

Original Article

난소절제 동물모델을 이용한 폐경 후의 비만에 대한 건강 추출물의 효능에 대한 실험적 고찰

박창현, 임형호
가천대학교 한의과대학

The Experimental Study of the Beneficial Effect of *Zingiberis Rhizoma* on Post-menopausal Obesity Using Ovariectomized Rats

Chang-Hyun Park, Hyung-Ho Lim
College of Korean Medicine, Gachon University

Objectives: This study was performed to investigate anti-obesity effects of *Zingiberis Rhizoma* on ovariectomized rats in order to determine the possibility of the clinical use in preventing and treating post-menopausal obesity.

Methods: To investigate how menopause affects obesity in woman, rats were treated with *Zingiberis Rhizoma* extracts. We measured various biomarkers including GOT, GPT, leptin, ghrelin, adiponectin, PPAR- γ mRNA, total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, liver weight, estradiol, uterine weight, and calcitonin, which are linked with obesity and menopause.

Results: There was a significant decrease in group which was given *Zingiberis Rhizoma* extracts 100 mg/kg and lipid level found in blood (total cholesterol, triglyceride). Fat accumulation of liver cells was repressed, liver function was improved and leptin and adiponectin levels were significantly normalized. In addition, expression of PPAR- γ was significantly increased.

Conclusions: The results indicated that *Zingiberis Rhizoma* extracts have anti-obesity effects on ovariectomized rats through improving liver function and lipid metabolic function.

Key Words : *Zingiberis rhizoma*, Menopause, Obesity, Rat

서론

갱년기란 여성의 일생에서 생식능력이 끝나는 시기라는 생물학적 개념과 함께 사회, 문화적 개념을 내포하고 있으며, 폐경전과 폐경기 동안 그리고 폐경기 이후의 일정기간을 포함하는 폐경전후기(perimenopausal phases)를 의미한다¹⁾. 여성은 폐경을 전후하여 내분

비 계통에 일어나는 급격한 생리적 변화와 여성 호르몬의 생성 중단으로 신체와 정신에 단기 또는 장기간에 걸친 신체적, 정신적, 생리학적인 증상들을 동반하는데 이를 갱년기 증후군이라고 한다²⁾. 이러한 호르몬의 변화는 갱년기 여성의 근육량을 감소시키고 복부 지방축적을 촉진하여 남성형 체형으로 변화시키면서 비만을 유발하고, 대사증후군의 유병률을 증가시킨다^{3,4)}.

이러한 갱년기의 비만은 당뇨, 고혈압, 뇌졸중 및

· Received : 29 May 2018 · Revised : 11 June 2018 · Accepted : 21 June 2018
· Correspondence to : 임형호(Hyung-Ho Lim)
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 가천대학교 한의과대학
Tel : +82-31-750-8599, Fax : +82-31-750-5416, E-mail : omdlimhh@gachon.ac.kr

지방간 등의 합병증을 유발하여 건강에 직간접적인 영향을 야기한다⁵⁾. 실제로 폐경 전의 여성보다 폐경 후 여성의 체내 지방량이 높다는 연구 결과가 발표된 바가 있으며⁶⁾, 갱년기에 비만의 유병률이 증가하는 것은 일반적인 현상으로 알려져 있다⁷⁾.

본 연구에 사용된 건강(*Zingiberis Rhizoma*)은 생강과(*Zingiberaceae*)에 속한 다년생 초본인 생강(*Zingiberis Officinale Rosc.*)의 근경을 건조한 것으로 溫中逐寒, 回陽通脈, 治心腹冷痛의 효능이 있어 吐瀉, 肢冷脈微, 寒飲喘咳, 風寒濕痺, 陽虛吐血, 下血에 사용되었다⁸⁾. 최근, 건강을 이용한 연구로는 갑상선 기능 저하증에 대한 갑상선 호르몬의 분비능 개선 및 합성 증가 작용과 혈관신생 억제 효과, 면역 억제 조절 등에 대한 결과가 보고되었다⁹⁻¹⁰⁾. 또한 생강 추출물의 투여가 총콜레스테롤, LDL콜레스테롤, 중성지방, 유리지방산, 인지질의 혈중 농도를 억제하는 효과가 있어 대사성 질환에 사용될 수 있다는 연구 결과가 보고되었다¹¹⁾. 그러나 생강의 건조에 따른 유효성분의 변화 및 그에 따른 건강의 효과에 대한 연구는 부족하여, 그 효과를 알아보고 더 나아가 정확한 기전에 대해 알아보기 위해 실험 연구하여 유의한 결과를 확인하였다.

번 추출하여 감압 건조하여 메탄올 추출물 101.5 g을 얻었다. 양성대조군으로는 붉은 토끼풀(red clover)을 사용하였으며, 이는 인체 내 여성호르몬과 같은 작용을 하는 식물에스트로겐이라고 부르는 화학물질을 다량 함유하고 있는 약초이다. 붉은 토끼풀은 서울제약(서울)의 클로미딘정(powdered red clover extract 100 mg)을 구입하여 필름코팅을 제거하고 분말 상태로 사용하였다.

2) 난소 절제 동물 모델의 제작

체중이 140±10 g인 5주령의 암컷 랫트(Rat)를 대상으로 실험실에서 1주일간 적응시킨 뒤, 양쪽 난소를 절제하여 폐경 모델을 유도하고, 나머지는 복부 절개 후 봉합시키는 Sham-operation을 실시하여 비폐경 모델을 유도하였다. 그리고 각 모델을 1주일간 고품 사료를 주어 상처를 회복시킨 뒤, 난소가 절제되지 않은 대조군과 난소가 절제된 대조군으로 분류하였다. 본 연구는 가천대학교 동물실험 윤리위원회(승인번호 : GIACUC-R 2017006)의 승인 하에 수행되었다.

2. 방법

1) 실험군 배정 및 연구 스케줄

실험동물은 실험대조군(OVX), 모의수술 정상군(Sham), 양성대조군(OVX + Red clover), 25 mg/kg 투여군(OVX + G-25 mg/kg), 50 mg/kg 투여군(OVX + G-50 mg/kg), 100 mg/kg 투여군(OVX + G-100 mg/kg)으로 분류된다(Table 1). 모의수술 정상군은 6마리, 난소가 절제된 실험대조군과

재료 및 방법

1. 재료

1) 검체의 제조

실험에 사용한 건강은 (주)옥천당에서 구입하였으며, 500 g을 80% MeOH(1.5 L)로 상온 25 ℃에서 세

Table 1. Experimental Design of Animals

Group(n)	Treatment
Sham(6)	Sham-operated rats
OVX(8)	Ovariectomized rats
OVX+Red clover(8)	Ovariectomized rats supplemented with red clover extracts 3.3 mg/kg bw/day
OVX+G-25mg/kg(8)	Ovariectomized rats supplemented with <i>Zingiberis rhizoma</i> extracts 25mg/kg bw/day
OVX+G-50mg/kg(8)	Ovariectomized rats supplemented with <i>Zingiberis rhizoma</i> extracts 50mg/kg bw/day
OVX+G-100mg/kg(8)	Ovariectomized rats supplemented with <i>Zingiberis rhizoma</i> extracts 100mg/kg bw/day

양성대조군, 건강 추출물 투여군은 8마리씩 5개 그룹으로 나누어 건강 추출물은 각각 25, 50, 100 mg/kg의 농도로 생수에 용해시킨 후 경구 투여하였으며, 양성대조군에는 Red clover 추출물(3.3 mg/kg)을 생수에 용해시킨 후 경구 투여하였다. Red clover 추출물의 용량은 성인 체중 60kg을 기준으로 200 mg/kg로 복용되고 있는 근거를 기반으로 환산하여 계산되었다. 모든 군의 투여기간은 8주이고, 사육 조건은 온도 24 ± 2 °C, 습도 $52 \pm 2\%$, 물과 식이는 제한 없이 제공하였다.

2) 건강 추출물의 여성 갱년기 기능성 시험

(1) 혈액 및 장기 채취

실험동물을 12시간 이상 절식 시킨 후, CO₂ 가스로 호흡마취하고, 혈액은 복대동맥에서 채혈하여 EDTA가 처리된 튜브와 별도의 처리가 없는 튜브에 넣어 4 °C, 3,500 rpm, 10분 원심분리한 후 혈장과 혈청을 -80 °C에 보관하여 분석에 이용하였다. 실험동물의 간 및 자궁을 적출하고 생리식염수로 세척 후 여분의 수분을 제거하고 무게를 측정하고 액체질소로 급속 동결시켜 분석 시까지 -80 °C에 보관하였다.

(2) 혈액 분석

혈장 총 콜레스테롤(Total cholesterol), 중성 지방(Triglyceride), HDL-콜레스테롤(HDL-Cholesterol)의 농도는 측정용 KIT(Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 기타 비만 관련 마커 농도는 측정용 KIT(Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea 및 Mercodia, Uppsala, Sweden)를 사용하여 측정하였다.

(3) Leptin

혈청 중 Leptin의 농도 측정은 ELISA KIT(R&D systems, Inc., USA)를 이용하였다. 모든 시약은 실온에 방치한 후 사용하였다. 먼저 Calibrator Diluent RD5-3으로 Serum을 10배 희석하여 준비하였다. 96 well microplate에 Assay Diluent RD1W를 각 well에 50 μ l 첨가하고, Standard, Control 또는 Sample(희석된 serum)을 50 μ l씩

넣었다. 부드럽게 섞은 뒤 Plate Sealers로 그 위를 덮고 실온에서 2시간 방치하였다. 각 well에 Wash Buffer 400 μ l로 4번 반복으로 씻어내고 물기 제거 후, 각 well에 Leptin Conjugate를 100 μ l씩 첨가하였다. Plate Sealers를 붙이고 실온에서 2시간 방치 후 각 well에 Wash Buffer 400 μ l로 4번 반복으로 씻어내고 물기를 제거하였고 Substrate Solution을 100 μ l씩 첨가한 후 실온에서 빛을 차단하여 30분 방치하였다. Stop Solution을 100 μ l씩 각 well에 첨가한 후 부드럽게 섞은 후 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하고, 오차를 줄이기 위해 450 nm에서 550 nm의 흡광도 값을 뺐다. 표준곡선을 작성하여, Leptin의 함량을 계산하였다.

(4) Ghrelin

혈청 중 ghrelin의 농도 측정은 ELISA KIT(Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA)를 이용하였다. Serum은 Assay buffer로 10배 희석하여 사용하였고, 모든 시약은 실온에 방치한 후 사용한다. Blank는 비워두고 Standard, Control 또는 Sample을 50 μ l씩 넣고, Blank를 제외한 각 well에 rehydrated biotinylated peptide를 25 μ l씩 첨가 후 Plate Sealers를 붙이고 microplate shaker 450 rpm에서 2시간 설정한다. Washing buffer 350 μ l로 4번 반복하여 세척하고, 물기 제거 후 각 well에 SA-HRP 100 μ l씩 첨가한다. Plate Sealers를 붙이고 microplate shaker 450 rpm에서 1시간 설정한 후 Washing buffer 350 μ l로 4번 반복하여 세척하고, 물기 제거 후 각 well에 TMB 100 μ l씩 첨가 후 빛으로 보호하고, microplate shaker 450 rpm에서 1시간 설정한다. 각 well에 2N HCl을 넣은 후 ELISA reader를 이용하여 흡광도 450 nm를 측정하였다.

(5) Adiponectin

혈청 중 Adiponectin의 농도 측정은 ELISA KIT(R&D systems, Inc., USA&Canada)를 이용하였다. 모든 시약은 실온에 방치한 후 사용하였다. Serum은 Calibrator Diluent RD5-26을 이용하여

1,000배 희석하여 사용하였다. Assay Diluent RD1W를 각 well에 50 μ l에 첨가 후 Standard, Control 또는 Sample(희석 된 serum)을 50 μ l씩 넣고, Plate Sealers를 붙이고 microplate shaker 550 rpm에서 1시간 설정하였다. 각 well에 Wash Buffer 400 μ l로 5번 반복하여 세척하고, 물기 제거 후 각 well에 Rat Adiponectin Conjugate 100 μ l를 첨가 후 Plate Sealers를 붙이고 microplate shaker 550 rpm에서 1시간 설정하였다. 위와 같이 washing을 5번 반복 후 각 well에 Substrate Solution 100 μ l를 첨가 후 빛을 차단하고, 30분 실온에 방치하였다. 각 well에 Stop Solution을 100 μ l씩 각 well에 첨가한 후 부드럽게 섞은 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 오차를 줄이기 위해서 450 nm에서 550 nm의 흡광도 값을 뺐다.

(6) Calcitonin

혈청 중 Calcitonin의 농도 측정은 ELISA KIT(Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA)를 이용하였다. Serum은 Assay buffer로 10배 희석하여 사용하였고, 모든 시약은 실온에 방치한 후 사용하였다. Blank는 비워두고 Standard, Control 또는 Sample(희석 된 serum)을 50 μ l씩 넣고, Blank를 제외한 각 well에 rehydrated biotinylated peptide를 25 μ l씩 첨가 후 Plate Sealers를 붙이고 microplate shaker 450 rpm에서 2시간 설정하였다. Washing buffer 350 μ l로 4번 반복하여 세척하고, 물기 제거 후 각 well에 SA-HRP 100 μ l씩 첨가하였다. Plate Sealers를 붙이고 microplate shaker 450 rpm에서 1시간 설정하였다. Washing buffer 350 μ l로 4번 반복하여 세척하고, 물기 제거 후 각 well에 TMB 100 μ l씩 첨가 후 빛으로 보호하고, microplate shaker 450 rpm에서 1시간 설정하였다. 각 well에 2N HCl를 넣은 후 ELISA reader를 이용하여 흡광도 450 nm를 측정하였다.

(7) Estradiol

혈청 중 Estradiol 농도 측정은 ELISA KIT(R&D systems, Inc., USA&Canada)를 이용하였다. 모든

시약은 실온에 방치한 후 사용하였다. Serum을 이용하기 전 잠재적으로 방해 받을 수 있는 protein 또는 protein-bound Estradiol을 제거하기 위해 먼저 400 μ l의 Serum과 100 μ l의 Pretreatment E를 microcentrifuge tube에 넣은 후 침전물이 없도록 섞었다. 실온에 15분 동안 방치한 후 Centrifuge 12,000 rpm에 4분 동안 원심 분리 후 그 250 μ l의 상등액과 Pretreatment F의 75 μ l를 첨가한다. 각 well에 Estradiol Primary Antibody Solution 100 μ l를 첨가한 후 Plate Sealers로 덮고, microplate shaker 550 rpm에서 1시간을 설정하였다. 각 well에 400 μ l의 wash buffer로 4번 반복하여 세척 후 남아있는 wash buffer를 깨끗이 닦아내고 Standard, Control 또는 Sample을 100 μ l씩 첨가하였다. Blank 및 NSB well에는 Calibrator Diluent RD5-62를 100 μ l씩 첨가하였다. 또한 각 well에 Estradiol Conjugate를 50 μ l씩 첨가하고, Plate Sealers를 덮고 microplate shaker 550 rpm에서 2시간 설정하였다. 또한 washing을 4번을 반복하고, 각 well에 Substrate Solution 200 μ l를 첨가한 후 실온에서 30분 동안 방치하였다. Stop Solution 100 μ l를 첨가한 후 철저히 혼합한 후 ELISA reader(Spark[®] 10M Multimode Microplate Reader, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 흡광도를 측정하고, 오차를 줄이기 위해 450 nm에서 550 nm의 흡광도 값을 뺐다. 계산 시 희석 계수 1.6을 곱하였으며, 표준곡선을 작성하여 Estradiol의 함량을 계산하였다.

(8) 간 조직의 형태 관찰

실험동물 희생 시 간 조직을 적출하여 10% formalin 용액에 보관하였다. 간 조직은 파라핀 블록을 제작, 박리하여 절편을 만들고 hematoxylin and eosin(H&E)으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

(9) 근육조직의 적출과 RNA 추출

마지막 약물 투여 24시간 후에 rat를 희생시키고, 대퇴부 근육을 분리하여 질소 탱크에 넣어 급속 냉동

시킨 다음, 사용 시까지 -80 °C에 보관하였다. PBS를 넣고 균질화한 다음, 1 ml TRIzol® reagent(Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 용액에 200 µl의 chloroform : isoamylalcohol(24:1)을 넣고 강하게 섞은 후 14,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액 500 µl를 분리하였다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 가하여 -20 °C 에서 하룻밤 RNA를 침전시킨 후 1,400 rpm 으로 20분 원심 분리하였다. 상등액을 버린 후 70% 에탄올로 세척하고 자연 건조시킨 후, RNase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase - freeDNase를 첨가하고 -70 °C 에서 저장하였다.

(10) cDNA

대조군 및 실험군에서 각각 분리한 total RNA 액 1 µl(1 µl RNA 함유)에 oligo dT(농도 100 pmol) 1 µl, RNase free water 3 µl를 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 65°C 에서 10 min incubation하였다. Primer가 annealing하도록 4 °C 에서 약 5분 동안 방치한 다음, Reverse transcriptase buffer, dNTP(각 2.5 mM), RNase inhibitor, DTT(100 nM), Reverse transcriptase(M-MLV 200 U/µl)을 첨가한 후, 조심스럽게 혼합하였다. 이후, 42 °C에서 90분 동안 incubation 후, 95 °C에서 5분 처리 후 사용하였다.

(11) RT-PCR

Oligo(dT) primer(Promega, Cat.No. C1101), reaction buffer(50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3)(Promega, Cat.No. M1705), 1 mM dNTP(Promega, Cat.No. U1515)과 200 unit M-MLV-RT(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) (Promega, Cat.No. M1705)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 25 µl에 10배 PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA와 1.25 unit의 Taq

polymerase(Promega, Cat.No. M8295)을 넣어 PCR을 시행하였다. PCR조건은 94 °C 4분, 30 cycles의 [94 °C(20초), 54 °C(20초), 72 °C(30초)], 72 °C 10분이었다(Perkin Elmer, USA). 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기 영동하였다. 전기 영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1(Media Cybernetics, USA)을 이용하여 구하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 아래 Table II에 표시하였다.

Table 2. Primers

Target gene	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
IPAR-γ	TCGGAGGGCTCTGTCATC	CATCTGTACTGGTGGGACA

3. 통계 처리

각 군 간의 통계적 유의성 검정에 따른 통계분석은 ANOVA(one-way analysis of variance test)를 실시한 후 유의성이 있는 경우, p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 사후 검정하였다.

결과

1. 식이 섭취량 및 체중 변화량

실험기간 동안 실험동물의 체중 변화량을 나타낸 것이다(Fig. 1). 난소를 절제한 실험대조군(OVX)이 난소를 절제하지 않은 모의수술 정상군(Sham)에 비해 체중이 증가하였다. 체중, 체중변화량 및 식이효율을 조사한 결과는 Table III와 같다. 갱년기 동물모델에서 건강을 각각 25, 50, 100 mg/kg의 농도로 8주간 투여한 결과 건강을 투여한 군의 체중이 실험대조군(OVX)보다 감소하였음을 볼 수 있었다. 특히, 건강추출물을 100 mg/kg의 농도로 투여한 군은 양성대조군(OVX + Red clover)보다 체중 감소에 더 높은 효과를 나타내었다. 그러나 25, 50 mg/kg의 농도로 투여한 군의 체중은 통계적으로는 유의하지 않았으며, 이후 체중의 유의한 감소가 있었던 100 mg/kg 투여군(OVX + G-100 mg/kg)에 대하여 연구를 진행하였다.

Table 3. Effects of *Zingiberis Rhizoma* on Body Weight gain and Feed Efficiency Ratio of Ovariectomized Rats for 8 Weeks

Group ¹⁾	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g/week)	Food intake (g/week)	Fer ²⁾
Sham	163.2±2.98	281.5±12.3*	118.3±12.2*	8.2±0.49*	0.13±0.02*
OVX	163.0±7.18	362.3±10.33#	199.2±11.78#	9.6±0.71#	0.18±0.01#
OVX + Red Clover	163.5±5.63	362.7±23.78#	199.2±19.46#	9.2±0.60	0.19±0.02#
OVX + G-25mg/kg	163.4±6.16	367.0±18.88#	203.5±15.39#	8.9±0.55	0.20±0.01#
OVX + G-50mg/kg	163.3±6.92	360.3±20.19#	197.0±13.89#	8.9±0.54	0.20±0.02#
OVX + G-100mg/kg	164.2±5.76	339.8±18.9#,*	175.6±16.15#	9.3±0.65	0.17±0.02

1) refer to comment in table 1.

2) Values are mean±SD.

3) #p<0.05,compared with the sham control.*p<0.05,compared with the OVX control.

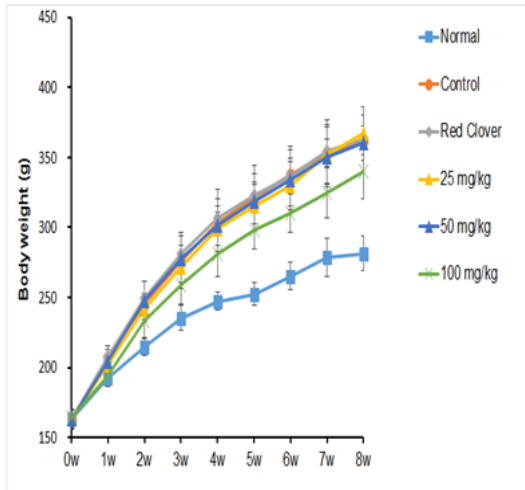


Fig. 1. Weight changes of ovariectomized rats by different concentrations of *Zingiberis Rhizoma* extract(25, 50, 100 mg/kg)

2. 간 기능에 미치는 영향

갱년기 동물모델에서 건강 추출물을 100 mg/kg의 농도로 경구 투여한 결과 GOT의 경우 건강을 투여한 군(OVX + G-100mg/kg)은 실험 대조군(OVX)에 비해 유의하게 감소하였다. GPT의 경우 실험 대조군(OVX)에서 모의수술 정상군(Sham)에 비해 그 증가 폭이 크지는 않았으나, 역시 건강을 투여한 군에서 감소 효과를 보였다(Table IV).

Table 4. Effects of *Zingiberis Rhizoma* Extract(100 mg/kg) on Liver Function of Ovariectomized Rats

Group ¹⁾	GOT (Karmen/mL)	GPT (Karmen/mL)
Sham	51.4±11.3*	27.5±5.8
OVX	96.7±24.1#	36.7±4.6
OVX +Red Clover	61.7±8.0	29.7±3.3
OVX + G-100 mg/kg	56.1±8.5*	29.5±4.9

1) refer to comment in table 1.

2) Values are mean±SD.

3) #p<0.05,compared with the sham control.

*p<0.05,compared with the OVX control.

3. 간 중량 및 지질 농도 분석

갱년기 동물모델에서 건강 추출물을 100 mg/kg의 농도로 8주간 경구 투여한 결과 건강을 투여한 군에서 HDL-Cholesterol의 경우 유의한 변화는 없었으나, 총 콜레스테롤, 중성지방의 경우는 실험대조군(OVX) 보다 유의성 있는 감소를 보였다. 간의 무게 또한 건강 100 mg/kg 투여군에서 모의수술 정상군(Sham)에 가깝게 감소되었다(Table V).

4. 간 조직의 지방축적

난소를 제거하지 않은 모의수술 정상군(Sham)과 비교하였을 때, 난소를 제거한 실험 대조군(OVX)은 간에서의 지방 축적이 현저히 증가하였으며, 건강을 100 mg/kg의 농도로 투여한 군에서는 OVX군에 비하여 간에서의 지방 축적이 현저히 억제되었다(Fig. 2).

Table 5. Effects of *Zingiberis Rhizoma* Extract(100 mg/kg) on Lipid Levels and Liver Weight of Ovariectomized Rats

Group ¹⁾	Total Cholesterol(mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	HDL- Cholesterol (mg/dL)	Liver Weight (g)
Sham	78.8±8.7*	58.5±16.3*	39.9±5.0	9.7±0.7*
OVX	107.7±3.4#	93.7±11.2#	43.9±3.4	11.7±0.6#
OVX + Red Clover	71.6±8.3*	71.7±7.5*	42.4±5.0	11.2±1.3
OVX + G-100mg/kg	67.2±8.9*	70.7±10.8*	45.2±6.4	10.5±1.0

1) refer to comment in table 1.

2) Values are mean±SD.

3) #p<0.05,compared with the sham control.*p<0.05,compared with the OVX control.

Table 6. Effects of *Zingiberis Rhizoma* Extract(100 mg/kg) on Lipid Levels and Liver Weight of Ovariectomized Rats

Group ¹⁾	Leptin(pg/mL)	Ghrelin(ng/mL)	Adiponectin(ng/mL)
Sham	6.1±1.1*	57.4±0.7*	6.80±0.57
OVX	13.0±1.9#	59.2±0.3#	5.68±0.66
OVX +Red Clover	9.1±1.7	59.2±0.7	6.83±0.67
OVX + G-100 mg/kg	8.7±1.8*	58.5±0.7	7.12±0.37*

1) refer to comment in table 1.

2) Values are mean±SD.

3) #p<0.05,compared with the sham control.*p<0.05,compared with the OVX control.

5. 비만 관련 호르몬 수치에 미치는 영향

실험 대조군(OVX)은 모의수술 정상군(Sham)에 비해 leptin의 농도가 유의성 있게 증가되었으며, 실험 군인 건강 100 mg/kg 투여군에서는 실험대조군(OVX)에 비해 leptin 농도가 유의성 있게 감소하였다. 또한, 실험대조군에서 감소한 Adiponectin의 수치는 건강 100 mg/kg 투여에 의해 유의성 있게 증가하여 모의수술 정상군 수치에 근접하게 나타났음을 확인하였다. ghrelin의 경우 건강 100 mg/kg 투여군(OVX + G-100 mg/kg)은 실험 대조군(OVX)에 비해 농도의 유의성 있는 변화는 없었다(Table VI).

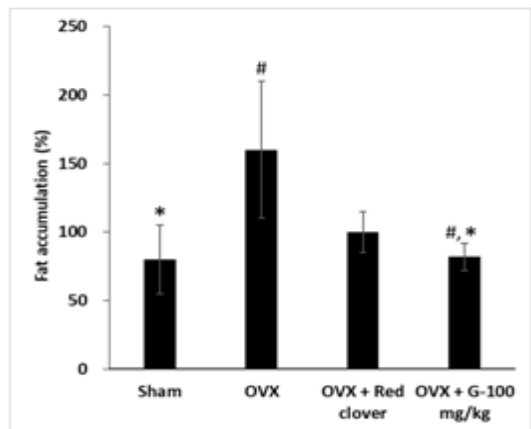
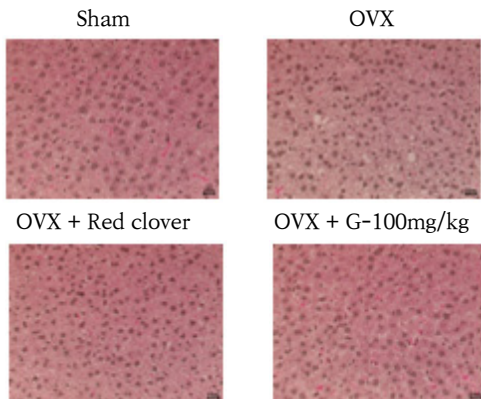


Fig. 2. Effects of *Zingiberis Rhizoma* extract(100 mg/kg) to depress fat accumulation of liver tissue of ovariectomized rats (n=8). # p < 0.05, compared with the sham control. * p < 0.05, compared with the OVX control. Magnification = 40X.

6. 근육조직의 PPAR-γ mRNA 발현량의 변화

실험대조군(OVX)은 모의수술 정상군(Sham)에 비해 PPAR-γ 발현이 유의성 있게 억제되었으며, 실험 군인 건강 100 mg/kg 투여군(OVX + G-100mg/kg)은 실험대조군(OVX)에 비해 PPAR-γ 발현이 유의하게 증가를 보였다(Fig. 3).

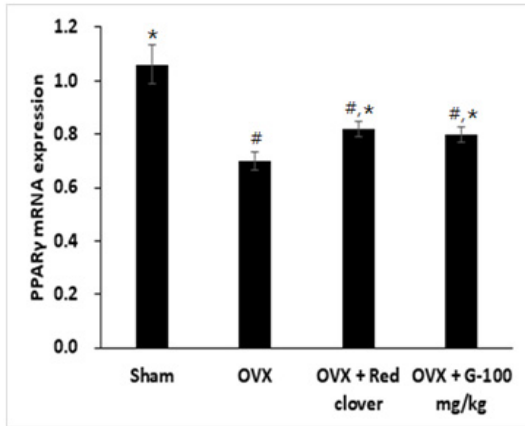


Fig. 3. Effects of *Zingiberis Rhizoma* extract(100 mg/kg) to change PPAR-γ mRNA expression of muscle tissue of overiectomized rats. #p<0.05,compared with the sham control.*p<0.05,compared with the OVX control.

7. 여성 호르몬에 미치는 영향

실험 결과 양성 대조군(OVX + Red Clover)의 에스트라디올 농도는 실험 대조군(OVX)에 비해 농도 의존적으로 증가하였음을 알 수 있었지만 건강을 투여한 경우 에스트라디올의 농도에서 유의한 변화는 없었으며, 자궁 무게의 경우에도 유의한 변화는 없었다(Table VII).

Table 7. Effects of *Zingiberis Rhizoma* Extract(100 mg/kg) on Female Hormone of Ovariectomized Rats

Group ¹⁾	Estradiol (pg/mL)	Uterine weight (g)
Sham	52.1±9.2*	0.740±0.043*
OVX	29.7±7.5#	0.076±0.003#
OVX + Red Clover	51.9±8.9*	0.084±0.003#
OVX + G-100 mg/kg	31.5±4.2#	0.083±0.003#

- 1) refer to comment in table I.
- 2) Values are mean±SD.
- 3) #p<0.05,compared with the sham control.
*p<0.05,compared with the OVX control.

8. 골다공증 관련 호르몬 수치에 미치는 영향

실험대조군(OVX)에서 감소한 calcitonin 수치는

건강 추출물 100 mg/kg 투여에 의해 모의수술 정상군(Sham)에 근접한 경향을 확인하였으나, 통계적으로 유의한 변화는 없었다(Table VIII).

Table 8. Effects of *Zingiberis Rhizoma* Extract(100 mg/kg) on Hormone Related to Osteoporosis of Ovariectomized Rats

Group ¹⁾	Calcitonin (pg/mL)
Sham	76.1±1.3
OVX	72.5±2.6
OVX + Red Clover	77.4±2.0
OVX + G-100 mg/kg	75.8±1.5

- 1) refer to comment in table I.
- 2) Values are mean±SD.
- 3) #p<0.05,compared with the sham control.
*p<0.05,compared with the OVX control.

고찰

갱년기 증후군은 에스트로겐의 부족으로 인해 발생하는 폐경을 전후하여 겪게 되는 신체적, 정신적인 증상들까지 포괄적으로 지칭되는 용어로 사용되어 왔다¹²⁾. 폐경이 되면 노화로 인하여 활동량과 함께 여성호르몬의 분비가 감소하고, 이로 인하여 제지방량과 기초대사율이 감소하면서 발생하는 중심성 비만은 갱년기 증후군의 특징적인 증상 중의 하나로 알려져 있다¹³⁾.

이전의 선행 연구에서 에스트로겐의 결핍은 사람이나 실험동물 모두에서 체중증가와 관련되며 특히, 복부 지방의 증가를 초래하며, 에스트로겐 결핍 상태가 혈중 지질 증가나 간 조질의 지질 침착을 유도하는 것으로 알려져 있다^{14,15)}. 여성에게서 폐경과 더불어 나타나는 비만과 신체활동 저하는 고지혈증 및 지단백 이상, 체중 과다 및 체지방 분포의 변화를 초래하여 심혈관 질환의 위험도를 증가시킬 뿐만 아니라, 이로부터 진행되는 노화현상으로 인한 체력 저하와 지방 축적과 관련된 체형변화는 자존감을 저하시키고 우울증을 증대시킬 수 있다¹⁶⁾.

갱년기 증상의 가장 잘 알려진 치료 방법인 직접적 호르몬 처방의 부작용이 연구로 알려짐에 따라^{17,18)}, 이에 따라 최근에는 갱년기 증상을 치료하기 위한 한약

재 처방에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다¹⁹⁻²¹).

건강(*Zingiberis Rhizoma*)은 생강과(*Zingiberaceae*)에 속한 다년생 초본인 생강(*Zingiberis Officinale* Rosc.)의 근경을 건조한 것으로, 性味가 辛熱하고 裏寒을 제거해 줌으로써 脾胃의 陽을 따뜻하게 해주며 陰寒이 內盛하여 陽氣衰微하거나 脾胃虛寒하여 吐瀉冷痛을 일으키는 증에 모두 응용된다⁸). 그 성분으로는 정유인 zingiberene, zingiberol, camphene, phellandrene, citral과 辛辣味 성분인 zingerone, gingerol, wingiberone, shogaol 등을 함유하고 있으며, 또한 asparagin, aspartic acid, serin, glutamic acid 등을 함유하고 있다²²).

본 연구에서는 건강 추출물을 난소 절제술을 통한 갱년기 동물모델에 투여하여 비만에 대한 효과를 확인하였고, 그 효과가 어떠한 기전으로 이루어지는지 밝히고자 하였다.

연구 결과, 난소 절제 실험대조군(OVX)이 난소를 절제하지 않은 모의수술 정상군(Sham)에 비해 체중이 증가하는 것을 볼 수 있으며, 이는 여성호르몬 부족에 따른 체내 지방조직의 증가로 인한 것으로, 지방조직에서 여성호르몬을 생성할 수 있는 기능이 있기 때문에 지방 조직에서 난소의 기능을 대체하는 체내의 보상성 작용으로 해석할 수 있다. 이는 에스트로겐의 분비 감소가 체중 증가를 가져온 이전의 보고에서 그 근거를 찾을 수 있다^{23,24}). 갱년기 동물모델에서 8주간의 건강 추출물의 투여 결과, 건강을 투여한 군의 체중이 OVX 군보다 감소하였음을 볼 수 있다. 특히, 건강 추출물을 100 mg/kg의 농도로 투여한 군은 OVX+Red clover 군보다 오히려 체중 감소에 더 높은 효과를 나타내었다(Fig. 1). 그러나 25, 50 mg/kg의 농도로 투여한 군의 체중은 통계적으로는 유의하지 않았다. 이후 체중의 유의한 감소가 있었던 100 mg/kg 투여군에 대하여 건강 추출물이 어떠한 원리로 여성 갱년기 비만에서의 체중 감소 작용을 하는지에 대한 연구를 진행하였다.

먼저 건강 추출물의 간 기능 개선 효과를 보면, 건강을 투여한 군의 GOT가 OVX군에 비해 유의하게 감소하였다. GPT의 경우 OVX 군에서 Sham군에 비

해 그 증가폭이 크지는 않았으나, 역시 건강을 투여한 군에서 정상화되는 경향을 보였다(Table IV). 광학현미경으로 본 간 조직의 지방축적에 대해서도 난소를 제거하지 않은 Sham 군과 비교하였을 때, 난소를 제거한 OVX 군은 간에서의 지방 축적이 현저히 증가하였으며, 건강 100 mg/kg 투여군에서는 OVX 군에 비하여 간에서의 지방 축적이 현저히 억제되었음을 볼 수 있었다(Fig 2).

건강 추출물이 지질 대사에 미치는 영향을 보면, 건강 100 mg/kg 투여군에서 HDL-Cholesterol의 경우 유의한 변화는 없었으나, 총 콜레스테롤 및 중성지방의 경우는 OVX 군보다 유의성 있게 감소한 것을 볼 수 있었다. 간의 무게 또한 건강 100 mg/kg 투여군에서 정상군에 가깝게 감소된 것을 볼 수 있었다(Table V).

Leptin은 지방조직에서 분비되는 167개의 아미노산으로 구성된 호르몬으로 음식 섭취 및 에너지 소비의 조절에 주된 역할을 하는 비만 관련유전자이다. 렙틴 수용체가 시상하부에서 많이 발현되면 음식섭취를 억제시키고, 에너지 소비를 증가시켜 비만 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다^{25,26}).

그러나 대부분의 비만한 사람에서는 혈중렙틴 농도가 증가되어 있는데 이러한 증가는 비만증의 렙틴저항성에서 비롯된다²⁷). 렙틴은 인체 내 지방의 양과 높은 상관관계가 있기 때문에 체지방이 감소될 때, 혈중 렙틴의 농도가 감소된다²⁸).

Adiponectin 농도는 비만인에서 낮게 나타나는데, adiponectin은 지방세포에서 특이적으로 합성 및 분비되는 단백질임에도 불구하고 특이하게 체지방이 증가함에 따라 혈중 농도는 감소하는 것으로 알려져 있다²⁹). 선행연구에 따르면, 운동으로 인한 adiponectin의 증가는 체지방량의 감소, 활동량의 증가로 인한 에너지 소비율 증가, 간에서의 adiponectin 합성을 위한 인슐린의 작용 증가 때문으로 여겨지고 있으며³⁰), Fatouros 등³¹)은 adiponectin 비율의 증가는 BMI 비율의 감소와 관련이 있는 것으로 나타났다고 보고하였다.

Ghrelin은 28개의 아미노산으로 구성된 펩티드 호

르몬으로 성장호르몬의 분비를 촉진하며, 식욕을 자극하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다³²⁾. 혈중 그렐린 농도는 식이인자에 의해 영향을 받게 되는데 음식물 섭취는 혈장 내 그렐린 농도를 감소시키며, 절식으로 혈장 내 그렐린 농도가 상승되어 식욕을 자극한다. 또한, 체질량 조절에 중요한 그렐린 농도는 렙틴, 인슐린 농도와 반비례 관계를 유지한다고 알려져 있으며³³⁾, 혈중 그렐린 농도가 체지방과 체중 감소를 유도하는 장기간의 운동에 의해 긍정적 효과를 가져오는 것으로 알려져 있다³⁴⁾.

건강 추출물의 비만 관련 호르몬 수치를 비교한 결과, OVX 군은 Sham 군에 비해 leptin의 농도가 유의성 있게 증가되었으며, 건강 100 mg/kg 투여군에서는 OVX 군에 비해 leptin의 농도가 유의성 있게 감소하였다. 또한, OVX 군에서 감소한 adiponectin의 수치는 건강 100 mg/kg 투여에 의해서 OVX + Red Clover 군보다도 유의하게 증가하여 모의수술 정상군 수치에 근접하게 나타났음을 확인하였다. 그러나 ghrelin의 경우 건강 100 mg/kg 투여군은 OVX군에 비하여 농도의 유의성 있는 변화는 없었다(Table VI).

PPAR- γ 는 ligand에 의해 활성화되는 transcription factor로서 지방세포 특이적 유전자의 발현과 지방세포 분화에 중요한 역할을 담당하며, 백색 지방과 갈색 지방에서 높은 수준으로 발현된다³⁵⁾. 리간드에 의해 활성화된 PPAR- γ 는 retinoic X receptor와 heterodimer를 이룬 후, 지질대사와 관련된 지방세포 특이적 유전자들의 promoters/enhancers에 존재하는 peroxisome proliferator response elements (PPREs)에 결합하여 PPAR- γ 표적유전자의 발현을 조절한다³⁶⁾. 선행연구에 의하면 근육 내 PPAR- γ 활성화는 골격근의 유리지방산 흡수와 근육 내 지방을 감소시키고 결과적으로 인슐린 민감도를 증가시키는 등 대사 작용의 활성화를 나타내는 지표로서 작용한다고 보고하고 있다³⁷⁾.

건강 추출물이 지질 대사에 미치는 영향을 보았을 때, PPAR- γ 발현량의 경우, OVX 군은 Sham 군에 비해 유의성 있게 억제되었으며, 건강 100 mg/kg 투여군은 OVX 군에 비해 PPAR- γ 발현이 유의한 증가를

보였다(Fig. 3). 이는 이는 난소절제 rat의 PPAR- γ 발현이 정상군에 비해 증가하고, 건강 추출물에 의해 감소되는 기존 연구 결과들과 상반되는 결과로서 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

갱년기 동물 모델에서 건강 추출물의 여성 호르몬 개선 효과를 보았을 때, OVX + Red Clover 군의 에스트라디올이 OVX 군에 비해 농도 의존적으로 증가하였음을 알 수 있었다. 그러나 건강 추출물을 투여한 군에서의 에스트라디올과 자궁 무게에 유의한 변화는 없었다(Table VII). 또한, 갱년기 여성의 경우 에스트로젠 결핍으로 골흡수가 증가되어 급격한 골소실이 발생하여 골다공증의 위험이 높아진다. Calcitonin은 갑상선에서 생산되는 호르몬으로 생체 내의 칼슘 이온 농도의 항상성 조절에 관여하여 뼈에서의 칼슘 손실을 막고 혈액의 칼슘 이온농도를 감소시킨다. 에스트로젠은 갑상선 C 세포를 자극하여 calcitonin 분비를 촉진하여 골흡수를 억제하는데, OVX 군에서 감소한 calcitonin의 수치는 건강 추출물 투여에 의해 Sham 군에 근접한 경향을 확인하였으나 통계적으로 유의한 변화는 없었다(Table VIII).

본 연구는 건강의 효과를 단편적으로 밝히거나, 간에서의 효과만을 밝힌 이전의 연구들과 달리 이전의 연구에서 비만과 관련된 생체 지표들을 다각적으로 분석하였다. 에스트라디올 농도 및 자궁의 무게 변화, 칼시토닌 농도를 확인하여 여성 갱년기 비만에 대한 건강의 체중 감량 효과가 성호르몬의 작용에 따른 것이 아님을 밝혔으며, leptin, adiponectin, ghrelin 등 비만관련 호르몬의 수치 변화를 확인하였으며, 간기능에 미치는 영향과 비만과 관련된 인자인 지질 농도와 leptin, adiponectin, PPAR- γ 수치 확인 등을 통해 간과 근육에서의 지질 대사와 관련된 작용을 통한 것임을 밝혔다는 데에 그 의의가 있다.

이와 같이 실험을 통해 알아본 결과, 건강은 난소절제술로 유도된 갱년기 비만에 효과가 있으며, 간의 기능 개선 및 근육의 지질대사 기능 개선을 통하여 체중을 감소시키는 것을 볼 수 있었다. 따라서 건강이 여성 갱년기 비만 치료에 효과적일 것으로 판단되며, 이에 대한 보다 많은 연구가 추후 이루어질 것으로 기대된다.

결론

건강의 갱년기 비만에 미치는 효과 및 기전에 대해 알아보기 위해 난소절제술로 유도된 갱년기 동물 모델에 건강 추출물을 8주간 투여한 결과 유의 있는 체중 감소가 나타났으며, 건강이 비만과 관련된 인자들에 미치는 영향을 평가하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 건강 추출물을 100 mg/kg으로 투여한 군에서 통계적으로 유의한 체중 감소가 있었다.
2. 건강 100 mg/kg 투여군은 갱년기 동물 모델의 혈중 지질 수준(total cholesterol, triglyceride)에서 유의한 감소 효과를 나타내었다.
3. 건강 100 mg/kg 투여군은 갱년기 동물 모델의 간 조직 지방 축적을 억제하고 간 기능을 개선시켰다.
4. 건강 100 mg/kg 투여군은 갱년기 동물 모델의 leptin 및 adiponectin 수치에 대하여 유의한 효과를 나타내었다.
5. 건강 100 mg/kg 투여군은 갱년기 동물 모델의 PPAR- γ 발현에 대해 유의한 증가 효과를 나타내었다.

이상의 연구결과, 건강은 난소 절제술로 유도된 갱년기 비만에 효과가 있으며, 간의 기능 개선 및 근육의 지질대사 기능 개선을 통하여 체중을 감소시키는 것을 볼 수 있었다. 따라서 건강이 여성 갱년기 비만 치료에 효과적일 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 가천대학교 교내지원에 의한 결과임.

참고문헌

1. The society of korean medicine obstetrics and gynecology. *Oriental obstetrcis & gynecology*. Seoul:Euisseongdang publishing company.

- 2016:228-9.
2. Choi YD. *Clinical gynecology*. Seoul:Koera medical book publishing company. 2001;305-26.
3. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J CLin Endocrinol Metab*. 2003;88:2404-11.
4. Ozebey N, Sencer E, Molvalilar S. Body fat distribution and cardiobascular disease risk factors in pre and post menopausal obese women with similar BMI. *Endocr J*. 2002;49(4):503-9.
5. Ahn DK, Park KM, Park KW, Kang H, Kim SJ, Jang BH, et al. Effects of Herbal Mixture Extracts Containing *Angelica gigas* Nakai and *Cuscuta chinensis* Lam. on Menopausal Symptoms in Ovariectomized Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2016;45(8):1083-89.
6. Winneker RC, Harris HA. Progress and prospects in treating postmenopausal vaginal atrophy. *Clin Pharmacol Ter*. 2011;89:129-32.
7. Samat A, Rahim A, Barnett A. Pharmacotherapy for obesity in meonopausal women. *Menopause Int*. 2008;14(2):57-62.
8. Jeonguk hanuigwadahak bonchohak gongdong gyojaebyeonchanwiwonhoe. *Herbology*. Seoul: Younglimsa publishing company. 2016:375-7.
9. Kang KH, Lee BC, Ahn SY, Doo HK, Ahn YM. The Effects of *Zingiberis rhizoma* on Hypothyroidism Rat induced by PTU. *Korean J Orient Int Med*. 2006;27(3):677-87.
10. Nam SC, Kang H, Shim BS, Kim SH, Choi SH, Ahn KS. Angiogenic inhibitory effect of *Zingiberis Rhizoma*. *J Korean Orient Oncology*. 2006;11(1):55-63.
11. Shin JH, Lee SJ, Sung NJ. Effects of *Zingiber mioga*, *Zingiber mioga* Root and *Zingiber dfficinale* on the Lipid Concentration in Hyperlipidemic Rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 2002;31(4):679-84.
12. Mckinlay S, Jefferrys M. The menopausal

- syndrome. *Brit J prev soc Med.* 1974;24:108-115.
13. Poehlman ET. Menopause, energy expenditure, and body composition. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002;81(7):603-11.
 14. Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A, Nasti A, et al. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology.* 2004;145:3115-21.
 15. Wang JF, Guo YX, Niu JZ, Liu J, Wang LQ, Li PH. Effects of Radix Puerariae flavones on liver lipid metabolism in ovariectomized rats. *World J Gastroenterol.* 2004;10:1967-70.
 16. Hong SM, Chil WH, Kim JM, Yong MJ, Lee CB, Park YS, et al. Correlation of Serum Total Testosterone with Obesity and Metabolic Syndrome in Premenopausal and Postmenopausal Women. *Korean J Obes.* 2004;13(4):300-7.
 17. You YO. Side Effects and Management of Postmenopausal Hormone Replacement Therapy. *J Menopausal Med.* 2004;10(1):14-20.
 18. Kim DI. After July 2002, What can we do for menopausal women-A review of recent research about HRT and a proposal of alternative therapies for treating climacteric or menopausal syndrome-. *J Orient Obstetrics & Gynecology.* 2004;17(3):105-15.
 19. Lee SC, Chung SI, Kang MY. Water extracts of *Eucommia ulmoides* improve lipid, glucose, and antioxidant metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Food Sci Technol.* 2016;48(6):604-9.
 20. Sung HM, Shin YR, Chae HJ, Seo HY, Wee JH, Jung KO, et al. Pomegranate Extract Improves Menopausal Syndrome in Ovariectomized Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015;44(4):506-15.
 21. Lee SH, Kim DC. Aqueous Extracts of *Jibaekjihwang-tang* Ameliorate Ovariectomy-induced Climacterium Symptoms in Mouse. *J Korean Obstet Gynecol.* 2017;30(2):16-36.
 22. Kim HC. *Korea medicine pharmacology.* Seoul:Jipmoondang publishing company. 2001:250-252.
 23. Wronski TJ, Cintron M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.* 1988;43:179-83.
 24. Abe T, Chow JWM, Lean JM, Chambers TJ. Estrogen does not restore bone loss after ovariectomy in the rat. *J. Bone Miner. Res.* 1993;8:831-8.
 25. Zhang Y, Proneca R, Maffei M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425-32.
 26. Yoshimatsu H, Itateyama E, Kondou S, Tajima D, Himeno K, Hidaka S, Kurokawa M, et al. Hypothalamic neuronal histamine as a target of leptin in feeding behavior. *Diabetes.* 1999;48:2286-91.
 27. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine.* 1995;1:1155-61.
 28. Perusse L, Collier G, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, et al. Acute and chronic effects of exercise on leptin levels in humans. *Journal of Applied Physiology.* 1997;83:5-10.
 29. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. *AdipoQ* is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 1996;271:10679-703.
 30. Rudman D. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N. Engl. J. Med.* 1990;323:1-6.
 31. Fatouros IG, Tournis S, Leontsini D, Jamurtas AZ, Sxina M, Thomakos P, et al. Leptin and adiponectin responses in overweight inactive elderly following resistance training and detraining are intensity related. *Clin. Endocrinol.*

- Metab. 2005;90(11):5970-77.
32. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402:656-60.
 33. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 2001;120:337-45.
 34. Hansen TK, Dall R, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Christiansen JS, et al. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol*. 2002;56:203-6.
 35. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;91:7355-9.
 36. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14:1293-307.
 37. Handschin C, Spiegelman BM. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature*. 2008;454:463-69.