

Herbal Black Vinegar and the Anti-obesity Complications *in vivo*

Dongsub Lee^{1,*} and Sangwook Park^{2,†,*}

¹Department of Healthcare & Biotechnology, College of Aeroservice,
Kyungwoon University, Gumi 39160, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health and Nurse,
Kyungwoon University, Gumi 39160, Korea

Black vinegar has been traditionally used for supplemental flavoring on food, and commercialized beverages. Here, to investigate the effects on *in vivo* anti-obesity complications of black vinegar produced with herbal extracts, we evaluated on the biochemical effects of high-fat diet (HFD) induced mice compared to control fed ones. After a 84-day experiment HFD mice had higher ($P < 0.05$) weight gains, relative abdominal-fat pads, blood glucose level, serum/liver lipids, and serum nephron indices. Continuous oral treatment of three different concentration of herbal black vinegar (HBV; stock, 2-fold, and 4-fold diluted solution) to HFD mice showed that HBV reduced marked obesity (fat depositions, adipocyte hypertrophy), hyperglycemia, hyperlipidemia (serum total cholesterol, triglyceride, LDL- cholesterol levels), enhanced liver function (AST/ALT), and kidney function (BUN, creatine levels), respectively. Thus, HBV is expected to serve as an efficient and functional supplemental ingredients or food for the alleviation of obesity syndrome.

Key Words: HBV (Herbal black vinegar), Anti-obesity, High-fat diet (HFD)

서 론

전세계적으로 비만은 국제적인 노력과 인식의 변화가 증대되었음에도 불구하고 계속해서 증가하고 있다. 본질적으로 비만은 과잉섭취, 잘못된 식습관, 사회적 활동량 감소와 유전적, 사회경제적, 환경적 요인과 결합하여 에너지 대사의 항상성에 문제가 발생하여 일어난다(Mitchell et al., 2005; Monasta et al., 2010). 최근에, 제2형 당뇨병으로 알려진 대사증후군과 관련된 비만 발생률이 전세계적으로 증가하고 있는데 그 발병률은 고칼로리 음식섭취와 신체 비활동성의 결과로 보인다(James et al., 2001). 2025년에는 두 배 이상 증가하여 3억명이 이를 것으로 추정한다

(Zimmet, 2003). 지방산의 과다섭취는 많은 조직, 특히 지방조직에서 지질분해가 증가하게 되어 트리글리세라이드(중성지방) 축적을 초래한다. 지방산의 순환이 증가하면서 인슐린 저항성과 함께 지방세포의 지방산 순환이 증가하면서 근육, 췌장, 간 같은 비 지방산 조직에도 지방산이 쌓이게 된다. 쥐의 비만 모델은 고지방 식단에 의해 개발되었고 고혈당, 인슐린 저항성, 간성지질(hepatic steatosis), 가벼운 당뇨병 콩팥증, 고지방증의 특징을 가지고 있다(Yun et al., 2007). 고대부터 식초는 다양한 음식 또는 약용 식품으로 사용되어 왔다. 현대는 일반음식의 보존재로서 음식에 향미를 더해주는 양념으로써 세계 여러 문화권에서 애용되어 왔다(Johnston and Gaas, 2006). 또한, 감염질환, 심혈관 질환, 비만 등에 효과가 있는 의학적인 목적으로

Received: September 17, 2018 / Revised: November 21, 2018 / Accepted: December 10, 2018

*Professor.

†Corresponding author: Sangwook Park. Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health and Nurse, Kyungwoon University, Gumi 39160, Korea.

Tel: +82-54-479-1282, Fax: +82-54-479-1280, e-mail: spark367@ikw.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

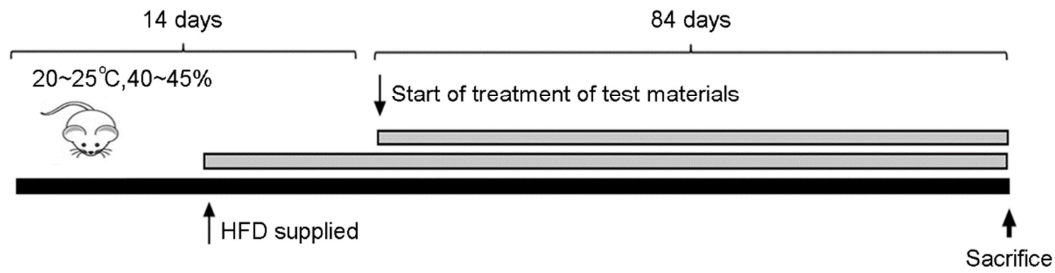


Fig. 1. Adaptation and selection of HFD mice for examining the anti-obesity activities. Seven groups were prepared and used in this study. Total 56 adapted mice on HFD were selected based on the body weight at 7 days after initiation of HFD supply, and 2 mice in each group were removed based on the standard deviation of body weight at end of 84 days of administrations or mortalities; 6 mice per groups, total 42 mice were sacrificed. All test materials and two different reference drugs were directly diluted or dissolved in distilled water, and administered in a volume of 10 mL/kg, once a day for 84 days from 1 week after HFD supply. HFD, high-fat diet; HBV, herbal black vinegar.

도 사용되었다. 식초는 곡물과 과일 등을 효모를 이용한 알코올 발효와 세균의 연속적인 초산발효를 거쳐 생산된다. 우리는 지난 연구에서 한약재가 첨가된 한방흑초의 항비만 효과를 지방대사 분해와 연관된 AMPK와 ACC의 변화를 세포에서 관찰하였다(Lee and Park, 2017).

본 연구의 목적은 한약재로 만든 한방발효흑초(Herbal black vinegar, HBV)의 *in vitro* 결과를 토대로, 고지방식이 HFD (45%/Kcal) 식단으로 비만 생쥐 모델을 유도하고, 12 주 동안 고지방식이 비만 생쥐에게 HBV를 복용한 후, 간 기능 보호, 지방분해, 저혈당, 콩팥기능 보호 등 약리학적 인 항비만 효과를 관찰함으로써 HBV의 항비만 효능을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

한방약재 성분조합 및 발효조건

비만에 효과가 있는 한약재를 식약처 기준 식용으로 분류된 한약재의 최적 혼합비를 물 3 L 기준에 강황, 율무, 결명자를 100 g, 백지, 현삼은 150 g, 당귀는 300 g으로 한약재 조합비율을 구성하였다. 한약재를 90°C, 24 hr 열수 추출(hot water extraction)한 후 감압 농축기로(EYELA, Japan) 당도 15~25 brix(brix: 과실 100그램에 녹아 있는 당의 무게)로 농축하였다. 한방 추출액에 효모균(*Saccharomyces sp.*)을 2% (v/v)되게 접종하고 28°C, 36 hr 배양한 후 한약재 발효액의 15% (v/v)을 다시 1차 알코올 발효시키고 주 모균주인 효모균(*Saccharomyces sp.*) 3~5% (v/v)로 접종하여 30°C, 5~7일간 교반하지 않고 무산소성 조건으로 배양하여 최종 1차 발효 후 도수 6%로 맞추었다. 2차 발효에는 초산균(*Acetobacter aceti*)을 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$ CFU

로 사용하였다. 30°C, 10일간 산소성 조건에서 교반하여 (150 X G) 배양하였다. 발효과정의 종료 후 고형성분과 잔류 균주를 제거하기 위해 100°C 20 min 가열하여 살균 후 필터 프레스로(SINO, China) 고형분을 제거하고 한방발효 흑초 원액을 제조하였다.

표준원액 및 한방발효식초

HBV 표준원액은 보존을 위해 빛을 차단하고 4°C 냉장고에 보관하여 필요할 때 사용하였다. 2배, 4배 희석액을 증류수에 잘 녹여 준비하였다. Metformin (Wako pure medicine, Japan)과 silymarin (Sigma, USA)은 참고약물로 빛과 수분 증발을 최소화하기 위해 냉장고에 보관하여 사용하였다. Metformin과 silymarin은 지질과 포도당 대사의 조절인자인 AMPK를 활성화하는 물질로 사용되는 대표적인 약제이다. 은 항산화 및 간보호 약제로 사용되고 있다. 포도당 합성을 저해하고 흡수되는 것을 3가지 농도의 HBV 표준액(원액, 2배, 4배 희석액)은 HFD 공급 후 1주일이 되는 날부터 84일 동안 하루에 한 번 kg당 10 mL씩 복용시켰고, Metformin과 Silymarin은 kg당 각각 250 mg, 100 mg을 증류수에 녹여 복용시켰다(Fig. 1). 고지방식이 HFD (45%/Kcal) (Diet Research, USA)가 실험군 36마리에게 제공되었으며 대조군 6마리에게는 일반 펠릿 사료(Superfeed Co., Korea)가 제공되었다.

동물실험

본 실험은 대구한의과대학 동물실험실 규정에 따라 의뢰 수행되었다(DHU2011-021). 본 실험에서 사용한 6주령 암컷 112마리 ICR 생쥐는 동물실험실에서 적응한 후 7일째 실험에 사용하였다(SLC, JAPAN). 20~25°C 온도와 40~

Table 1. Experimental dosage of treated drugs and herbal black vinegar (HBV) used for HFD

Group	Diets	Dose (mg/kg/day)	Treatment drug
Control	Norma pellet	10 mL/kg	Vehicle (distilled water)
	HFD pellet	10 mL/kg	Vehicle
References	HFD pellet	100 mg/kg	Silymarin 100 mg in 10 mL of distilled water
	HFD pellet	250 mg/kg	Metformin 250 mg in 10 mL of distilled water
Active	HFD pellet	Stock	HBV stock solution 10 mL
	HFD pellet	2-fold dilution	HBV 2-fold dilution solution 10 mL
	HFD pellet	4-fold dilution	HBV 4-fold dilution solution 10 mL

Abbreviations: HFD, high fat diet; HBV: herbal black vinegar

Seven groups (total 56 adapted mice on HFD were selected base on the body weight at 7 days after initiation of HFD supply, and 2 mice in each group were removed based on the standard deviation of body weight at end of 84 days of administrations or mortalities; finally 6 mice per groups, total 42 mice were sacrificed) were used in this experiment. All test materials and two different reference drugs were directly diluted or dissolved in distilled water, and administered in a volume of 10 mL/kg, once a day for 84 days from 1 week after HFD supply

Table 2. Formulas of normal and high fat diet (HFD) mice used in this study

	Normal pellet diets (g/kg diet)	High fat diets (g/kg diet) ^a
Ingredient		
Casein	200	200
L-Cystein	3	3
Corn starch	150	72.8
Sucrose	500	172.8
Cellulose	50	50
Soybean oil	50	25
Lard	0	177.5
Mineral mixture	35	10
Vitamin mixture	10	10
Choline bitartrate	2	2
Energy (kcal/g)	0.21	4.73
Protein (% kcal/kg)	13.3	20
Carbohydrate (% kcal/kg)	47.4	35
Fat (% kcal/kg)	8.0	45
Fiber (% kcal/kg)	8.0	8.0

45% Kcal/Fat pellet diets (D12451; Diet research, PA, USA) were used as high fat diet (HFD) and normal rodents pellet diet (Superfeed Co., Korea) were used as normal diets

45% 습도에서 케이지당 4마리씩 분리 수용하였으며 물과 사료를 제한없이 공급하였다. 실험기간 동안 96마리의 생쥐를 실험군으로 선별하여 HFD를 공급하였고 16마리의 생쥐에게는 설치류 보통 펠릿 식단을 제공하였다(Table 2).

HFD 공급 7일 후 체중 기준으로 총 56마리의 적응된 생쥐가 신체 중량에 따라 선별되었고 다시 아래와 같이 7개의 그룹으로 나누어 최종적으로 42마리의 생쥐를 대상으로 실험을 진행하였다(Table 1).

- (1) 대조군: 일반 펠릿 식단과 증류수 제공(10 mL/Kg)
- (2) HFD 군: HFD 식단과 증류수 제공(10 mL/Kg)
- (3) Metformin 군: HFD 식단 제공 생쥐에 Metformin 제공(250 mg/Kg)
- (4) Silymarin 군: HFD 식단 제공 생쥐에 Silymarin 제공(100 mg/Kg)
- (5) HBV 원액군: HFD 식단 제공 생쥐에 한방발효후초 원액 제공(10 mL/Kg)
- (6) HBV 2배 희석액군: HFD 식단 제공 생쥐에게 한방 발효후초 2배 희석액 제공(10 mL/Kg)
- (7) HBV 4배 희석액군: HFD 식단 제공 생쥐에게 한방 발효후초 4배 희석액 제공(10 mL/Kg)

생리변화 측정

체중: HFD 공급시작 전후 자동 전자저울(Precisa Instrument, Switzerland)을 사용하여 종료될 때까지 매주 측정하였다. 먹이의 차이를 줄이기 위해 사료가 공급되는 시작과 종료 시점에서 하룻밤 금식시켰다.

혈당: 혈액을 대정맥에서 채혈하여 혈청을 원심분리한 후 자동혈액분석기를 사용하여 분석하였다(Hemagen Diagnostic, USA).

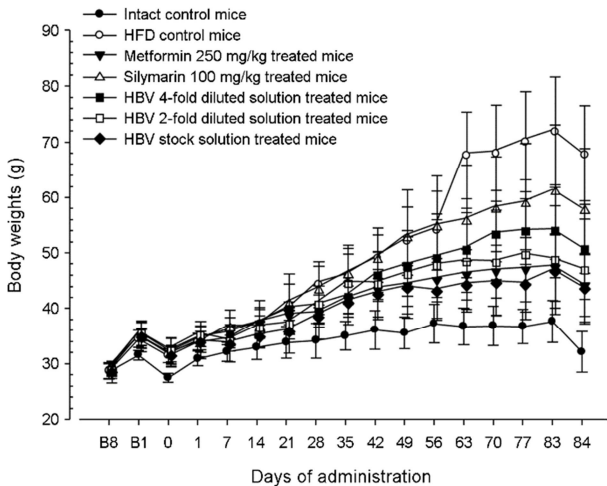


Fig. 2. Change of body weights during 84 days of continuous oral treatment of HBV in HFD. All HFD supplied mice were showed significant increased body weights as compared with intact mice from 1 week after HFD supply. Significant decreases of body weights were detected from 28 and 63 days after metformin and silymarin treatment as compared with HFD control, and significant decreases of body weights were also demonstrated in BV stock, 2- and 4-fold diluted solution treated mice as compared with HFD control from 21 or 63 days after administration, respectively. Values are expressed mean \pm S.D. of six mice. HFD, high fat diet; HBV, herbal black vinegar. B8 and B1 means 8 and 1 day before start of administration. Day 0 means start of administration day after overnight being fasted. Day 84 means at sacrifice after 84 days of continuous oral administration after overnight being fasted. Group ID was listed in Table 1.

조직 체중: 종료 시 간, 콩팥, 난소주변지방 패드는 절대 무게(g)로 측정하였고, 개별 체중의 차이를 최소화하기 위해 상대 체중(%)으로 계산하였다.

혈청 생화학검사: 종료 시, 마취상태에서 혈액 1 mL를 채혈하여 혈청분리튜브에 옮긴 후 실온에서 15,000 rpm, 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청 AST, ALT, 총 콜레스테롤, 중성지방, LDL 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, BUN, 크레아틴 값들은 자동혈액분석기를 이용하였다.

통계분석

HFD mice에게 제공한 한방발효식초와 표준약제에 대해서 다중비교 시험을 수행하였다. Variance homogeneity를 위해 Levene test를 수행하였다. 만약 Levene test가 유의미한 편차를 보이지 않으면 얻어진 데이터를 ANOVA 단측 검정으로 분석하였고 이어서 LSD (least-significant differences)를 수행하여 어느 비교군이 유의미한 값을 보이

는지 다중비교 시험을 하였다. 통계분석은 R (<https://cran.seoul.go.kr/>)을 이용하여 수행하였다.

결 과

한방발효식초 생리활성 성분분석

한방발효식초의 초산 함량은 4.9%로 낮았지만 식품공전 (KFDA, 2012)의 식초 규격에 적합한 범위에 포함되었다. 총폴리페놀 함량을 산출하기 위해서 표준계산식을 이용하여 1 N Folin-ciocalteu 시약 0.2 mL과 시료 0.1 mL을 첨가 후 진탕한 후 1분간 실온에서 반응시켰다. 20% Na_2CO_3 3 mL을 재 첨가하고 진탕한 후 2시간 실온에서 방치 후 765 nm 흡광도로 측정하였다. 본 HBV의 폴리페놀 함량은 233.36 ppm으로 분석되어 기존 제품(감현미 복합식초 109.21 ppm)에 비해 2.1배 높은 값을 나타내어 생리활성이 풍부한 발효식초임을 알 수 있었다.

한방발효식초의 비만 효과

항비만 *in vivo* 실험: 본 연구에서는, 일주일 동안 HFD를 섭취한 생쥐의 동물실험 결과를 체중, 1일 식사소비량, 지방세포의 침착 등 기초대사량의 변화와 생리병리학적 변화를 혈당저하, 간보호, 콩팥보호, 항고지혈증 및 항비만 효과로 구분하여 아래와 같이 비교 분석하였다.

(1) 체중과 1일 식사소비량의 변화

HFD 식이를 통해 체중이 정상적으로 증가한 마우스를 체중계측 실험에 사용하였다. HFD 식이를 한 생쥐는 84일 투여 동안에 체중이 증가하였다. 이렇게 체중이 증가한 생쥐를 대상으로 metformin과 silymarin을 처치한 마우스의 체중을 계측한 결과 HFD 대조 마우스에 비하여 각각 23일, 63일째 각각 체중이 감소하였다($P < 0.05$). HBV 원액과, 2배 희석액, 4배 희석액을 투여했을 때, HFD 식이 마우스의 체중 모두에서 감소함을 확인하였다(Fig. 2). 또한, HFD를 섭취한 마우스에서는 비HFD 식이 마우스에서 모두 평균 1일 식사소비량이 감소하였다. 하지만, HFD 대조군 마우스에 비해 metformin, silymarin, HBV 원액, 2배 희석액, 4배 희석액을 복용한 마우스는 -5.37%, -1.22%, 5.09%, -3.12%, 5.02%씩 각각 변화하여 정상 대조군에 비해 유의성 있는($P < 0.01$) 평균 사료섭취량의 감소가 일어나는 것을 모든 HFD 공급군에서 확인할 수 있었으나, HFD 대조군에 비해서는 유의한 1일 사료섭취량 변화는 없었다 (Table 5).

(2) 난소 주위지방 중량과 지방세포 직경의 변화

난소주변 지방은 정상 대조군에 비해 HFD 대조군의 무게가 증가하였고 두 참고시약(metformin, silmarin)과 3개의 희석액 HBV(원액, 2배 희석액, 4배 희석액)를 섭취한 마

우스 투여군에서 HFD 대조군에 비해 난소주위 지방 중량 무게가 모두 감소하였다(Table 3). 한편, 정상 대조군에 비해 HFD 대조군의 경우 난소주위 지방세포 직경이 증가하였고 모든 투여군에서 HFD 대조군에 비해 난소주위

Table 3. Body weight gains and fat weight detected in HFD mice in this study

Groups	Gains during		Periovarian fat weights	
	Adapt period (7 days)	Administration period (84 days)	Absolute (g)	Relative (% of body weights)
Controls				
Intact	2.93±1.05	4.62±3.21	0.061±0.032	0.187±0.097
HFD	5.75±1.28 ^a	36.68±9.31 ^a	1.344±0.154 ^c	1.980±0.112 ^a
References				
Metformin	6.17±1.35 ^a	12.45±5.92 ^c	0.360±0.115 ^{eg}	0.829±0.332 ^{ac}
Silymarin	5.32±1.32 ^a	26.03±10.66 ^{ad}	0.664±0.164 ^{eg}	1.194±0.466 ^{ac}
HBV diluted				
Stock	6.32±1.05 ^a	12.18±5.28 ^c	0.316±0.101 ^{eg}	0.729±0.244 ^{ac}
2-fold	6.68±1.74 ^a	14.52±7.81 ^{ac}	0.383±0.142 ^{eg}	0.787±0.217 ^{ac}
4-fold	6.32±1.78 ^a	18.57±6.70 ^{ac}	0.554±0.072 ^{eg}	1.124±0.317 ^{ac}

Values are expressed mean ± S.D. of six mice

Abbreviations: HFD, high fat diet; HBV: herbal black vinegar

^a $P < 0.01$ and ^b $P < 0.05$ compared with intact control by Least Significant Difference (LSD) test

^c $P < 0.01$ and ^d $P < 0.05$ compared with HFD control by LSD test

^e $P < 0.01$ and ^f $P < 0.05$ compared with intact control by Mann-Whitney (MW) test

^g $P < 0.01$ and ^h $P < 0.05$ compared with HFD control by MW test

Table 4. Mean diameters of adipocyte with periovarian fat pad thickness detected in HFD mice in this study

Groups	Mean diameters (µm)		Abdominal fat pad thicknesses (mm)
	Periovarian adipocytes	Abdominal adipocytes	
Controls			
Intact	73.48±11.99	74.65±8.28	1.05±0.25
HFD	307.61±9.63 ^e	236.06±15.97 ^a	5.22±0.54 ^e
References			
Metformin	140.24±5.19 ^{eg}	115.10±17.14 ^{ac}	2.83±0.94 ^{eg}
Silymarin	224.24±26.58 ^{eg}	137.34±11.46 ^{ac}	3.45±0.47 ^{eg}
HBV diluted			
Stock	106.40±10.01 ^{eg}	83.07±5.88 ^{ac}	1.65±0.45 ^{eg}
2-fold	125.85±9.02 ^{eg}	99.10±8.39 ^{ac}	2.10±0.17 ^{eg}
4-fold	143.40±10.82 ^{eg}	112.70±10.49 ^{ac}	2.77±0.43 ^{eg}

Values are expressed mean ± S.D. of six mice

Abbreviations: HFD, high fat diet; HBV: herbal black vinegar

^a $P < 0.01$ and ^b $P < 0.05$ compared with intact control by Least Significant Difference (LSD) test

^c $P < 0.01$ and ^d $P < 0.05$ compared with HFD control by LSD test

^e $P < 0.01$ and ^f $P < 0.05$ compared with intact control by Mann-Whitney (MW) test

^g $P < 0.01$ and ^h $P < 0.05$ compared with HFD control by MW test

지방세포 직경의 감소를 나타내었다. 복부벽 지방세포의 직경은 정상 대조군에 비해 HFD 대조군이 경우 복부벽 지방세포 직경이 증가하였고, 참고시약과 3개의 희석액 HBV를 섭취한 마우스 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 복부벽 지방세포 직경의 감소를 확인하였다. 따라서 복부벽 지방 두께 또한 정상 대조군에 비해 증가하였고 HBV

등을 투여한 마우스 투여군에서는 복부벽 지방세포 직경이 감소하였다(Table 4).

(3) 한방발효식초의 혈당에 미치는 효과

정상 대조군에 비교했을 때, HFD 대조군의 혈당 증가를 관찰할 수 있었다. 정상 대조군에 비해 HFD 대조군의

Table 5. Mean daily food consumption and with blood glucose levels detected in HFD supplied mice in this study

Groups	Mean food consumption (g/mouse/day)	Serum glucose levels (mg/dL)
Controls		
Intact	5.82±1.13	95.83±9.33
HFD	4.33±0.39 ^e	260.50±52.24 ^e
References		
Metformin	4.09±0.47 ^e	146.83±8.86 ^{eg}
Silymarin	4.27±0.61 ^e	201.33±25.44 ^{eh}
HBV diluted		
Stock	4.55±0.72 ^e	108.83±10.96 ^g
2-fold	4.19±0.48 ^e	129.83±10.53 ^{eg}
4-fold	4.54±0.66 ^e	143.00±12.84 ^{eg}

Values are expressed mean ± S.D. of six mice

Abbreviations: HFD, high fat diet; HBV: herbal black vinegar

^aP<0.01 and ^bP<0.05 compared with intact control by Least Significant Difference (LSD) test

^cP<0.01 and ^dP<0.05 compared with HFD control by LSD test

^eP<0.01 and ^fP<0.05 compared with intact control by Mann-Whitney (MW) test

^gP<0.01 and ^hP<0.05 compared with HFD control by MW test

Table 6. Serum lipid level detected in HFD supplied mice in this study

Groups	Serum levels (mg/dL)			
	Total cholesterol	Triglyceride	LDL	HDL
Controls				
Intact	107.83±14.74	48.83±14.07	12.83±1.47	94.33±15.69
HFD	210.67±21.13 ^a	207.00±18.56 ^a	30.67±2.58 ^e	41.67±12.64 ^a
References				
Metformin	152.17±13.00 ^{ac}	132.17±16.53 ^{ac}	20.50±1.87 ^{eg}	61.33±7.69 ^{ac}
Silymarin	160.33±11.59 ^{ac}	144.83±15.09 ^{ac}	21.67±3.14 ^{eg}	57.00±11.05 ^{ad}
HBV diluted				
Stock	123.17±15.57 ^c	97.50±20.93 ^{ac}	14.33±3.72 ^g	74.17±9.15 ^{ac}
2-fold	138.17±12.30 ^{ac}	119.00±17.99 ^{ac}	17.17±2.64 ^{fg}	67.50±14.40 ^{ac}
4-fold	147.83±17.03 ^{ac}	131.33±11.54 ^{ac}	20.83±3.25 ^{eg}	61.67±4.68 ^{ac}

Values are expressed mean ± S.D. of six mice

Abbreviations: HFD, high fat diet; HBV: herbal black vinegar

^aP<0.01 and ^bP<0.05 compared with intact control by Least Significant Difference (LSD) test

^cP<0.01 and ^dP<0.05 compared with HFD control by LSD test

^eP<0.01 and ^fP<0.05 compared with intact control by Mann-Whitney (MW) test

^gP<0.01 and ^hP<0.05 compared with HFD control by MW test

혈당은 171.83%의 증가를 나타내었으며, 참고시약과 3개의 희석액 HBV를 섭취한 마우스 투여군에서 43.63, 22.71, 58.22, 50.16, 그리고 45.11%의 혈당 감소의 변화를 확인하였다(Table 5).

(4) 한방발효식초의 고지혈증에 미치는 효과

혈중 총 콜레스테롤 수치, 트리글리세라이드 함량과 LDL의 변화가 정상 대조군과 비교했을 때 HFD 비교군에서 높게 나타났고 표준시약과 HBV 희석액을 처리한

Table 7. Liver weights with serum AST and ALT levels detected in HFD supplied mice in this study

Groups	Liver weights		Serum levels (IU/dL)	
	Absolute (g)	Relative (% of body weights)	AST	ALT
Controls				
Intact	1.372±0.217	4.264±0.359	84.00±8.32	24.83±6.85
HFD	2.533±0.147 ^a	3.778±0.564	212.00±19.33 ^a	158.17±15.26 ^a
References				
Metformin	1.488±0.087 ^c	3.372±0.428 ^a	168.17±9.62 ^{ac}	132.83±9.91 ^{ac}
Silymarin	1.441±0.113 ^c	2.563±0.541 ^{ac}	122.17±17.03 ^{ac}	93.33±15.08 ^{ac}
HBV diluted				
Stock	1.342±0.121 ^c	3.090±0.419 ^{ad}	91.83±16.23 ^c	68.50±12.94 ^{ac}
2-fold	1.435±0.147 ^c	3.129±0.674 ^{ad}	106.00±8.85 ^{ac}	75.67±16.48 ^{ac}
4-fold	1.566±0.081 ^{bc}	3.160±0.662 ^a	118.00±7.90 ^{ac}	91.83±13.50 ^{ac}

Values are expressed mean ± S.D. of six mice

Abbreviations: HFD, high fat diet; HBV: herbal black vinegar

^aP<0.01 and ^bP<0.05 compared with intact control by Least Significant Difference (LSD) test

^cP<0.01 and ^dP<0.05 compared with HFD control by LSD test

^eP<0.01 and ^fP<0.05 compared with intact control by Mann-Whitney (MW) test

^gP<0.01 and ^hP<0.05 compared with HFD control by MW test

Table 8. Steatohepatitis and mean hepatocyte diameters detected in HFD mice in this study

Groups	Histomorphometry	
	Steatohepatitis (% of fatty change regions)	Mean hepatocyte diameters (µm)
Controls		
Intact	7.83±2.49	34.34±5.57
HFD	81.31±6.13 ^a	89.32±13.75 ^a
References		
Metformin	64.38±8.33 ^{ac}	65.90±5.76 ^{ac}
Silymarin	41.20±3.90 ^{ac}	59.70±6.15 ^{ac}
HBV diluted		
Stock	15.65±4.19 ^{bc}	40.78±5.08 ^c
2-fold	36.27±4.24 ^{ac}	45.87±6.15 ^{bc}
4-fold	43.79±4.97 ^{ac}	56.20±8.36 ^{ac}

Values are expressed mean ± S.D. of six mice

Abbreviations: HFD, high fat diet; HBV: herbal black vinegar

^aP<0.01 and ^bP<0.05 compared with intact control by Least Significant Difference (LSD) test

^cP<0.01 and ^dP<0.05 compared with HFD control by LSD test

^eP<0.01 and ^fP<0.05 compared with intact control by Mann-Whitney (MW) test

^gP<0.01 and ^hP<0.05 compared with HFD control by MW test

Table 9. Kidney weights and histomorphometry detected in HFD mice in this study

Groups	Kidney weights		Histomorphometry
	Absolute (g)	Relative (% of body weights)	Abnormal tubule numbers (per 100 tubules)
Controls			
Intact	0.217±0.021	0.683±0.106	7.67±2.58
HFD	0.259±0.016 ^a	0.387±0.066 ^a	78.00±5.76 ^a
References			
Metformin	0.229±0.018 ^d	0.524±0.117 ^a	56.00±4.60 ^{ac}
Silymarin	0.228±0.017 ^d	0.408±0.105 ^a	43.50±4.23 ^{ac}
HBV diluted			
Stock	0.212±0.005 ^c	0.491±0.087 ^a	12.00±1.97 ^c
2-fold	0.227±0.025 ^c	0.492±0.087 ^a	33.00±7.67 ^{ac}
4-fold	0.247±0.027 ^b	0.495±0.093 ^{ad}	45.17±9.20 ^{ac}

Values are expressed mean ± S.D. of six mice

Abbreviations: HFD, high fat diet; HBV: herbal black vinegar

^a $P < 0.01$ and ^b $P < 0.05$ compared with intact control by Least Significant Difference (LSD) test

^c $P < 0.01$ and ^d $P < 0.05$ compared with HFD control by LSD test

^e $P < 0.01$ and ^f $P < 0.05$ compared with intact control by Mann-Whitney (MW) test

^g $P < 0.01$ and ^h $P < 0.05$ compared with HFD control by MW test

Table 10. Serum Creatinine and BUN levels detected in HFD mice in this study

Groups	Serum levels (mg/dL)	
	BUN	Creatinine
Controls		
Intact	32.17±4.54	0.63±0.15
HFD	81.67±10.17 ^a	1.98±0.21 ^a
References		
Metformin	62.00±12.55 ^{ac}	1.52±0.16 ^{ac}
Silymarin	56.17±9.06 ^{ac}	1.40±0.26 ^{ac}
HBV diluted		
Stock	32.83±5.60 ^c	0.98±0.22 ^{bc}
2-fold	40.50±5.39 ^c	1.18±0.35 ^{ac}
4-fold	54.83±12.09 ^{ac}	1.38±0.25 ^{ac}

Values are expressed mean ± S.D. of six mice

Abbreviations: HFD, high fat diet; HBV: herbal black vinegar

^a $P < 0.01$ and ^b $P < 0.05$ compared with intact control by Least Significant Difference (LSD) test

^c $P < 0.01$ and ^d $P < 0.05$ compared with HFD control by LSD test

^e $P < 0.01$ and ^f $P < 0.05$ compared with intact control by Mann-Whitney (MW) test

^g $P < 0.01$ and ^h $P < 0.05$ compared with HFD control by MW test

마우스 군에서는 감소하였다. 반면에, 혈중 HDL의 변화는 정상 대조군에 비해 HFD 대조군의 함량이 감소되었고 참

고시약과 3개의 희석액 HBV를 섭취한 마우스 투여군에서 47.20, 36.80, 78.00, 62.00, 그리고 48.00% HDL이 상승되었다(Table 6).

(5) 한방발효식초의 간병증에 미치는 효과

간 중량, 혈중 AST·ALT, 간 실질조직의 지방변화를 변화가 정상 대조군과 비교했을 때, HFD 비교군에서 높게 나타났고 표준시약과 HBV 희석액을 처리한 마우스 군에서는 감소하였다. 간세포 직경의 비대가 정상 대조군과 비교했을 때, HFD 비교군에서 높게 나타났고 표준시약과 HBV 희석액을 처리한 마우스 군에서는 각각 26.22, 33.16, 54.34, 48.64, 그리고 37.08% 감소하였다(Table 7, 8).

(6) 한방발효식초의 콩팥병증에 미치는 효과

콩팥 중량, 혈중 BUN, 크레아티닌과 변성 세노관 수의 변화가 정상 대조군과 비교했을 때, HFD 비교군에서 높게 나타났고 표준시약과 HBV 희석액을 처리한 마우스 군에서는 감소하였다. 하지만, 콩팥 상대적 중량은 감소하였다(Table 9, 10).

고 찰

본 연구에서는 전통발효방식에 따라 본 연구에서 제시

된 조합을 통해 만들어진 한방발효흑초(HBV)의 HFD 식이 생쥐에서의 약리학적 효과를 관찰하고자 하였다. 대사 증후군을 극복할 수 있는 새로운 약물을 검증하기 위해 수 많은 동물 모델을 개발하는 데 대다수는 심각한 비만과 고혈당증을 나타내기 때문에 당뇨를 치료하기 위한 연구에 사용된다(Sone et al., 2001). 반면에, 생쥐의 HFD 식이 유도 비만 모델은 가벼운 비만증과 고혈당증을 나타내고 대사질환증후군의 예방하기 위한 약제개발을 위해 사용된다(Park et al., 2005). 항비만 효과에 영향을 미칠 수 있는지 지질대사와 관련된 AMPK의 중요한 조절메카니즘을 확인하기 위해, 지난 연구에서 HBV를 세포주에 처리한 후 항비만 관련 표적 효소인 AMPK (AMP activated protein kinase) 활성을 분석하였다(Vytla and Ochs, 2013). 간단히 요약하면, 마우스 근육세포인 L6 세포주에 HBV를 0%, 2%, 5%, 10%로 처리한 후 AMPK의 활성화를 측정하였다. 결과적으로 pACC 인산화가 증가되었고 상대적으로 ACC 효소활성이 억제되어 melonyl-CoA의 생성량이 감소함으로써 지방산화를 일으키게 하여 체지방이 감소됨을 확인하였다(Lee and Park, 2017). 이를 토대로, 본 연구에서는 HBV의 *in vivo* 효능을 관찰하기 위해 HBV 원액과 2배, 4배 희석액 3가지를 준비하여 HFD에게 복용 후 12주가 지나서 간, 혈당, 신장 및 항비만 효과를 검증하기 위해 생화학적, 병리학적 검사를 진행하였다(Fig. 1). 이를 위해서, HFD 식이 대상 생쥐를 1주일간 환경에 적응한 후 선별된 생쥐를 대상으로 다시 1주일간 본격적으로 HFD 식이를 섭취하도록 하였고 이후 12주간 더 지속적으로 HFD 식이를 진행하였다. 혈당의 변화는 혈청 포도당 수치의 변화를 근거로 검증하였고, 간보호 효과는 간의 무게의 변화와 간의 조직병리학적 소견, AST, ALT 수치를 근거로 검증하였다. 또한, 콩팥보호 효과는 콩팥 무게의 변화와 BUN, 크레아틴의 수치를 근거로 효능을 검증하였고, 지질혈증의 변화는 총 콜레스테롤, 트리글리세라이드(중성지방), LDL 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 수치 측정 변화와 난소주위 지방 무게와 조직병리학적 소견, 복부 지방 세포 등이 항비만의 효과를 검증하는 기준으로 사용되었다. Metformin (250 mg/kg)은 저혈당 효과와 항비만 효과를 위해 대조약으로 사용되었고 Silymarin (100 mg/kg)은 간보호 효과를 위한 대조약으로 사용되었다. 실험은 7 그룹으로 나뉘어 진행되었으며(Table 1), 하루에 한 번 대조약과 각각의 HBV (10 ml/kg)를 증류수에 녹여 공급하였다(경구 투여). HFD 식이 그룹에서의 음식소모량은 비 HFD 식이 그룹과 비교했을 때 훨씬 높았다(Table 2). 하

지만 HBV를 섭취한 그룹과 표준시약(Metformin과 Silymarin) 그룹을 비교해 보면 큰 차이를 보이지 않았다. 그러므로 HBV의 복용한 생쥐의 약리학적 효과가 음식소모의 억제에서 일어나지 않았음을 알 수 있었다(Table 5). 몸무게 증가의 억제는 비만 치료의 직접적인 결과물이다. 지방축적의 증가는 비만의 중요한 요인이고 세포가 비대해지는 것은 복부 지방조직의 중요한 원인이 된다(Morange et al., 2000; Cani et al., 2008). 지방조직은 단순히 에너지를 보관하는 역할 뿐만 아니라, 아디포카인(adipokine)을 분비하는 내분비 기관이다(Fujita et al., 2005; Maury and Brichard, 2010). 본 실험에서는 HBV 의존적으로 체중 증가, 지방침착, 지방세포의 비대 등을 억제할 수 있었으며, 4배 HBV 희석액을 투여했을 때에도 Metformin에 나타난 효과만큼 항비만 효과를 잘 보여주었다(Table 3, 4).

본 연구를 통하여 한방 소재를 열수 추출 후 최적화된 발효과정을 거쳐 생산된 HBV 항비만에 대한 효능이 검증되었다. 고지방식이 HFD 생쥐를 대상으로 HBV가 고혈당, 고지질혈증 등의 항비만 효과를 나타내는 지 생화학적, 조직병리학적 결과를 통해 항비만 효과가 있음을 동물실험을 통해 확인할 수 있었다. 앞으로 항비만을 유도하는 물질이 무엇인지 분석하고 이를 위해 한방발효흑초의 비만억제 메커니즘에 대한 자세한 연구가 후속되어야 할 것으로 생각한다.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was partially supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) grant (<http://nrf.re.kr>) to S.P. (NRF-2017R1D1A3B-03029902); by a grant from Kyungwoon University (2018) (<http://www.ikw.ac.kr>) to D.L., and S.P.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Cani PD, Rodrigo B, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008. 57: 1470-1481.
- Fujita H, Fujishima H, Koshimura J, Hosoba M, Yoshioka N,

- Shimotomai T, Morii T, Narita T, Kakei M, Ito S. Effects of antidiabetic treatment with metformin and insulin on serum and adipose tissue adiponectin levels in db/db mice. *Endocrine Journal*. 2005. 52: 427-433.
- James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The worldwide obesity epidemic. *Obesity Research*. 2001. 9: 228S-233S.
- Johnston CS, Gaas CA. Vinegar: medicinal uses and antiglycemic effect. *Medscape General Medicine*. 2006. 8: 61.
- KFDA. Korea Food Standard Code. Korea Food and Drug Administration, Cheongwon, Korea. 2012. 5: 21-21.
- Lee D, Park S. Anti-obesity Effect of Black Vinegar Fermented with Herbal Extracts. *Biomedical Science Letters*. 2017. 23: 402-405.
- Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010. 314: 1-16.
- Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction*. 2005. 130: 583-597.
- Monasta L, Batty GD, Cattaneo A, Lutje V, Ronfani L, Van Lenthe FJ, Brug J. Early-life determinants of overweight and obesity: a review of systematic reviews. *Obesity Reviews*. 2010. 11: 695-708.
- Morange PE, Lijnen HR, Alessi MC, Kopp F, Collen D, Juhan-Vague I. Influence of PAI-1 on adipose tissue growth and metabolic parameters in a murine model of diet-induced obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000. 20: 1150-1154.
- Park SH, Ko SK, Chung SH. *Euonymus alatus* prevents the hyperglycemia and hyperlipidemia induced by high-fat diet in ICR mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. 102: 326-335.
- Sone H, Suzuki H, Takahashi A, Yamada N. Disease model: hyperinsulinemia and insulin resistance. Part A-targeted disruption of insulin signaling or glucose transport. *Trends in Molecular Medicine*. 2001. 7: 320-312.
- Vytla VS, Ochs RS. Metformin increases mitochondrial energy formation in L6 muscle cell cultures. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. 288: 20369-20377.
- Yun JW, Lee BS, Kim CW, Kim BH. Comparison with 3 high-fat diet for studying obesity in C57BL/6 mouse. *Laboratory Animal Research*. 2007. 23: 245-250.
- Zimmet P. The burden of type 2 diabetes: are we doing enough. *Diabetes Metabolism*. 2003. 29: 6S9-6S18.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.4.380>

Cite this article as: Lee D, Park S. Herbal Black Vinegar and the Anti-obesity Complications *in vivo*. *Biomedical Science Letters*. 2018. 24: 380-389.