) 1: Blank; 2: Control; 3: Gamikwakhyangjungkisan 0.1 mg/ml; 4: Fermented GamiKwakhyangjungkisan 0.1 mg/ml; 5: EGCG

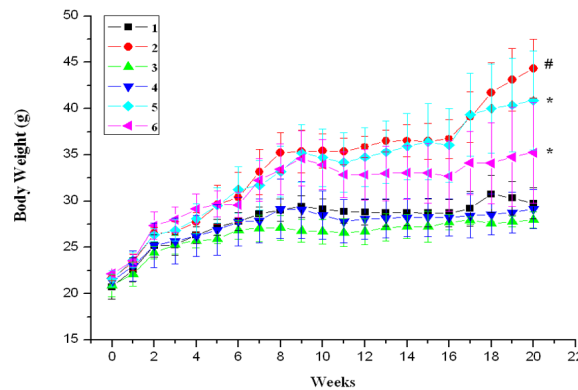


Fig. 5. The anti-obesity effect of Gamikwakhyangjungkisan, Fermented GamiKwakhyangjungkisan in high-fat diet-induced obese mice

1: Normal Diet; 2: High Fat Diet; 3: Gamikwakhyangjungkisan; 4: Fermented GamiKwakhyangjungkisan; 5: High fat diet + Gamikwakhyangjungkisan; 6: High fat diet + Fermented GamiKwakhyangjungkisan

2. 지방세포 분화억제 효과

가미곽향정기산과 가미곽향정기산발효액을 3T3-L1 지방세포에 처리 후 지방세포 분화억제 정도를 측정하였다. 분화억제 정도는 Oil Red O 측정법을 통해서 확인하였다.

3T3-L1 지방세포에 약물을 처리하여 분화억제 정도를 측정한 결과, 가미곽향정기산발효액에서 0.1 mg/ml 부터 지방세포 분화 억제 효과를 확인하였다 (Fig. 2).

2.1 PPAR γ 와 C/EBP α gene 발현 억제 효과

3T3-L1 지방세포에 가미곽향정기산을 처리하여 지방세포 분화 조절 인자인 PPAR γ , C/EBP α 발현정도를 측정한 결과, PPAR γ 발현 정도는 고농도 0.1 mg/ml에서 약간 감소되었으나 유의성은 없었고, 또한 C/EBP α 의 발현 억제 효과를 확인할 수 없었다.

3T3-L1 지방세포에 가미곽향정기산발효액을 처리하여 지방세포 분화 조절 인자인 PPAR γ , C/EBP α 발현정도를 측정한 결과, 가미곽향정기산발효액은 농도 0.1 mg/ml에서 통계적으로 유의한 PPAR γ , C/EBP α 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 3 (a), (b)).

발효전후의 효과를 비교하기 위해서 가미곽향정기산과 가미곽향정기산발효액의 지방세포분화인자 억제 효과를 고농도에서 비교한 것이다. 가미곽향정기산발효액이 가미곽향정기산에 비해 통계적으로 유의하게 0.1 mg/ml에서 PPAR γ , C/EBP α 의 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 3 (c)).

2.2 PPAR γ 와 C/EBP α protein 발현 억제 효과

3T3-L1 지방세포에 가미곽향정기산, 가미곽향정기

산발효액을 처리하여 지방세포 분화 조절 인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 발현 정도를 western blot analysis를 통해 측정한 결과, 단백질 level에서도 역시 가미곽향정기산발효액에서 PPAR γ 뿐만 아니라 C/EBP α 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다.

3. 체중 감소 효과

동물군은 총 6군 즉 1) 일반식이, 2) 고지방식이, 3) 가미곽향정기산, 4) 가미곽향정기산발효액, 5) 고지방식이 + 가미곽향정기산, 6) 고지방식이 + 가미곽향정기산발효액으로 설정하였다. 4주간 60% 고지방식이를 통해 비만 유도 후 5주째부터 20주까지 100 mg/kg/day 용량으로 각 약제를 섞은 고지방식이를 자유롭게 섭취하게 하여 몸무게 변화를 측정하였다.

15주째부터 고지방 식이군에 비하여 가미곽향정기산발효액 투여군에서 가장 효과적인 체중감소를 확인하였다 (Fig. 5).

4. 혈중지질농도 감소 효과

동물군은 총 6군 즉 1) 일반식이, 2) 고지방식이, 3) 가미곽향정기산, 4) 가미곽향정기산발효액, 5) 고지방식이 + 가미곽향정기산, 6) 고지방식이 + 가미곽향정기산발효액으로 설정하였다. 4주간 60% 고지방식이를 통해 비만 유도 후 5주째부터 20주까지 100 mg/kg/day 용량으로 각 약제를 섞은 고지방식이를 자유롭게 섭취한 후, 20주째에 동물의 혈청에서 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 등을 측정하였다.

그 결과, HDL-콜레스테롤의 혈중농도가 고지방식이 + 가미곽향정기산발효액 투여군에서 통계적으로 유의

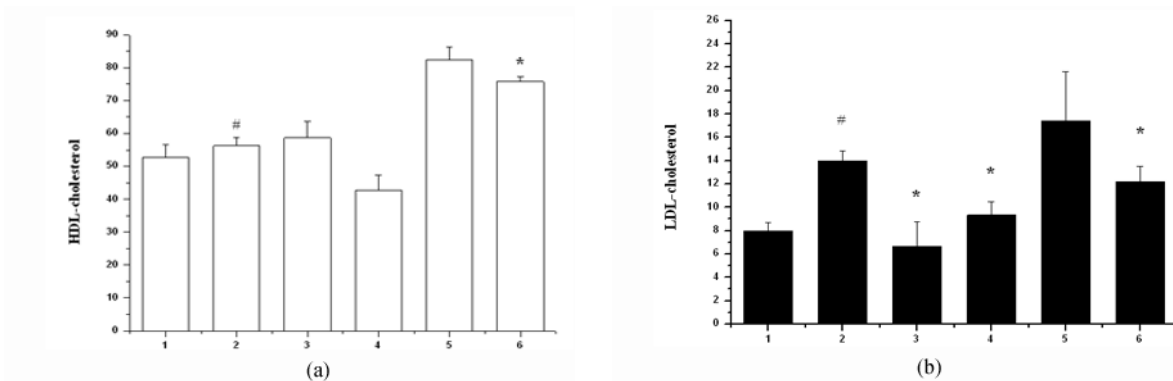


Fig. 6. Effect of Gamikwakhyangjungkisan and Fermented Gamikwakhyangjungkisan on blood level in high-fat diet-induced obese mice

하게 증가했으며, LDL-콜레스테롤의 혈중농도에서도 고지방식이 + 가미곽향정기산발효액투여군에서 통계적으로 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 6).

IV. Discussion

소아는 성인과 달리 지방세포 수의 증가 및 지방세포 내 중성지방 양의 증가가 비만형성의 근간이 되며, 체중을 줄여도 지방세포의 크기는 감소하나 그 수는 줄어들지 않는 특징을 가지고 있다²⁷⁾. 비만아는 성인이 되어서 비로소 증상이 나타나는 퇴행성 심혈관계 질환이 이미 진행되고 있고²⁸⁾, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화, 심장질환 및 인슐린 비의존형 당뇨병과 같은 성인 질환이 쉽게 발생할 수 있는 위험이 있다²⁹⁾. 또한 날씬한 체형을 선호하는 사회에서 비만은 신체적인 건강문제 뿐만 아니라 심리사회적인 문제를 동반할 수 있는데, 비만 아동들은 둔하고, 게으르고, 의지가 없는 등 외형에 관한 것 뿐만 아니라 행동 및 능력 면에서도 부정적인 편견을 받게 되어 열등감을 갖거나 심리적으로 위축될 수 있어^{8,30)} 보다 적극적인 치료가 필요하다.

소아비만의 치료에는 식이조절, 행동치료, 운동치료, 심리치료 등이 있는데 이와 더불어 한의학적 치료인 침치료나 뜸치료, 한약치료도 많은 도움이 되고 있다. 그러나 소아의 경우 침이나 뜸에 대하여 거부감을 많이 가지고 있기 때문에 보다 간편하고 효율적인 한약 복용이 의지가 약한 소아의 비만치료에 주된 수단이 되고 있다³¹⁾.

이에 본 연구에서는 소아비만에 응용하기위해 가미곽향정기산과 가미곽향정기산발효액의 지방세포의 분화 및 증식기전 조절효과와 지방세포에서 분비되는 물질에 대한 조절 효과를 알아보고자 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 실험하였다.

지방전구세포인 3T3-L1 세포주는 3T3 쥐 배아의 섬유아세포로부터 유래된 지방전구 세포주으로써 지방세포의 대사과정을 연구하는데 널리 이용되고 있다. 본 세포의 분화가 활발할수록 지방세포 내의 지방축적이 활발하여 비만을 유도하게 되므로 항비만 효과를 가질 것으로 생각되는 물질을 본 세포에 처리한 후 세포의 분화가 적을수록 항비만 효과가 크다고 볼 수 있다.

藿香正氣散은 1110년경宋代陳³²⁾의太平惠民和劑局方 治傷寒門에 처음으로 기재된處方으로, 같은傷寒門에 있는不換金正氣散을 원방으로 하여蒼朮을

白朮로 바꾸고,桔梗,白芷,大腹皮,蘇葉,白茯苓을 추가한 것이다³³⁾.

藿香正氣散의方解를 살펴보면藿香을君藥으로 하여辛味로는風寒을 발산하고芳香性으로는濕濁을化解하여和胃悅脾하고,半夏薑製는燥濕降氣하여和胃止嘔하고,厚朴은行氣化濕하여寬胸際滿하므로臣藥으로 하였으며,蘇葉과白芷는藿香의外散風寒을 돕고 겸하여芳香化濕을 하며,陳皮는理氣燥濕하고아울러和中하며,白茯苓白朮은建脾運濕하고,大腹皮는行氣利濕하며,桔梗은宣肺利膈하고,生薑大棗는脾胃를 조화하므로 함께佐藥으로 하였고,甘草는諸藥을 조화하므로使藥으로 구성하며,散風寒,化濕濁하게 되어氣機는通暢하게 되고脾胃가 조화되므로諸證이 스스로 치유된다고 하였다²²⁾.

黃芪는補氣藥으로性은微溫하고,味는甘하며,脾,肺經에 작용한다.補氣升陽固表止汗托毒排膿生肌利水退腫 등의 효능이 있다.薏苡仁은利水滲濕藥으로性은微寒하고,味는甘,淡하며脾,胃,肺經에 작용한다.利水滲濕,際濕痺,清熱排膿,健脾止瀉 등의 효능이 있다.萊菔子는消導藥으로性은平하고味는辛甘하며肺脾胃經에 작용한다.行滯消食,降氣祛痰 등의 효능이 있다.豬苓은利水滲濕藥으로性은平하고味는甘淡하며腎膀胱經에 작용한다.滲濕利水 등의 효능이 있다.澤瀉는利水滲濕藥으로性은寒하고味는甘淡하며腎膀胱經에 작용한다.滲濕利水泄熱清腎火 등의 효능이 있다.山茱萸는補陰藥으로性은微溫하고味는酸하며肝腎經에 작용한다.補益肝腎澀精斂汗 등의 효능이 있다.枸杞子는補陰藥으로性은平하고味는甘하며肝腎肺經에 작용한다.滋補肝腎益精明目潤肺 등의 효능이 있다.茵陳은利濕退黃藥으로性은微寒하고味는苦하며脾胃肝膽經에 작용한다.清利濕熱退黃 등의 효능이 있다.鬱金은理氣藥으로性은寒하고味는辛苦하며心膽肝經에 작용한다.涼血清心行氣解鬱祛瘀止痛利膽退黃 등의 효능이 있다.三稜은破氣藥으로性은平하고味는苦하며肝脾經에 작용한다.破氣祛瘀消積止痛 등의 효능이 있다.蓬朮은破氣藥으로性은溫하고味는辛苦하며肝脾經에 작용한다.行氣破血消積止痛 등의 효능이 있다³⁴⁾.

3T3-L1 세포주는 분화된 3T3-L1 adipocyte가 in vivo adipocyte의 생화학적 형태학적 성질들과 사실상 동일하다는 보고³⁵⁾에 따라 지방 대사를 연구하는데 적절하다고 판단되어 3T3-L1 지방전구세포를 분화시켜

사용하였다. 그리고 실험은 지방세포 분화억제, 지방세포 분화 관련 전사인자와 유전자 발현조절에 관한 실험으로 크게 나누어 진행하였다.

MTS assay는 각 약물이 지방세포의 생존률에 미치는 영향을 관찰하기 위한 실험으로 실험 결과 각 약물 별 1 mg/ml에서 세포독성이 있었음을 확인하였다 ($P < 0.05$ compared with control). 분화된 지방세포 내 중성지방 생성에 대한 영향을 관찰하기 위해 Oil red O를 이용하여 염색을 시행하여 지방세포의 형태를 관찰하고 세포내 중성지방의 양을 관찰한 결과 가미곽향정기산에서는 효과가 미미했고, 가미곽향정기산발효액에서는 0.1 mg/ml부터 지방세포 분화 억제 효과를 확인하였다 ($P < 0.05$ compared with control).

지방세포 분화 관련 전사인자와 유전자 발현조절에 대한 실험결과는 다음과 같다. 지방전구세포에서 형태학적, 생화학적으로 완전히 성숙된 지방세포로 분화되는 과정은 호르몬, cytokine 그리고 전사인자 등의 여러인자들의 상호조절을 통해 이루어지며³⁶⁾, 분화과정에 관여하는 전사인자들 중 가장 잘 알려진 C/EBP family와 PPAR family는 지방세포 유전자 조절 부위와 상호 작용함으로써 지방세포분화를 촉진시킨다. 지방전구세포가 adipogenic signal을 받으면 전사인자 C/EBP β 와 C/EBP δ 의 발현이 유도되고 C/EBP β 와 C/EBP δ 발현의 일시적인 증가는 PPAR γ 발현 증가에 선행해서 일어나며, 그 후 C/EBP β 와 C/EBP δ 발현의 감소는 C/EBP α 의 유도를 수반하며 분화를 진행한다³⁷⁾. C/EBP α 는 분화 말기에 여러 지방조직 특이성 유전자들이 발현되기 전에 증가하여 에너지 항상성을 조절³⁸⁾하며, PPAR γ 는 adipogenesis의 주요 조절자로서 leptin, fatty acid synthase (FAS) 및 fatty acid binding protein (aP2) 등의 adipogenic gene들의 발현을 조절한다. PPAR는 핵내 수용체이고, 스테로이드 호르몬 수용체나 활성형 지용성 비타민 수용체와 유사한 구조를 가지며 α, β, γ 등의 여러 아형이 알려져 있는데, 이 중 PPAR γ 는 지방분화에 관여하여 지방대사 관련 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다³⁹⁾.

3T3-L1, adipocyte에 가미곽향정기산, 가미곽향정기산발효액을 처리하여 지방세포 분화 조절 인자인 PPAR- γ , C/EBP- α 를 측정하는 Real-Time PCR 실험 결과 가미곽향정기산에서는 PPAR- γ 고농도 0.1 mg/ml에서 유의적으로 감소되지는 않았지만 조금 감소된 것을 볼 수 있으나, C/EBP- α 의 발현 억제 효과를 확인할 수는 없었고, 가미곽향정기산발효액에서는 농도

0.1 mg/ml에서 PPAR- γ , C/EBP- α 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다.

Western blot analysis 결과 단백질 level에서도 역시 가미곽향정기산 발효액에서 PPAR γ 뿐만 아니라 C/EBP α 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다.

콜레스테롤은 세포막의 구성성분이며, 각종 steroid hormone을 비롯한 hormone 생산의 원료나 담즙산의 전구체로서 중요한 물질이다. 혈청 콜레스테롤 측정의 가장 큰 임상적인 의미는 고 콜레스테롤 혈증이 동맥경화증의 가장 좋은 위험신호가 된다는 것이며, 혈청 총 콜레스테롤과 관상동맥질환의 발생과는 상관성이 있기 때문에 중요시 되고 있다⁴⁰⁾. 혈중 콜레스테롤의 증가는 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥질환의 3대 위험인자로, 역학적으로 혈중 지질수준, 저수준의 HDL-콜레스테롤과 고수준의 LDL-콜레스테롤을 지닌 사람에게서 심혈관 질환의 발생률이 현저히 증가하는 것으로 알려졌다⁴¹⁻²⁾.

각 실험군에 4주간 고지방식을 통해 비만 유도 후 5주째부터 20주까지 100 mg/kg/day 용량으로 각 약재를 섞은 고지방식을 자유롭게 섭취하게 한 후, 20주째에 동물의 체중을 측정하고 동물의 혈청에서 총콜레스테롤, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol을 측정하였다.

그 결과 고지방식이 체중변화에서 고지방식이 + 가미곽향정기산발효액을 먹인 마우스에서 가장 유의한 체중 감소를 보였다.

혈중지질에서는 고지방식이 + 가미곽향정기산발효액 투여군에서 HDL-콜레스테롤의 혈중농도가 통계적으로 유의하게 증가했으며, LDL-콜레스테롤의 혈중농도는 유의하게 감소하였다.

V. Conclusion

가미곽향정기산과 가미곽향정기산발효액을 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여 지방세포의 분화와 증식기전 조절효과와 지방세포에서 분비되는 물질에 대한 조절 효과를 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포독성 실험 결과 각 약물 별 1 mg/ml에서 세포독성이 있었음을 확인하였다.
2. 지방축적정도 측정 실험 결과 가미곽향정기산에서는 효과가 미미했고, 가미곽향정기산발효액에서는 0.1 mg/ml부터 지방세포 분화 억제 효과를

확인하였다.

3. PPAR γ 와 C/EBP α gene 발현 정도 실험 결과 가미곽향정기산에서는 PPAR γ 농도 0.1 mg/ml 에서 유의적으로 감소되지는 않았지만 조금 감소된 것을 볼 수 있으나, C/EBP α 의 발현 억제 효과를 확인할 수는 없었다. 반면 가미곽향정기산발효액에서는 농도 0.1 mg/ml에서 통계적으로 유의한 PPAR γ , C/EBP α 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다.
4. PPAR γ 와 C/EBP α protein 발현 정도 실험 결과 단백질 level에서도 역시 통계적으로 유의하게 가미곽향정기산발효액의 PPAR γ , C/EBP α 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다.
5. 고지방식이 체중변화에서 고지방식이 + 가미곽향정기산발효액을 먹인 마우스에서 가장 유의한 체중 감소를 보였다.
6. 혈중지질에서는 고지방식이 + 가미곽향정기산 발효액 투여군에서 HDL-콜레스테롤의 혈중농도가 통계적으로 유의하게 증가했으며, LDL-콜레스테롤의 혈중농도는 유의하게 감소하였다.

가미곽향정기산과 가미곽향정기산발효액의 항비만 효과를 3T3-L1 지방전구세포와 고지방식이 비만 마우스 모델에서 확인한 결과, 가미곽향정기산과 가미곽향정기산발효액이 지방세포분화인자와 체중감소효과를 나타냄을 확인하였으며, 더욱이 가미곽향정기산보다 가미곽향정기산발효액에서 탁월한 항비만 효과를 나타냄을 확인하였다. 추후 연구에서는 가미곽향정기산과 가미곽향정기산발효액의 성분조사를 통해 발효액이 전탕액에 비해 어떤 성분에 의해 항비만 효과의 차이를 보였는지 확인해 보는 것도 필요하리라 사료된다.

VI. Acknowledgement

이 논문은 2014학년도 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었음.

References

1. Lee DH. Diagnosis and treatment of childhood obesity. Korean J Obesity. 2002;11(1):57-96.
2. Kim SH. Association between breastfeeding and obesity. Yonsei University of Public Health. 2004.
3. Hong YM, Moon KR, Hong YM, Moon KR, Seo JW, Sim JK, Yoo KH, Jung BJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of childhood obesity. J Korean Pediatr. 1999;42:1338-45.
4. Mossberg HO. 40-year follow-up of overweight children. Lancet. 1989;2:491-3.
5. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:2522-5.
6. Story M, Alton I. Current perspective on adolescent obesity. Top Clin. Nuter. 1991;6:50.
7. WHO. Preventing and managing the global epidemic of obesity. Geneva: Report of WHO consultation on obesity. 1997:60-1.
8. Park HS. Psychodynamics of childhood and adolescent obesity. Korean J Obesity. 2000;9(3):55-9.
9. Lee JS, Lee SH. The reductive effects of oriental medicine on the body fat and abdominal obesity. J Korean Med Obes Res. 2014;14(1):24-8.
10. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2000;11(8):327-32.
11. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. Endocr Rev. 1998; 78(3):783-809.
12. Clinical diagnosis of symptom identification. People Hygiene Publishing. 1987:43.
13. Ma WD, Jang EA. Hwangjienaekyungsomun. Seoul: Sungbo-sa. 1975:224-330.
14. Hong WS. Revision of Hwangjienaekyung. Seoul: Oriental medicine Publishing. 1991:61, 94, 219, 220, 275.
15. Jang GB. Kyungakjeonseo. Sanghai: Science and Technology Publishing. 1984:194.
16. Lee Y. EuHakIbmun. Seoul: Daesung Publishing. 1984:108.
17. Heo SY. Study of obesity in oriental and western medicine. J Orient Rehabil Med. 1997;7(1):272-86.
18. Jin ST. Seoksilbirock. Seoul: HangRim Publishing. 1982:76.
19. Lee DW. Dongwon medical book : Ten kind of study on stomach and intestines. Seoul: Daesungmunwhasa.

- 1983:70.
20. Jin KS. An analysis of medicine study tendency on obesity. Dajeon univ. 2004.
 21. Sin JY. Commentary of Bangyakhabyun. Seoul: Sungbo Publishing. 1989:108.
 22. Kim YB. Effect of Gwakyangjunggisian and GamiGwakyangjunggisian on gastrointestinal function and Antiallergy. Kyunghee univ. 1993.
 23. Ahn JR. Experimental study of Gwakyangjunggisian effect. Kyunghee univ. 1993.
 24. Yoon HS, Yoo BH, Park DW, Yoo KW. Experimental study of Gwakyangjunggisian and SoumGwakyangjunggisian. Kyunghee univ. 1998;21(1):197-211.
 25. Kim EB. Experimental study of Gwakyangjunggisian and GamiGwakyangjunggisian on immunomodulation and anticancer. Kyunghee univ. 1994.
 26. Lee H. The Effect of Gwakyangjunggisian in high fat diet-induced obese mice. Kyunghee univ. 2003.
 27. Hong CE. Pediatrics. Daehan public. 1999:86.
 28. Clinial Obesity. Koryo medicine. 1995:171, 191, 205.
 29. Aviva M, Jennifer S, Eugenie HC, Alison EF, Graham C, William HD. The disease burden associated with overweight and obesity. JAMA. 1999;282:1523-9.
 30. WHO. Preventing and managing the global epidemic of obesity. Geneva: Report of WHO consultation on obesity. 1997:60-1.
 31. You HJ, Lee JY, Kim DG. A survey on parent's recognition and rstrospective study on effect of herbal medication. J Pediatr Korean Med. 2005;19(2):243-53.
 32. Jin SM. TaepyungHyeminHwajekukbang. BukkyungInmin yuisaeng publishing. 1985:78-9.
 33. Lee IH. Yang symptom. Seoul: Daesung munhwasa. 1994:277-8.
 34. Shin MK. Clinical traditional herbalogy. Seoul: YoungLimSa Publishing Co. 2000:194, 260, 274, 468, 479-80, 582, 654-5, 657, 688.
 35. MacDougald OA, hwang C, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocyte. Preceedings of the National Academy of Sciences. 1995;92(20):9034-7.
 36. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. Physiol Rev. 1998;78:783-809.
 37. Camp HS, Ren D, Leff T. Adipogenesis and fatcell function in obesity and diabetes. Trends Mol Med. 2002;8(9):442-7.
 38. Long SD, Pekala PH. Lipid mediator of insulin resistance: ceramide signalling down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. Biochem J. 1996; 319:179-84.
 39. Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S, Lane MD. Adipocyte differentiation and leptin expression. Annu Rev Cell Dev Biol. 1997;13:231-59.
 40. Kim HJ, Kim CH, KIM KC, Jeon IS, Seo HK. Relationship between diet and blood cholesterol. Korean J Fam Med. 1996;17(10):861-8.
 41. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The framingham study. Am J Med. 1977;62:707.
 42. Meller NE, Thelle DS, Forde OH, Mjos OD. The Troms heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: A prospective case-control study. Lancet. 1977;(8019):965-8.