

갈근탕이 고지방 식이 유발 비만 쥐에서 비만 관련 유전자 발현에 미치는 영향

예성애 · 김호준* · 고성규[†] · 송윤경

가천대학교 한의과대학 한방재활의학과교실, 동국대학교 한의과대학 한방재활의학과교실*, 경희대학교 한의과대학 예방의학교실[†]

Influence of *Galgeun-tang* on Gene Expression in Diet-Induced Obese Mice

Sung-Ae Ye, K.M.D., Ho-Jun Kim, K.M.D.*, Seong-Gyu Ko, M.D., Ph.D., M.P.H.[†], Yun-Kyung Song, K.M.D.
Department of Korean Rehabilitation Medicine, College of Korean Medicine, Gachon University, Department of Korean Rehabilitation Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University*, Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Kyunghee University[†]

본 연구는 한의약선도기술개발사업
한의학 근거창출 임상연구의 일환으로
이루어진 것임(과제고유번호 :
HI13C0530).
본 논문은 가천대학교 일반대학원 2016
석사 논문임.

RECEIVED March 28, 2016
REVISED April 11, 2016
ACCEPTED April 12, 2016

CORRESPONDING TO
Yun-Kyung Song, Department of
Korean Rehabilitation Medicine,
College of Korean Medicine, Gachon
University, 1342, Seongnam-daero,
Sujeong-gu, Seongnam 13120,
Korea

TEL (032) 770-1298
FAX (032) 468-4033
E-mail lyricsong@naver.com

Copyright © 2016 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Objectives The purpose of this study was to evaluate anti-obesity effect of *Galgeun-tang* (*gegentang*) and elucidate the effect of it on gene expression related to obesity.

Methods The experiments were performed with the use of Diet-Induced Obese mice. They were grouped NC (normal control), HFD (high fat diet control), GGT (*Galgeun-tang* (*gegentang*), 700 mg/kg), ORL (Orlistat, 10 mg/kg). GGT was orally administered for 12 weeks. Body weight was measured every week. Real-time PCR was performed to investigate the effect of GGT on gene expression in liver tissue.

Results GGT group and ORL group were reduced in body weight compared with HFD. HFD increased PPAR γ , SREBP-1, Leptin, aP2, FATP1, FAS gene expression compared with NC. GGT increased FATP1 gene expression. But GGT reduced PPAR γ & FAS gene expression in liver tissue of diet-induced obese mice compared with HFD.

Conclusions These results suggest that GGT is supposed to have a certain impact on the treatment of obesity. But more study is needed in the future. (**J Korean Med Rehab 2016;26(2):1-12**)

Key words *Galgeun-tang* (*gegentang*), obesity, orlistat *Galgeun*, *Mahwang*, Obesity-related genes

서론»»»»

국내의 비만 유병률이 만19세 이상 BMI 25 이상을 기준으로 할 때 2014년 30.9%로 보고되며¹⁾ 비만은 단순히 미용적인 차원을 넘어 대사성 질환 및 심혈관 질환 등 다

양한 질환에 영향을 미치는 중요한 질환으로 대두되고 있다. 지방세포에서 분비되는 hormone, adipokine은 인슐린 저항성이나 관련 대사성 질환을 악화시키기도 하고, 대사과정에 직·간접적으로 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다^{2,3)}. 비만은 유전적, 환경적 요인과 행동, 문화

등 다양한 요인들이 복합적으로 작용하여 이루어지는 것으로 알려지며, 그 중 유전적 요인에 대한 연구도 지속적으로 이루어지고 있다.

임상에서 비만 치료에 사용되는 단미 제제로는 마황이 가장 많이 사용되는 것으로 알려져 있으나 실험적으로는 산수유, 백출, 대황 등에 대한 연구도 이루어졌으며⁴⁾, 복합처방으로는 太陰調胃湯, 調胃升清湯, 體減薏苡仁湯, 防風通聖散 순으로 임상에서 많이 사용되고 있는 것으로 나타났다⁵⁾.

갈근탕은 갈근, 마황, 계지, 작약, 감초, 생강, 대추로 구성된 복합 처방으로서 감기나 두통, 해열 및 진경 등에 사용되고 있으며⁶⁾ 갈근탕에 대한 기존 연구로는 소염, 해열, 진통 작용⁷⁾, 아토피 피부염 및 알레르기성 염증관련 연구⁸⁾, 항산화⁹⁾ 및 항노화¹⁰⁾, 면역조절작용¹¹⁾ 등에 관한 연구가 이루어져왔으나 아직 비만 관련 연구는 많지 않다.

그러나 갈근탕의 주요 약재인 마황과 갈근 중, 마황은 단일 추출물로서 뿐만 아니라 다양한 처방에서 비만 치료에 많이 활용되고 있는데, 지방세포 분화를 억제시키는 효과가 있으며¹²⁾, 단기간 내 체중 감소 효과가 있는 것으로 보고되고 있다¹³⁾. 갈근에 대한 연구 보고에서는 갈근의 혈당강하 및 인슐린 저항성에 관한 효과가 지방 분해를 통해서 나타나는 것으로 추측되기도 하며¹⁴⁾, 갈근의 isoflavone계열 화합물에서 estrogen receptor에 작용하는 phytoestrogen이 존재한다고 보고되며¹⁵⁾ 난소 기능 저하로 비만이 유발된 쥐에서 비만치료의 효과에 대한 연구도 시행된 바 있다¹⁶⁾.

갈근탕이 비만에 치료에 일정한 효과가 있을 것으로 사료되는 바 본 연구에서는 갈근탕의 비만 치료제로서 가능성을 알아보기 위하여 고지방식이로 비만이 유발된 쥐의 갈근탕 투여 전후의 체중 변화 및 비만 관련 유전자 발현변화에 대해 살펴보고 얻은 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법»»»»

1. 비만 동물 실험

1) 시료

실험에 사용한 갈근탕(GGT, 갈근탕 단미엑스산혼합제, 한풍제약, 한국)은 정제수(Milli-Q 정수방식으로 정제된

물)와 혼합하였다. 혼합물은 입자들을 분산시키기 위하여 70°C에서 초음파 처리한 후, 121°C에서 20분간 autoclave에서 소독하였다. 식힌 후에 혼합물은 사용하기까지 20°C에 표본으로 저장되었다. Orlistat (ORL, Roche, Newjersey, USA)도 갈근탕과 동일한 방법으로 처리하였다.

2) 실험 동물

6주령의 수컷 C57BL/6J (Koatech, South Korea) 쥐들은 처치를 시작하기 전 4주 동안 12/12시간 명암주기(09:00~21:00)로 일정한 온도(22±2°C)와 상대습도(40~60%)로 유지되는 단일 케이지에 보관되었으며 체중 및 음식섭취량은 실험 내내 주 단위로 모니터링 하였다.

동물들은 미국 NIH (National Institute of Health) 지침에 따라 사육, 관리 되었으며, 모든 동물 실험은 동국대학교 일산 병원의 연구동물윤리위원회의 지침에 따라 수행되었다(IACUC-11-051).

3) 실험군 설정 및 약물 투약

실험을 위하여 동물을 먼저 무작위로 정상식이군과 고지방식이군의 두 군으로 나누었다. 정상군(normal group, NC, n=6)은 정상연구식이(normal research diet, AIN-93G; 12.7% of the calories)를 제공 받았으며, 고지방식이군(n=18)은 고지방식이(high fat diet, D12492; 60% of the calories)를 제공받았다. 사료는 미국 Research Diets사로부터 구입하여 사용하였다.

4주간 환경에 적응 시킨 후 고지방식이군을 다시 세 개의 하위 군으로 무작위로 나누었다. 세 군은 첫 번째 고지방식이를 복용하고 정제수를 투여하는 대조군(control, HFD군, n=6), 두 번째 고지방식이를 복용하고 갈근탕을 투여한 GGT군(n=6), 세 번째 고지방식이를 복용하고 Orlistat을 투여한 ORL군(n=6)이다.

투약은 12주 동안(주당 6일간) 갈근탕은 700 mg/Kg · 체중, Orlistat는 10 mg/Kg · 체중의 농도로 하루에 한번 경구섭관으로 투여하였으며, NC군에도 같은 부피의 정제수를 투여하였다.

각 군 모두 체중은 매주 측정하였으며 체중계(Wess WK-2A, China)를 이용하여 측정하였다.

4) 조직 수집 & 저장

모든 쥐는 12주간의 투약을 마치고, 16시간 절식시킨

후에 zoletil (Virbac, France) 마취 상태에서 생명이 끊어지고 난 후 조직을 수집하였다. Adipokine 유전자 발현 조사를 위해서 간의 지방 조직은 즉시 RNAlater (Ambion, Austin, USA)에 보존하였고, 조직은 액체질소로 동결하여 -80°C 에서 사용 전까지 보관하였다.

2. 유전자 발현 실험

1) 총 RNA 분리

쥐에서 분리한 간 조직을 각 군별로 랜덤하게 5개씩 선별하였다. 선별한 간 조직에 PBS를 넣어 균질화한 후, 1ml TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 용액에 200 μl 의 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)을 넣고 강하게 섞은 후 원심 분리(14,000 rpm)하여 상층액 500 μl 를 분리하였다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 가하여 -20°C 에서 24시간 RNA를 침전시킨 다음 20분간 1,400 rpm으로 원심 분리하였다. 상층액을 버리고, 70% 에탄올로 세척하고 자연 건조시켰다. RNase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase free DNase를 첨가하고 -70°C 에서 저장하였다.

2) cDNA 제조

대조군 · 실험군에서 각각 분리한 total RNA액 1 μl (1 μg RNA함유)에 oligo dT (100 pmol) 1 μl , RNase free water 3 μl 을 넣고 조심스레 혼합 하여, 65°C 에서 10분간 incubation하였다. Primer가 풀어지도록 4°C 에서 약 5

분간 방치한 후, Reverse transcriptase buffer, dNTP (각 2.5 mM), RNase inhibitor, DTT (100 nM), Reverse transcriptase (M-MLV 200 U/ μl)을 첨가한 다음, 조심스럽게 혼합하였다. 이 후 42°C 에서 90분간 incubation하고, 95°C 에서 5분간 처리한 후 사용하였다.

3) Real time RT-PCR

각각의 optical tube (MicroAmp[®] Optical 96 Well Reaction Plate with Barcode and Optical Adhesive Films, Applied Biosystems, Cat.No. 4314320)에 3배의 SybrGreen Mix 2.5 μl (Sigma Aldrich, Cat.No. S9430), (2)의 cDNA 1 μl , 10 pmol/ μl primer pair mix 1 μl , dNTP (각 2.5 mM) 2 μl , 10xTag polymerase buffer 2.5 μl , Tag Polymerase 0.3 μl 와 14.7 μl H₂O를 넣고, $95^{\circ}\text{C}/5\text{분}/1\text{ cycle}$, $95^{\circ}\text{C}/30\text{초}$, $45^{\circ}\text{C}/30\text{초}$, $72^{\circ}\text{C}/60\text{초}/40\text{ cycles}$, $95^{\circ}\text{C}/20\text{분}/1\text{ cycle}$ 로 증폭시켰다. PCR후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μl 를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정하고, ABI PRISM[®] 7000Sequence Detection System (Applied Biosystems, Cat.No. 4349157)를 이용하여 real time PCR 결과를 분석하였다. PCR에 사용한 primer는 Table I에 표시하였다.

3. 통계처리

유전자 발현량에 대한 실험 결과는 평균±표준 편차로 표시하였다. 그룹간의 비교를 위한 유의성 검증은 Student's

Table I. Primers

Primer	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
PPAR γ	AGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTG	TGCCACCTCTTTGCTCTGCTC
C/EBP α	TTACAACAGGCCAGGTTTCC	GGCTGGCGACATACAGTACA
SREBP-1	TGTTGGCATCCTGCTATCTG	AGGGAAAGCTTTGGGGTCTA
Leptin	GACACAAAACCCTCAT	CAGTGTCTGGTCCATCT
LPL	TCCAAGGAAGCCTTTGAGAA	CCATCCTCAGTCCCAGAAAA
CPT-1	CTCAGTGGGAGCGACTCTTCA	GGCCTCTGTGGTACACGACAA
ACS-1	CAACCCAGAACCATGGAAGT	CTGACTGCATGGAGAGGTCA
HMG-CoA-R	GCTGGTGAGTTGTCCTTGAT	CTTCTTGGTGCATGTTCCCT
FAS	CGGCGTGTGATGGGGCTGGTA	AGGAGTAGTAGGCGGTGGTGTAG
FATP1	TGCCTCTGCCTTGATCTTTT	GGAACCGTGGATGAACCTAA
aP2	AAGAGAAAACGAGATGGTGACAA	CTTGTG GAAGTCACGCCTTT

C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein- α , PPAR γ : peroxisome proliferator activated receptor- γ , SREBP-1c: sterol-regulatory element-binding protein-1c, HMG-CoA-R: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, LPL: lipoprotein lipase, CPT-1: carnitine palmitoyl transferase 1, ACS-1: acyl-CoA synthetase-1, FATP1: fatty acid transport protein-1, FAS: fatty acid synthase.

t-test로 하였으며, 실험 군 간의 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과»»»»

1. 체중 변화

약물 투여 12주 후 체중을 측정한 결과, NC군은 33.72 g, HFD군은 50.05 g, ORL군은 45.32 g, GGT군은 44.09 g으로 측정되었다.

HFD군은 NC군에 비해 유의한 체중 증가가 나타났고, GGT군과 ORL군에서는 HFD군에 비해 유의한 체중 감소가 나타났다(Fig. 1).

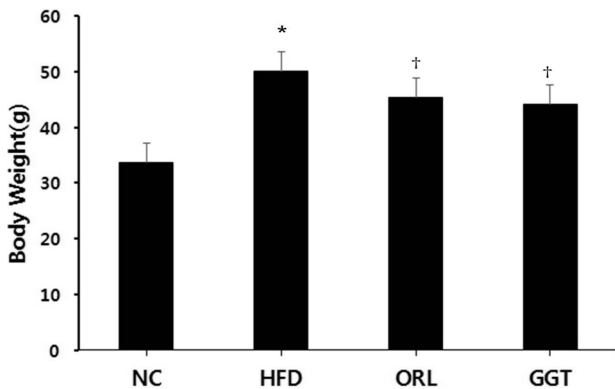


Fig. 1. Change of Body Weight (g).
 NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group.
 *represents $p < 0.05$ compared to the NC group, †represents $p < 0.05$ compared to the HFD group.

2. 비만 관련 유전자 분석

실험에서 조사한 비만 관련 유전자는 SREBP-1c, PPAR γ , C/EBP α , Leptin, LPL, FATP1, ACS1, CPT1, aP2, FAS, HMG-CoA-reductase이며, 이들 간의 관계는 Fig. 2에 간략하게 표시하였다.

3. SREBP-1c (sterol-regulatory element-binding protein-1c)

NC군은 0.93 ± 0.11 로 나타났으며 HFD군에서는 2.62 ± 0.72 로 높게 나타났고 GGT군에서는 2.94 ± 0.89 , ORL군에서 2.06 ± 1.09 로 나타났다.

HFD군은 NC군에 비해 유의하게 증가되었고, GGT군과 ORL군에서는 HFD군에 비해 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 3).

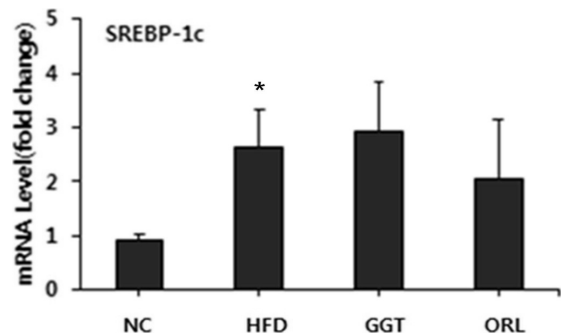


Fig. 3. mRNA Level of SREBP-1c.
 NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group.
 *represents $p < 0.05$ compared to the NC group.

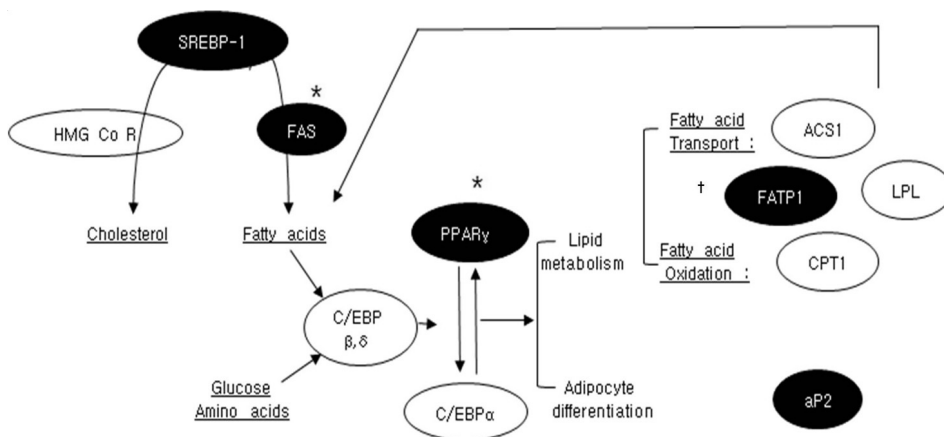


Fig. 2. The Flow of obesity-related gene. Black indicates that gene expression was increased in HFD group compared to NC group.
 *Indicates that gene expression was reduced in GGT group compared to HFD group, †Indicates that gene expression was increased in GGT group compared to HFD group.

4. PPAR γ (PeroxisomeProliferator-Activated Receptor- γ)

NC군은 0.94 ± 0.06 로 나타났으며 HFD군에서는 3.59 ± 0.71 로 높게 나타났고 GGT군에서는 1.86 ± 0.50 , ORL군에서 2.30 ± 0.60 로 나타났다.

HFD군은 NC군에 비해 유의하게 증가되었고, GGT군과 ORL군 모두에서 HFD군에 비해 유의한 감소가 나타났다(Fig. 4).

5. C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein-a)

NC군은 1.21 ± 0.29 로 나타났으며 HFD군에서는 1.44 ± 0.27 로 나타났고 GGT군에서는 2.48 ± 0.66 , ORL군에서 2.28 ± 0.57 로 나타났다.

HFD군은 NC군에 비해 증가되었으나 유의한 변화는 아니었고, GGT군과 ORL군은 HFD군에 비해 증가되었으나 유의한 변화는 아니었다(Fig. 5).

6. Leptin

NC군은 1.04 ± 0.05 로 나타났으며 HFD군에서는 17.18 ± 3.53 로 나타났고 GGT군에서는 14.02 ± 4.46 , ORL군에서 5.11 ± 1.36 로 나타났다.

HFD군은 NC군에 비해 유의하게 증가되었고, GGT군에서는 HFD군에 비해 유의한 변화는 나타나지 않았고,

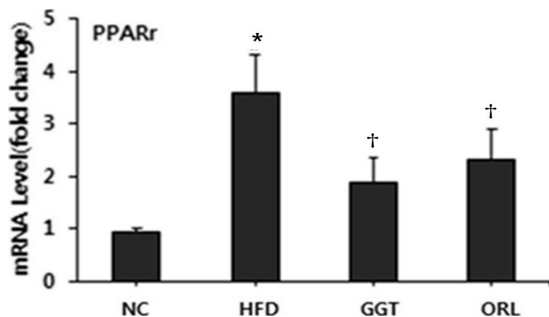


Fig. 4. mRNA Level of PPAR γ . NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group. *represents $p < 0.05$ compared to the NC group, †represents $p < 0.05$ compared to the HFD group.

ORL군에서 유의한 감소가 나타났다(Fig. 6).

7. LPL (lipoprotein lipase)

NC군은 1.00 ± 0.03 로 나타났으며 HFD군에서는 0.93 ± 0.21 로 나타났고 GGT군에서는 2.22 ± 0.54 , ORL군에서 0.52 ± 0.14 로 나타났다.

HFD군은 NC군에 비해 유의한 변화가 나타나지 않았고, GGT군과 ORL군에서도 HFD군에 비해 유의한 변화는 나타나지 않았다(Fig. 7).

8. FATP1 (fatty acid transport protein-1)

NC군은 0.95 ± 0.14 로 나타났으며 HFD군에서는 1.79 ± 0.41 로 나타났고 GGT군에서는 3.36 ± 0.68 , ORL군에서

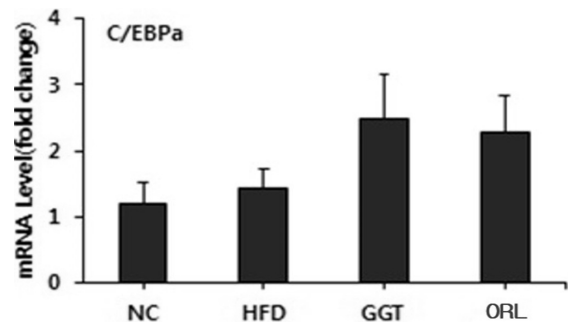


Fig. 5. mRNA Level of C/EBP α . NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group.

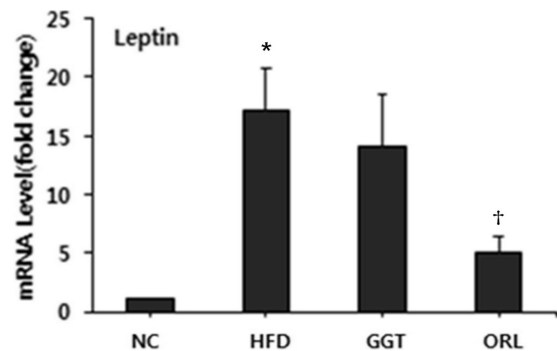


Fig. 6. mRNA Level of Leptin. NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group. *represents $p < 0.05$ compared to the NC group, †represents $p < 0.05$ compared to the HFD group.

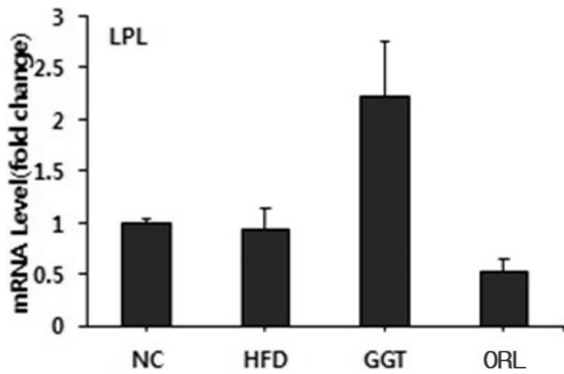


Fig. 7. mRNA Level of LPL.
NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group.

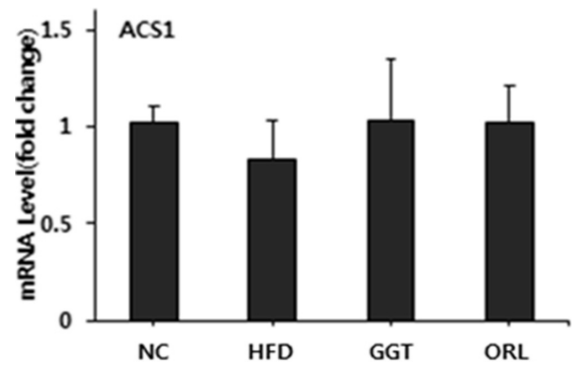


Fig. 9. mRNA Level of ACS-1.
NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group.

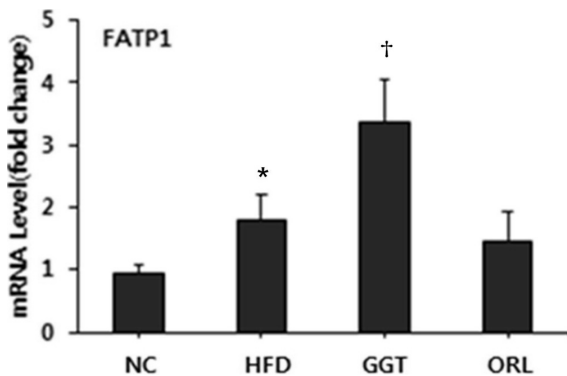


Fig. 8. mRNA Level of FATP1.
NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group.
*represents $p < 0.05$ compared to the NC group, †represents $p < 0.05$ compared to the HFD group.

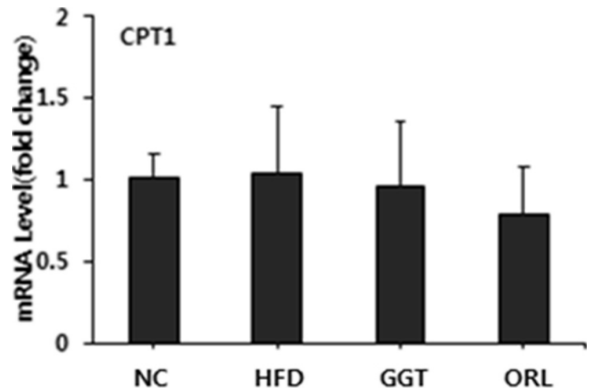


Fig. 10. mRNA Level of CPT-1.
NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group.

1.46±0.48로 나타났다.

HFD군은 NC군에 비해 유의하게 증가되었고, HFD군에 비해 GGT군에서 유의한 증가가 나타났으며, ORL군에서는 유의한 변화가 없었다(Fig. 8).

9. ACS1 (acyl-CoA synthetase-1)

NC군은 1.02±0.09로 나타났으며 HFD군에서는 0.84±0.19로 나타났고 GGT군에서는 1.03±0.33, ORL군에서 1.02±0.19로 나타났다.

HFD군은 NC군에 비해 유의한 증가가 나타나지 않았고, GGT군과 ORL군에서도 HFD군에 비해 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 9).

10. CPT1 (carnitine palmitoyl transferase 1)

NC군은 1.01±0.15로 나타났으며 HFD군에서는 1.04±0.41로 나타났고 GGT군에서는 0.96±0.40, ORL군에서 0.79±0.28로 나타났다.

HFD군은 NC군에 비해 유의한 증가가 나타나지 않았고, GGT군과 ORL군에서도 HFD군에 비해 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 10).

11. aP2

NC군은 0.94±0.09로 나타났으며 HFD군에서는 2.17±1.38로 나타났고 GGT군에서는 2.85±1.85, ORL군에서 1.30±0.76로 나타났다.

HFD군은 NC군에 비해 유의하게 증가되었으나, GGT 군과 ORL군에서는 HFD군에 비해 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 11).

12. FAS (fatty acid synthase)

NC군은 1.23 ± 0.34 로 나타났으며 HFD군에서는 5.56 ± 1.47 로 나타났고 GGT군에서는 3.23 ± 1.92 , ORL군에서 3.57 ± 1.71 로 나타났다.

HFD군은 NC군에 비해서 유의하게 증가되었고, GGT 군과 ORL군 모두에서 HFD군에 비해 유의한 감소가 나타났다(Fig. 12).

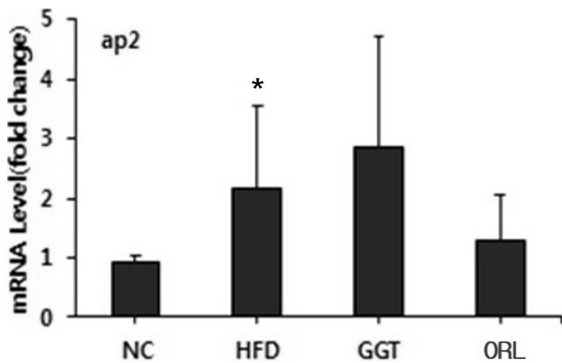


Fig. 11. mRNA Level of ap2.
NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group.
*represents $p < 0.05$ compared to the NC group.

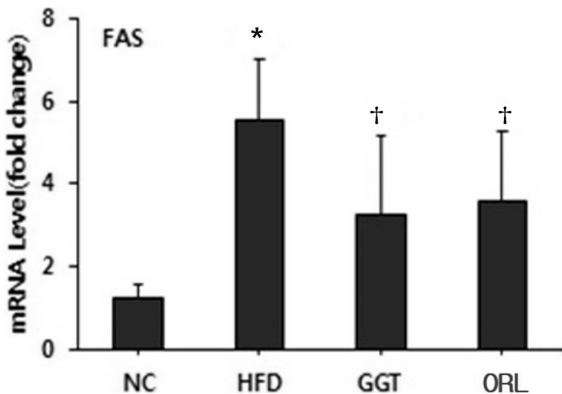


Fig. 12. mRNA Level of FAS.
NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group.
*represents $p < 0.05$ compared to the NC group, †represents $p < 0.05$ compared to the HFD group.

13. HMG-CoA-reductase (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase)

NC군은 1.05 ± 0.23 로 나타났으며 HFD군에서는 2.16 ± 0.71 로 나타났고 GGT군에서는 2.18 ± 1.26 , ORL군은 1.85 ± 0.71 로 나타났다.

HFD군은 NC군에 비해 유의한 증가가 나타나지 않았고, GGT군과 ORL군에서도 HFD군에 비해 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 13).

14. 유전자 분석 결과

실험에서 조사한 비만 관련 유전자 SREBP-1c, PPAR γ , C/EBP α , Leptin, LPL, FATP1, ACS1, CPT1, aP2, FAS, HMG-CoA-reductase 가운데, 변화가 나타난 유전자의 관련성을 알아보기 쉽게 도식으로 표현하였다(Fig. 14).

고찰

한약 단일추출물 혹은 복합처방을 이용한 비만 유전자 발현과 관련된 선행 연구들이 많이 이루어진 바 있는데, 經身解脂丸을 암컷 비만 쥐에 투여하여 PPAR γ 의 감소와 혈중 leptin농도의 증가를 관찰한 연구¹⁷⁾가 있고, 經身降脂丸¹⁸⁾이 NMu2Li 간세포, C2C12 골격근 세포 및 3T3-L1 지방전구세포의 동물세포주에서 PPAR α 와 PPAR δ 의 action을 효과적으로 촉진¹⁸⁾한다는 연구가 있으며, 느티만

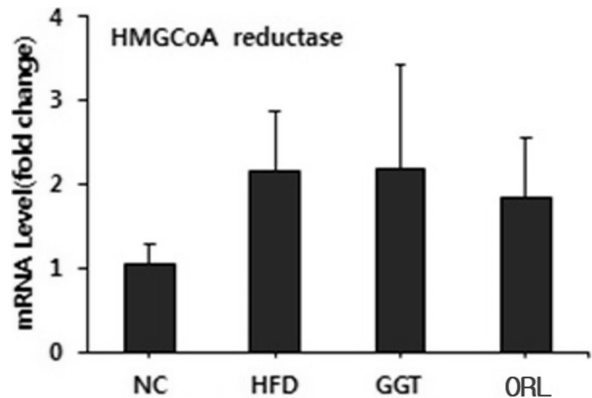


Fig. 13. mRNA Level of HMGCoA reductase.
NC: normal diet group, HFD: high fat diet group, GGT: GGT treated group, ORL: Olistat treated group.

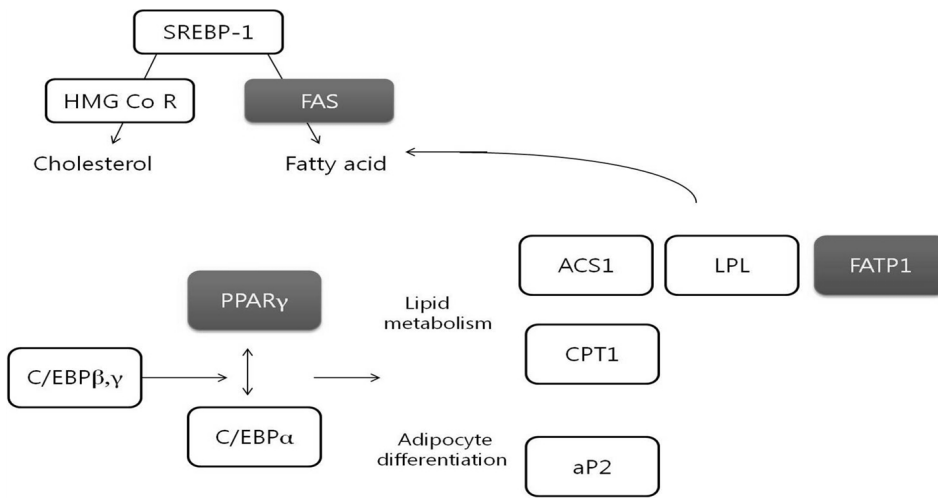


Fig. 14. The results, Blue indicates that gene expression was reduced in GGT group compared to HFD group. Red Indicates that gene expression was increased in GGT group compared to HFD group.

가다버섯 분말이 고지방식이로 비만이 유도된 수컷 쥐에서 PPAR γ , SREBP-1c, SCD-1 발현을 억제하고, 체중 감소, 체지방축적 억제, 혈청 지방 수준 개선에 유의한 효과가 있었다는 보고도 있다¹⁹⁾. 산사육복합방이 고지방식이로 비만이 유도된 쥐에서 지방조직 내에 β 3AR mRNA, serotonin mRNA, leptin mRNA 유전자 발현을 유의하게 감소시켰고²⁰⁾, 防風通聖散이 고지방식이로 비만이 유도된 쥐의 지방 조직에서 leptin 발현을 감소시키고, β 3AR 발현을 증가시켰다는 보고도 있다²¹⁾.

최근 갈근 단미 제제를 이용한 비만 연구가 보고된 바 있고¹⁶⁾, 마황의 경우는 단기간 내 체중감소와 운동 수행 능력 향상 등을 목적으로 비만치료에 많이 활용되고 있는 단일 약물이다²²⁾. 본 연구는 갈근과 마황을 주요 구성 약재로 하는 갈근탕이 비만에 어떤 영향을 미치는 알아보기 위하여 실험을 수행하였다.

갈근탕의 주약제인 갈근의 구성 성분인 puerarin은 말초 혈액 순환과 관상동맥 순환을 촉진시켜 혈류량을 증가시키고, daidzein은 근육의 경련을 억제하며 acetylcholine이 부교감신경을 자극하여 말초혈관 확장 및 뇌기능을 활성화 한다⁶⁾. Genistein은 LDL산화 억제효과와 암세포 성장 억제 효능이 있으며²³⁾, 갈근의 isoflavone계열 화합물에 estrogen receptor에 작용하는 phytoestrogen 물질이 존재한다고 보고되었다²⁴⁾. 갈근탕의 또 다른 주요 구성 약제인 마황은 pseudo ephedrine과 methyl ephedrine이 신사구체 분비를 통해 이뇨를 증진시키고⁶⁾, ephedrine은 간접적으로는 교감신경 내 신경세포 저장 부위에서 내인성 카테콜아민인 dopamine, norepinephrine, epi-

nephrine 등을 분비시켜 교감신경을 자극하며 직접적으로는 α , β 교감신경 효능제로 작용한다. 이러한 교감신경 자극은 혈관수축이나 혈압상승 등의 심혈관계 및 흥분, 각성, 불면 같은 중추신경계에 대한 작용 외에도 發汗, 체중감량효과 등이 있다²⁵⁾.

지방세포 유전자 조절부위에 전사활성 인자가 활성화되어야 지방전구세포에서 성숙한 지방세포로의 분화가 이루어진다²⁶⁾.

지방세포의 분화를 조절하는 전사인자에는 SREBPs, PPARs, C/EBPs, 등이 있다²⁷⁻³⁰⁾. 지방세포 분화 초기에 insulin이나 dexamethasone 등과 같은 호르몬 유도에 의해 C/EBP β 의 발현이 먼저 나타나게 되고 C/EBP β 가 활성화되면 분화 후기에 지방세포의 전사 인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현이 유도된다³¹⁻³³⁾.

C/EBP α 는 PPAR γ 와 상호 작용하여 영향을 미치는데³⁴⁾ C/EBP α 는 adipose tissue의 특이적 유전자들의 발현 전에 증가하여 에너지 항상성을 조절³⁵⁾하고 PPAR γ 는 adipogenesis의 주요 조절자로 백색지방조직에서 많이 발현된다³⁶⁾.

실험결과를 살펴보면 adipogenesis의 주요 조절인자인 PPAR γ 수치가 증가된 HFD군에 비해 GGT군에서 유의한 감소가 있음이 나타났다. 이는 갈근탕이 지방생성 주요 역할을 하는 유전자에 작용하며 비만 조절 가능성이 있음을 보여준다.

C/EBP α 와 PPAR γ 의 활성화가 되면 지방세포의 표현형을 결정하는 지방조직 특이적 유전자인 terminal marker들의 발현이 유도된다. Terminal marker에는 지방대사

에서 지방산 수송에 관여하는 FATP, LPL, ACS, 지방산 산화에 관여하는 CPT와 지방세포 분화에 관여하는 aP2 등이 있다. 이러한 전사 인자들의 조절을 통해 지방세포 분화가 일어나며 그 결과로 중성 지방의 lipid droplet이 세포질에 나타나서 커지고 합쳐져 지방세포 분화가 완료된다³⁷⁻³⁹).

LPL은 lipoprotein을 monoacylglycerol과 fatty acid로 가수분해하는 주효소이다. 식이 섭취 후에 LPL 활성이 증가하여 lipoprotein의 대사에 관여하고 과잉 에너지를 중성지방 형태로 지방세포에 저장시키며⁴⁰ 동맥내벽 세포에 LDL receptor의 결합력을 높이고 cholesterol 흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있다⁴¹.

FATPs는 발현이 과다할 경우 fatty acid의 저장을 증가시킨다고 보고되어 있다. FATPs의 하위 형태들은 각각 다른 조직에서 각기 필요로 하는 대사 활동을 특이적으로 수행하는 역할을 한다. 그 중 FATP1은 skeletal muscle과 adipose tissue에서 특이적으로 높게 발현되는 것으로 보고되고 있다^{42,43}.

본 실험상에서 HFD군에 비해 GGT군에서 FATP1이 오히려 더 높은 수치를 나타내고 있다. 그런데 선행 연구들에서는 FATP1의 발현 증가가 fatty acid의 저장을 증가시킨다 할지라도 in vivo에서는 다양한 다른 단백질들과의 상호 작용을 통해 오히려 산화를 증가시킬 수도 있다는 추측을 하게 하는 결과들이 나와 다른 매개체들과 어떤 상호작용을 하는가에 대한 연구가 함께 진행될 필요가 있다⁴⁴라는 보고가 있어 이에 관련된 연구가 더욱 필요할 것으로 생각된다.

CPT-I은 fatty acid oxidation의 rate limiting 효소로 fatty acid를 미토콘드리아 내로 유입시키는데 관여한다⁴⁵. 지방산이 세포내로 유입되어 산화되기 위해서는 막 내부의 transferase를 필요로 하는데 CPT-I은 이러한 transferse의 하나로 지질 이용의 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴⁶.

Leptin은 adipocyte에서 분비되는 hormone이며 체지방량에 비례하여 혈중 농도가 증가하고, 섭식 중추에 작용하여 식이섭취량을 감소시킴으로 체중을 조절⁴⁷하는 cytokine이다.

Lipogenesis은 SREBPs와 PPAR등의 전사 인자에 의해 조절된다. SREBPs는 cholesterol과 fatty acid의 합성을 조절하는 것으로 보고되었다^{48,49}.

SREBPs는 SREBP-1과 SREBP-2가 있다⁵⁰. 그 중 SREBP-1은 전구지방세포 분화초기에 빠르게 유도되어 PPAR γ 와 Adipocyte 분화를 촉진시키고, 지방 대사에 관련된 유전자의 발현을 증가시켜 지방 대사를 촉진하는 역할을 한다⁵¹. SREBP-1은 지방과 간조직의 cholesterol과 fatty acid의 합성을 조절하는 핵 전사인자이며 FAS, stearyl CoA desaturase (SCD), long chain fatty acyl elongase, squalene synthase, HMG-CoA synthase, HMG-CoA reductase와 같은 지질 생성 관련된 유전자의 promotor에 결합한다⁵².

HMG-CoA reductase는 cholesterol 생합성 단계에서 작용하는 rate limiting 효소이며 생합성 경로의 중간단계인 mevalonic acid의 합성을 매개하는 역할을 한다⁵³. 혈장에서의 콜레스테롤 조절은 혈중에 콜레스테롤이 높아지면 간에서 효소의 합성이 낮아져 혈중에서 간으로 콜레스테롤 이동을 촉진하고 혈중 콜레스테롤 농도가 낮아져 체내 요구량이 높아지면 효소의 발현이 증가되어 콜레스테롤 합성을 촉진한다⁵⁴.

FAS는 fatty acid 생합성에 관여하는 효소이다. 지방산이 간에서 합성되면 중성지방으로 전환되어 VLDL의 형태로 혈관을 돌아다니며 지방조직에 중성지방을 전달한다. FAS의 농도는 혈중 중성지방 농도⁵⁵와 SREBP-1의 조절⁵⁶을 받는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서 FAS의 경우 HFD군에 비해 GGT군에서 감소된 수치를 얻었다. 이는 지방합성 및 수송에 관여하는 인자의 감소로 lipid droplet 및 triglyceride의 생성 촉진⁵⁷의 저하 가능성을 말해준다.

실험 결과 체중감소와 더불어 GGT군에서 지방세포 분화의 핵심 조절인자인 PPAR γ 와 지방 합성과 수송에 영향을 주는 FAS에서 유의미한 수치 감소가 있었다. 그러나 FATP1의 경우에는 오히려 증가하였다. 따라서 갈근당이 비만 치료에 있어 일정부분 역할을 할 것으로 생각은 되나 앞으로 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

결론»»»»

갈근당(GGT)이 비만관련 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 고지방식으로 비만이 유도된 쥐의 간 조직에서 비만 관련 유전자들의 발현 정도를 측정하여

다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중이 GGT군과 ORL군에서 HFD군에 비해 감소하였다.
2. 고지방식으로 비만이 유도된 쥐의 간 조직에서 정상군에 비해 PPAR γ , SREBP-1, aP2, Leptin, FATP1, FAS 유전자 발현이 증가되었다.
3. GGT군에서 HFD군에 비해 PPAR γ , FAS 유전자 발현이 감소되었다.
4. GGT군에서 HFD군에 비해 FATP1 유전자 발현이 더 증가되었다.

실험 결과 갈근탕이 체중 감소 및 비만 관련 유전자 발현에 일정한 영향을 주고 있다는 것을 확인하였으며, 이는 갈근탕이 비만 치료에 일정한 영향을 미칠 수 있다는 것을 시사하는 것이다. 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References>>>>

1. Ministry of Health and Welfare. Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES). 2014.
2. Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats-new model of obesity. *Am J Physiol* 1978;235:E279-86.
3. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.
4. Hong CR. Inhibitory effect of Cori fructus ethanolic extracts on adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. Master's degree. Incheon: Inha University. 2009.
5. Hwang MJ, Shin HD, Song MY. Literature Review of Herbal Medicines on Treatment of Obesity Since 2000 - Mainly about Ephedra Herba. *J Korean Med Obes Res*. 2007;7(1):39-54.
6. Park YS. Herbal Pharmacology Commentary. Seoul: Academy books, 2002:113, 127, 197-202.
7. Yang TK, Kim YB, Chae BY. An Experimental study on the anti-allergic effects, anti-inflammatory action, anti-pyretic action and analgesic action of Galgeun-tang, Gamigalgeun-tang and Geomahwanggalgeun-tang. *J Orient Med Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology* 2002;15(1):76-95.
8. Ha HK, Lee JK, Lee MY, Lim HS, Shin HK. Galgeun-tang, an Herbal Formula, Ameliorates Atopic Dermatitis responses in Dust Mite Extract-treated NC/Nga Mice. *J Korean Med*. 2013;34(4):1-11.
9. Kim DR, Kwak GS, Jeong SM, Lee SC and Ha. JU. Comparison of the Antioxidative Abilities of Commercial Gal Geun Tang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2003; 32(5):728-32.
10. Shin JM. Screening of Antiaging Compound from Galgeuntang and the Roots of Pueraria thunbergiana Benth. Wonkwang University. 2007.
11. Cho DY. Effect of Gal-Geun-Tang on Antigen-Specific Immune Response. Wonkwang University. 2005.
12. Kim SB. The effects of proliferation and differentiation on adipocyte 3T3-L1 by prescriptions and herbs of Tae-yang In and Tae-um In. *J Sasang Constitut Med*. 1998;10(2):533-64.
13. Shekelle PG, Hardy ML, Morton SC, Maglione M, Mojica WA, Suttorp MJ, et al. Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. *JAMA*. 2003;289(12):1537-45.
14. Song MY, Kim HJ. Analysis of Main Single Medicinal Herbs for Anti-Obesity. *J Korean Med Obes Res* 2013; 13(2):51-7.
15. Kang SC, Lee CM, Choi H, Lee JH, Oh JS, Kwak JH, Zee OP. Evaluation of oriental medicinal herbs for estrogenic and antiproliferative activities. *Phytother Res*. 2006;20(11):1017-9.
16. Shin HJ, Yoo JE, Jung EH, Yoo DY. Effects of Pueraria lobata body weight and gene expression in obese rats muscle with estrogen deficiency. *J Orient Gynecol*. 2012; 25(3):71-84.
17. Yoon KH, Yoon MC, Kim H, Shin SS. Changes in mRNA Expression of Obesity-related Genes by Gyeongshinhae-Gihwan 1(GGT1) in hGHTg (human growth hormone transgenic) obese Female Rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 2006;20(2):383-7.
18. Oh JH, Ahn YJ, Lee HR, Lim HS, Lee HH, Yoon MC, Shin SS. Comparison among GGEx16, GGEx18 and gambitongseong-capsule for anti-obesity gene activity. *Kor. J. Herbology* 2013;28(2):39-44.
19. Ryu HJ, Um MY, Ahn JY, Jung CH, Huh D, Kim TW, and Ha TY. Anti-obesity Effect of Hypsizigus marmoreus in High Fat-fed Mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2011;40(12):1708-14.
20. Kim HJ, Hong SY, Heo DS, Yoon IJ, Oh MS. The Inhibitory Effects of Sansayukbokhap- bang (SSYBHB) on the Obese-Mouse Induced High Fat Diet. *J Korean Med Obes Res*. 2008;8(1):33-49.
21. Hwang SJ, Song TW, Oh MS. The inhibitory Effects of Bangpungtongseoung-san on the Obese gene and Obese Inhibitory about Obese-mouse induced by High Fat Diet. *J Korean Oriental Med* 2006;27(1):11-22.
22. Shekelle PG, Hardy ML, Morton SC, Maglione M, Mojica WA et al. Efficacy and Safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis.

- JAMA. 2003;289(12):1537-45.
23. Qi W, Weber CR, Wasland K, Savkovic SD. Genistein inhibits proliferation of colon cancer cells by attenuating a negative effect of epidermal growth factor on tumor suppressor FOXO3 activity. *BMC Cancer*. 2011;11(1):219.
 24. Kang SC, Lee CM, Choi H, Lee JH, Oh JS, Kwak JH, Zee OP. Evaluation of oriental medicinal herbs for estrogenic and antiproliferative activities. *Phytother Res*. 2006; 20(11):1017-9.
 25. Lee KH, Ahn DK, Shin MK, Kim CM. Dictionary of Chinese medicine. Seoul:Jeong Dam Books. 2006:1000, 3081.
 26. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev*. 1998;78(3):783-809.
 27. run RP, Kim JB, Hu E, Altiock S, Spiegelman BM. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory. *Curr. Opin. Cell. Biol*. 1996;8:26-832.
 28. Gregoire FM, Smas CM. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev*. 1998; 78:783-809.
 29. Saitoa T, Abea D and Sekiya K. Flavanone exhibits PPAR γ ligand activity and enhanced differentiation of 3T3-L1 adipocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009;308:281-5.
 30. Tontonoz O, Hu E. and Spiegelman BM. Regulation of adipocyte of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 1995;5:571-6.
 31. El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmar SR. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR gamma and C/EBP alpha. *J. Biol. Chem*. 1999;274:7946-51.
 32. Fox KE, Fankell DM, Erickson PF, Maika SM, Crossno JT, Klemm DJ. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT, enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C,EBP beta, or PPAR gamma 2. *J. Biol. Chem*. 2006;286:40341-53.
 33. Hamm JK, Park BH, Farmar SR. A role of C/EBP beta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocyte. *J. Biol. Chem*. 2001;276:18464-71.
 34. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*. 1991;5:1538-52.
 35. Long SD, Pekala PH. Lipid mediators of insulin resistance: ceramide signalling down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem*. 1996; 319:179-184.
 36. Spiegelman BM. "PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor," *Diabetes*, 1998;47(4):507-14.
 37. El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmar SR. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR gamma and C/EBP alpha. *J. Biol. Chem*. 1999;274:7946-51.
 38. Fox KE, Fankell DM, Erickson PF, Maika SM, Crossno JT, Klemm DJ. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CAAT,enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C,EBP beta, or PPAR gamma 2. *J. Biol. Chem*. 2006;286:40341-53.
 39. Hamm JK, Park BH, Farmar SR. A role of C/EBP beta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocyte. *J. Biol. Chem*. 2001;276:18464-71.
 40. Lee JJ, Chun CS, Kin JG, Choi BD. Effect of fasting re-feeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase activity and lipogenesis: Influence of food restriction during refeeding. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 2000;29:471-8.
 41. O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, Chait A. Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest*. 1992;89:1544-50.
 42. Gimeno RE. Fatty acid transport proteins. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:271-6.
 43. Holloway GP, Chou CJ, Lally J, Stellingwerff T, Maher AC, Gavrilova O, Haluzik M, Alkhateeb H, Reitman ML and Bonen A. Increasing skeletal muscle fatty acid transport protein 1 (FATP1) targets fatty acids to oxidation and does not predispose mice to diet-induced insulin resistance. *Diabetologia* 2011;54:1457-67.
 44. Kim HJ and Lee WJ. Insulin-like Growth Factor-I Induces FATP1 Expression in C2C12 Myotubes. *J Life Sci*. 2014;24(12):1284-90.
 45. Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, Watt MJ, Allen TL, Carpenter K, Cooney GJ, Febbraio MA, Kraegen EW. Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 2009;58(3):550-8.
 46. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyl transferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997;15:1-14.
 47. chwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404:661-71.
 48. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P and Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14:1293.
 49. Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins : transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc.Trans*. 2002;30:1091.
 50. Rodríguez-Cantú LN, Gutiérrez-Urbe JA, Arriola-Vucovich J, Díaz-De La Garza RI, Fahey JW, Serna-Saldivar SO. Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and ex-

- tracts rich in glucosinolates and isothiocyanates affect cholesterol metabolism and genes involved in lipid homeostasis in hamsters. *J. Agr. Food Chem.* 2011;59:1095-103.
51. KIM JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 1996;10:1096-107.
52. Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins : transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 2002;30:1091.
53. Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid Res.* 1992;33:1569-82.
54. Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, Mamo J, Croft K, Allister E. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *J. Nutr.* 2003;133:700-6.
55. Agheli N, Kabir M, Berni-Canani S, Petitjean E, Boussairi A, Luo J, Bornet F, Slama G, Rizkalla SW. Plasma lipids and fatty acid synthase activity are regulated by short-chain fructo-oligosaccharides in sucrose-fed insulin-resistant rats. *J. Nutr.* 1998;128:1283-8.
56. Shimano H. SREBPs: Physiology and pathophysiology of the SREBP family. *FEBS J.* 2009;276:616-21.
57. Park SJ, Lee IS, Lee SP, Yu MH. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by supercritical fluid extracts and marc from *Cinnamomum verum*. *J Life Sci* 2013;23:510-7.