Journal of Korean Medicine Rehabilitation Vol. 29 No. 4, October 2019
pISSN 1229-1854 eISSN 2288-4114
https://doi.org/10.18325/jkmr.2019.29.4.15

JKMR
Original Article

산사의 장내 미생물 조절을 통한 항비만 효과

김민지 · 최유라 · 신나래 · 이명종 · 김호준
동국대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Anti-obesity Effect of *Crataegus pinnatifida* through Gut Microbiota Modulation in High-fat-diet Induced Obese Mice

Min-Jee Kim, K.M.D., Yura Choi, M.S., Na Rae Shin, M.S., Myeong-Jong Lee, K.M.D., Hojun Kim, K.M.D.
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

본 연구는 한국연구재단의 중견연구자지원사업에 의해 이루어졌음(과제고유번호: NRF-2019R1A2B5B01070365).

RECEIVED September 15, 2019
REVISED October 2, 2019
ACCEPTED October 6, 2019

CORRESPONDING TO
Hojun Kim, Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Dongguk University Medical Center, 27 Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang 10326, Korea

TEL (031) 961-9111
FAX (031) 961-9009
E-mail kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2019 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Objectives This study was performed to evaluate anti-obesity effects of *Crataegus pinnatifida* (CP) on high-fat-diet induced obese mice.
Methods The experimental animals were divided into four groups: normal diet (NOR) group, high fat diet (HFD) group, HFD+Xenical (XEN) group, and HFD+CP (CP) group. NOR group was fed a normal diet and the other three groups were fed high fat diet during the experiment. After the first two weeks of diet, XEN group and CP group were administered with XEN or CP for seven weeks, respectively. After that, we measured body weight, liver weight, fat weight, food intake, and serum concentrations of lipids and liver enzymes. Also the liver, intestine, fat tissue was removed to estimate the obesity-related mRNA expressions and the stool sample was collected to analyze the gut microbiota.
Results We found that body weight, fat weight, and triglyceride level were decreased significantly in CP group compared to HFD group. Also CP significantly suppressed gene expressions associated with lipogenesis and inflammation, and increased gene expressions of browning of white adipose tissue and mitochondrial biogenesis. Moreover, it shifted the microbial diversity closer to that of NOR group and increased Firmicutes/Bacteriodetes ratio.
Conclusions These results suggest that CP decrease body weight, fat weight and serum triglyceride. Also it inhibit inflammation and adipogenesis, altering gut microbial diversity and abundance. In conclusion, CP could be used as a therapeutic drug for obesity via gut microbiota modulation. **(J Korean Med Rehabil 2019;29(4):15-27)**

Key words Crataegus, Microbiota, Obesity

서론»»»»

비만 인구는 전 세계적으로 급속하게 증가하고 있다. 1975년 이래 비만 인구는 거의 3배가 되었으며 2016년에는 성인의 39%가 과체중이고 13%가 비만이다[1]. 국내 비만 유병률도 2009년 29.7%에서 2015년 32.4%로 꾸준히 증가하고 있다. 이와 함께 고혈압, 제2형 당뇨병, 이상지질혈증의 유병률도 급격히 증가하고 있는데, 체질량지수에 비례하여 증가하는 경향이 있다[2]. 즉 비만 환자는 고혈압 및 심혈관 질환과 같은 대사질환이 동반될 가능성이 높으며, 나아가 결장암, 유방암 및 난소암을 포함한 특정 종류의 암과도 밀접한 관계가 있다[3,4].

따라서 비만 치료는 체중뿐만 아니라 비만 관련 질환의 위험을 감소시키는데, 3~5%의 체중감소는 당뇨병과

심혈관질환의 위험을 유의하게 감소시킨다. 비만의 기본적인 치료는 식단 관리와 운동, 행동 수정 요법과 같은 생활습관의 교정이지만, 대한비만학회에서는 체질량지수 25 kg/m^2 이상인 환자가 생활습관 교정으로 체중 감량에 실패한 경우에 약물 처방을 고려할 것을 권고한다[5]. 국내에서 장시간 사용이 허용된 비만 치료제는 총 4가지가 있는데, lorcaserin, orlistat, bupropion/naltrexone 병합제, liraglutide이다[6]. Locaserin과 bupropion/naltrexone 병합제는 식욕을 억제하지만 오심, 변비, 두통을 일으키며, orlistat는 지방흡수를 저해하지만 지방변, 팽만감 같은 장관 내 부작용이 있다. 또한 liraglutide는 혈당, 식욕에 영향을 주어 비만을 개선하지만, 저혈당뿐 아니라 오심, 설사같은 소화기계 부작용이 흔히 발생한다[7]. 이와 같은 약물의 부작용 때문에 이를 대체할 수 있는 비만치료에 대한 관심이 높아지고 있다.

산사(*Crataegus pinnatifida,* CP)는 장미과(Rosaceae) 산사나무(*Crataegus pinnatifida* Bunge)의 잘 익은 열매로[8], 실험적 연구에서 고혈압, 당뇨를 포함한 대사질환 개선[9], 기억력 개선[10], 알레르기성 접촉피부염[11] 및 호흡기질환[12] 완화, 백내장 예방[13] 등 다양한 효능이 보고되었다. 대사와 관련되어서는 이상지질혈증과 비만에 효과가 있다고 밝혀졌는데, 3T3-L1 세포의 분화와 중성지방의 축적을 억제하였고, 비만 쥐에서는 신체 및 지방 조직의 무게를 감소시키고 혈청과 간조직의 지질 수치를 낮추었다[14].

최근 장내 미생물이 염증, 인슐린 분비, 지질 및 당대사에 영향을 주는 것으로 밝혀지면서 장내 미생물과 비만의 연관성에 관해 많은 연구가 진행되고 있다[15]. 한약 또한 장내 미생물 조정을 통해 비만을 개선시킬 수 있다고 보고되었다. 고지방 식이를 한 쥐에게 조위승청탕을 투여한 후 시상하부와 내장지방조직 모두에서 비만을 촉진하는 유전자 발현은 저하되고, 비만을 억제하는 유전자 발현은 증가시켰다. 이와 함께 장내 미생물 구성의 변화가 나타났는데, 특히 Firmiutes/Bacteriodes 비율이 감소하였다[16]. 산사 추출물 또한 장내 미생물에서 Bacteroides의 성장을 촉진시킨다는 연구가 있었지만[17], 이러한 변화가 대사과정에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다.

이에 본 연구에서는 비만을 유도한 쥐에게 산사를 투여한 후 체중, 식이섭취량, 지방무게, 혈청 내 지질수치, 지방생성 및 염증과 관련한 유전자 발현, 그리고 장내 미생물의 분석을 통해 산사의 비만에 대한 영향을 확인하고 이와 관련한 기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법»»»

1. 재료

1) 동물

대한바이오링크(Daehanbiolink, Eumseong, Korea)에서 4주령의 암컷 C57BL/6J mouse 32마리를 공급받았다. 실험의 전 기간 동안 사육실은 적정한 온도(25℃)와 습도(50~60%), 12시간 light-dark cycle 환경을 유지하였다. 실험 전 1주 동안은 정상적인 식이를 공급하며 동물을 적응시켰다. 이때 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토와 효율적인 관리를 위해 동국대학교 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았으며(승인번호: IACUC-2018-005) 동물실험의 관리 및 사용 가이드에 따라 수행되었다[18].

2) 약재

본 실험에 사용한 산사(CP)는 엔탭허브(Entap Herb, Yangju, Korea)에서 중국산 산사를 구입하여 사용하였다. 산사를 물로 잘 세척한 후 분쇄하여 분말 산사(500 g)를 30%의 에탄올 5 L로 추출한 후, 혼합물을 1시간 동안 상온의 수조에서 sonicated하였다. 이어서 실온에서 15분 동안 원심 분리하고, 상층액을 No.4 paper filter (Whatman, Maidstone, UK)을 이용하여 여과하였다. 잔류물을 30% 에탄올(v/v) 40 mL을 사용하여 동일한 처리를 2회 수행하였다. 액체 추출물을 rotatory evaporator (EYELA N-1200A; EYELA, Tokyo, Japan)로 증발 건조시킨 후 동결건조기(Bondiro; IlshinBioBase, Dongducheon, Korea)를 사용하여 동결 건조하고 -80℃에 보관한 뒤 시료로 사용하였다.

2. 방법

1) 군 분리와 약물 투여

실험군은 정상군(normal diet, NOR), 고지방식이군(high fat diet, HFD), 고지방식이 후 Xenical을 복용한 군(Xenical, XEN), 고지방식이 후 산사를 복용한 군(CP)으로 총 4개

의 군으로 각각 8마리로 구성되었다. NOR군은 9주 동안 정상식이(Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA)를 유지하였고, NOR군을 제외한 나머지 3개 군은 비만을 유도하기 위해 9주간 고지방식이(60% high-fat diet; Research Diets Inc.)와 20% 과당수를 투여하였다. 이때 과당수는 주 5회 제공하였다. 실험 처음 2주 후 고지방식이 유발 비만 쥐를 3가지 군으로, 즉 HFD군, XEN군, CP군으로 각 군마다 8마리씩 무작위로 분리하였다. 그리고 Xenical (10 mg/kg/day)과 산사(400 mg/kg/day)를 증류수에 용해시켜 각각 XEN군과 CP군에게 7주간 경구 투여하였다(Table I).

2) 체중과 식이섭취량 측정

실험동물의 체중은 전자체중계로 주 1회 동일 시간 및 조건에서 측정하였다. 식이섭취량은 1일 동안 자율급식으로 제공된 사료에서 1일간 섭취하고 남은 사료의 양을 제외하여 계산하였다.

3) 혈청 분석

실험동물을 희생하기 전에 18시간 절식시킨 후 부검하였으며, 동국대학교 동물윤리위원회의 지침 및 실험계획에 따라 마취제는 Zoletil (Tiletamine-zolazepam; Virbac, Carros, France) 및 Rompun (xylazine-hydrochloride; Bayer, Leverkusen, Germany)을 사용하여 동일한 농도(1 ml/kg)로 복강 내로 주사하였다. 그 후 복부 대동맥으로부터 혈액을 수집하고 BD Vacutainer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 저장하고 실온에서 2시간 동안 저장한 다음 3,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하였다. 원심 분리한 혈청을 1.5 mL 튜브에 옮기고 -80℃에 보관한 후 사용하였다.

혈청의 총 콜레스테롤(total cholesterol, TC), 중성지방(triglyceride, TG), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) 함량은 효소 kit (ASAN Pharmaceutical, Co., Seoul, Korea)로 분석하였다.

4) 각 조직에서 유전자발현 측정

지방 조직, 간 조직, 장 조직은 신체와 분리되어 phosphate buffer saline에서 빠르게 세척하였고, 무게를 측정한 뒤 즉시 -80℃에서 Quantitative real time-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 작업에 사용할 때까지 보관하였다. 총 RNA를 Trizol을 이용하여 간, 백색지방, 장으로부터 추출하였다. cDNA는 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 1 ug으로 합성되었다. qRTPCR은 SYBR Green master mix (TOYOBO, Osaka, Japan)를 사용하여 수행하였고, 표적 유전자의 값을 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase로 정규화하였다.

5) 장내 미생물 및 시퀀스 분석

(1) 장내 미생물 분석

대변으로부터 Genomic DNA는 restriction fragment length polymorphism에 대한 키트 제조사의 지침에 따라 QIAamp stool DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 분리되었다. 16s rRNA 유전자 서열의 V1-V3 영역의 PCR을 barcode primer에 의한 C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 그 후 PCR 생성물을 LaboPass PCR purification kit (COSMO GENTECH, Seoul, Korea)를 사용하여 정제하였다.

각 샘플을 동일한 농도로 모으고 Ampure bead kit (Agencourt Bioscience, Bevely, MA, USA)를 사용하여 정제하고 PicoGreen dsDNA assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 정량화하였다. 혼합된 amplicons

Table I. Grouping of Experiment Animals

Group	Number	Diet	Intervention
NOR	8	Normal diet	•
HFD	8	60% high-fat diet +20% fructose water	•
XEN	8	60% high-fat diet +20% fructose water	XEN (10 mg/kg/day)
CP	8	60% high-fat diet +20% fructose water	CP (400 mg/kg/day)

NOR: normal diet, HFD: high fat diet, XEN: Xenical, CP: *Crataegus pinnatifida.*

을 emulsion PCR에 의해 시퀀싱 비드에서 증폭시켰다. 그런 다음 Roche/454 GS Junior system (454 Life Sciences, Branford, CT, USA)을 사용하여 시퀀싱을 수행하였다. 원시 시퀀스 데이터는 수탁 번호가 PRJEB19873인 European Nucleotide Archive에서 확인할 수 있다.

(2) 시퀀스 분석

판독 품질 필터링(평균 품질 점수<20 또는 판독 길이 <300 bp) 후, Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME) 1.9.0을 사용하여 서열을 처리하였다. 그리고 QIIME software package[19]를 사용하여 open reference OUT picking method (97% 시퀀스 유사성)을 사용하여 operational taxonomic unit를 클러스터링 하였다. 장내 미생물의 전체 구조적 변화는 UniFrac-based principal coordinateds analysis (PCoA)에 의해 분석되었으며, 이는 각 그룹에서 미생물 조성의 개별 군집을 나타냈다.

6) 통계분석

모든 측정값은 평균값과 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군 간의 통계분석은 GraphPad prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 시행하였다. 이때 Turkey Multiple Comparison test로 사후검증을 실시해 p-value가 0.05 이하인 경우에 군 간 통계적인 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결과»»»

1. 체중, 식이섭취량

식이섭취량은 NOR군 2.22±0.33 g/day, HFD군 1.93±0.45 g/day, XEN군 1.54±0.23 g/day, CP군 1.70±0.27 g/day으로, HFD군에 비해 XEN군과 CP군에서 유의하게 섭취량이 감소하였다. 모든 군에서 실험 전 기간 동안 체중이 증가하였는데, 체중증가량은 XEN군과 CP군이 HFD군에 비해 유의하게 적었다(Fig. 1).

2. 간 조직 무게 및 지방 조직 무게

내장지방과 신장지방 무게 및 총 지방 무게는 HFD

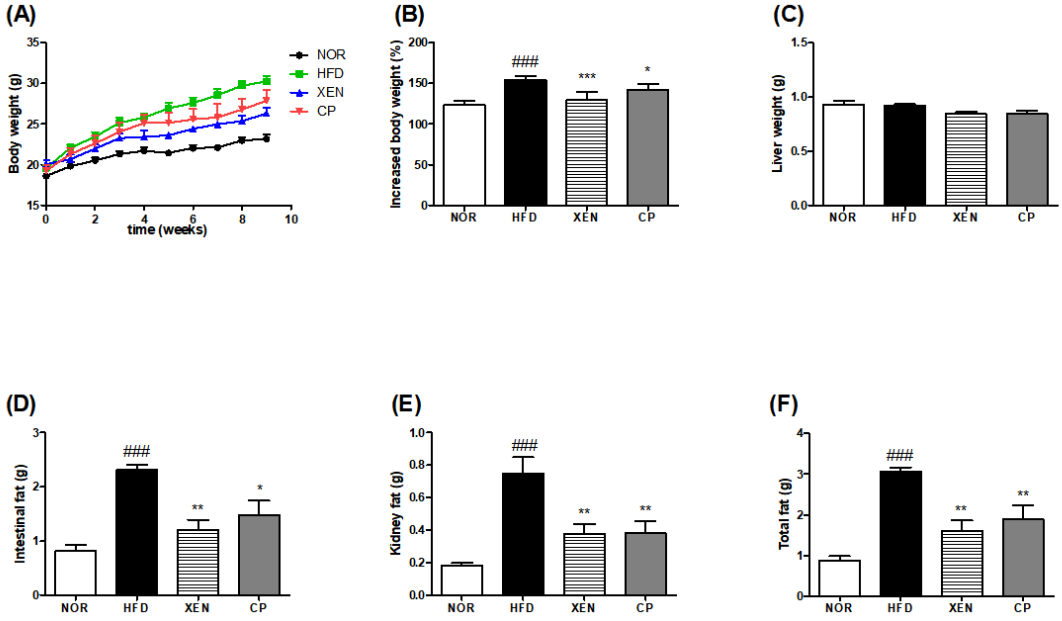

Fig. 1. Effect of CP on body weight, liver weight and fat weight in HFD induced mouse model after treatment for 9 weeks. (A) body weight, (B) increased body weight, (C) liver weight, (D) intestinal fat weight, (E) kidney fat weight and (F) total fat weight. Data shown in mean±standard deviation and evaluated using one-way analysis of variance (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 compared to the Normal group; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to the HFD group). NOR: normal diet, HFD: high fat diet, XEN: Xenical, CP: *Crataegus pinnatifida*.

군에 비해 XEN군과 CP군에서 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 다만 간 조직 무게에 있어서는 군 간에 유의한 차이는 없었다(Fig. 1).

3. 혈청 분석

1) 혈청 내 지질함량

지질대사에 대한 영향을 분석하기 위해 혈청 TC, TG 함량을 측정하였다. TC 측정 결과, HFD군이 NOR군에 비해 유의하게 높게 나타났으며, 그 외 군 간에 유의한 차이는 없었다. 반면 TG는 HFD군과 비교하였을 때, XEN군과 CP군에서 감소하는 경향이 있었으나 CP군에서만 유의성이 있었다(Fig. 2).

2) 혈청 내 간 기능

식이 및 약물에 의한 간 기능 변화를 관찰하기 위해 GPT, GOT 함량을 측정하였다. GPT 함량은 NOR군에 비해 HFD군에서 유의한 상승을 보였으나, XEN군과 CP군에서는 유의한 변화는 나타나지 않았다. 반면 GOT 함량은 군 간에 유의한 차이가 없었다(Fig. 2).

4. 대사 및 염증 관련 유전자 발현에 미치는 영향

1) 지방합성 관련 유전자 발현

지방합성 억제 효과를 확인하기 위해 간에서 지방합성과 연관된 유전자 발현 수준을 평가하였다. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ)와 lipoprotein lipase (LPL) 유전자는 HFD군과 비교하여 XEN군과 CP군에서 유의하게 발현이 억제되었다. 반면 fatty acid synthase (FAS) 유전자 발현을 측정한 결과, HFD군에 비해 XEN군과 CP군에서 감소하는 경향을 보였으나 둘다 유의성은 없었다(Fig. 3).

2) 열발생 및 미토콘드리아 생합성 관련 유전자 발현

열발생 및 미토콘드리아 생합성과 관련한 유전자 발현 정도를 파악하기 위해, 지방조직에서 uncoupling protein 1 (UCP1), nuclear respiratory factor 1 (NRF1), mitochondrial transcription factor A (Tfam)의 유전자 발현

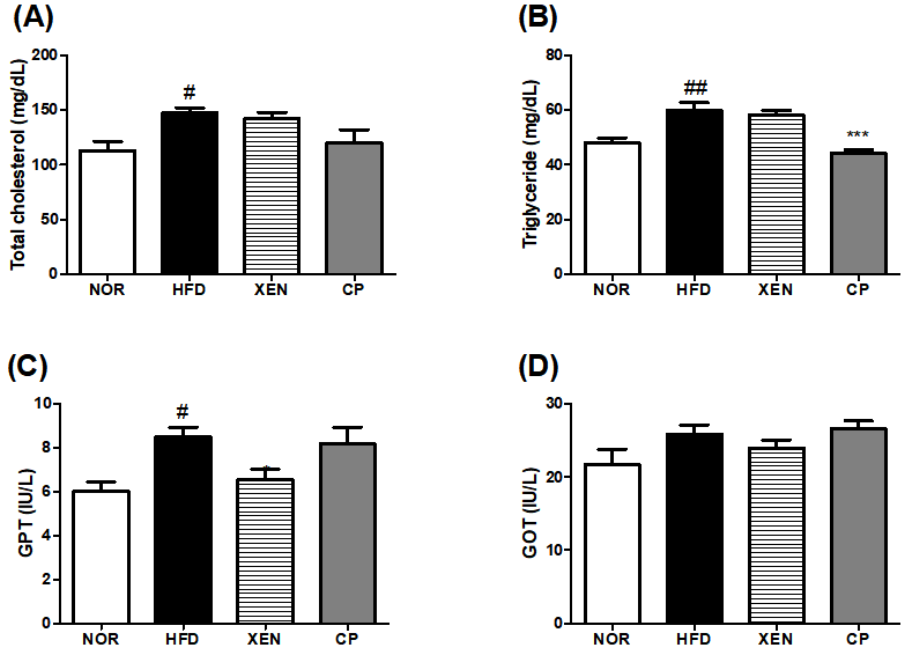

Fig. 2. Effect of CP treatment on lipid metabolism in HFD induced mouse model after treatment for 9 weeks. The concentration of serum (A) total cholesterol, (B) triglyceride, (C) GPT and (D) GOT levels were determined using commercial enzymatic assay kits. Data shown in mean±standard deviation and evaluated using one-way analysis of variance (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 compared to the Normal group; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to the HFD group). NOR: normal diet, HFD: high fat diet, XEN: Xenical, CP: *Crataegus pinnatifida*, GPT: glutamic pyruvic transaminase, GOT: glutamic oxaloacetate transaminase.

수준을 측정하였다. HFD군과 비교했을 때 XEN군과 CP군에서 모두 UCP1 유전자 발현이 유의하게 증가하였다. NRF1 활성 또한 HFD군에 비해 XEN군과 CP군에서 모두 증가되었으나, 오직 CP군에서만 유의성을 나타냈다. 반면 Tfam 유전자 발현은 군 간에 유의한 차이는 없었다(Fig. 4).

3) 염증 관련 유전자 발현

9주간의 고지방식이에 대한 CP의 항염증 효과를 보기 위해, 내장에서 염증 지표인 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), interleukin-1beta (IL-1β), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) 유전자 발현 수준을 평가하였다.

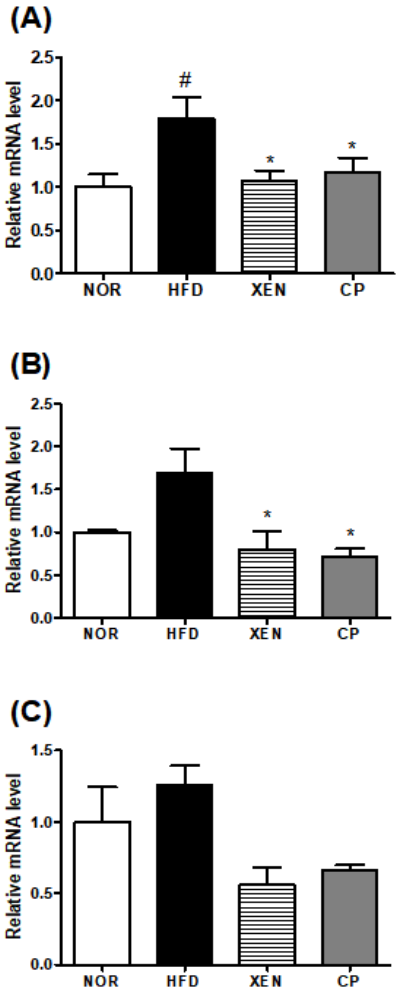

Fig. 3. Effect of CP treatment on gene expression of lipid metabolism in HFD induced mouse model after treatment for 9 weeks. The mRNA gene expression of liver was determined by RT-PCR. The relative gene expression of (A) PPAR-γ, (B) LPL, and (C) FAS were measured in liver. Data shown in mean±standard deviation and evaluated using one-way analysis of variance (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 compared to the Normal group; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to the HFD group). NOR: normal diet, HFD: high fat diet, XEN: Xenical, CP: *Crataegus pinnatifida*, RT-PCR: real-time reverse transcription polymerase chain reaction, PPAR-γ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, LPL: lipoprotein lipase, FAS: fatty acid synthase.

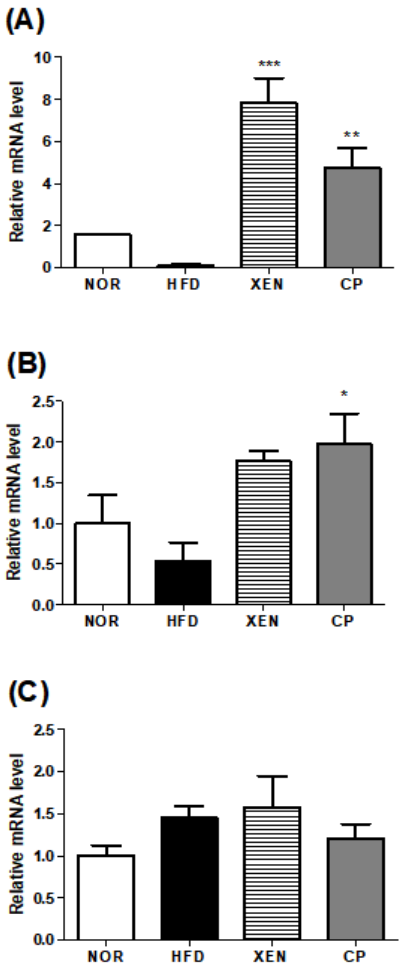

Fig. 4. Effect of CP treatment on gene expression of thermogenic and mitochondrial biogenesis markers in HFD induced mouse model after treatment for 9 weeks. The mRNA gene expression of adipose tissue was determined by RT-PCR. The relative gene expression of (A) UCP1, (B) NRF1, and (C) Tfam were measured in adipose tissue. Data shown in mean±standard deviation and evaluated using one-way analysis of variance (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 compared to the Normal group; *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 compared to the HFD group). NOR: normal diet, HFD: high fat diet, XEN: Xenical, CP: *Crataegus pinnatifida*, RT-PCR: real-time reverse transcription polymerase chain reaction, UCP1: uncoupling protein 1, NRF1: nuclear respiratory factor 1, Tfam: mitochondrial transcription factor A.

HFD군과 비교했을 때 XEN군과 CP군에서 IL-1β, TNF-α의 발현이 유의하게 억제되었다. 단, MCP-1 유전자 발현은 오직 CP군에서만 유의하게 저하되었다. 내장뿐 아니라 간에서도 염증 관련 유전자 활성을 측정하였는데, IL-6 (Interleukin 6)의 활성이 XEN군과 CP군이 HFD군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

5. 장내 미생물 분석

1) 미생물 다양성

미생물의 베타 다양성은 unweighted로 PCoA에 의해 평가되었다. PCoA 분석 결과, HFD군과 NOR군은 미생물의 다양성이 뚜렷이 구별되었다. 또한 XEN군과 CP군은 NOR군과 HFD군과도 명확히 구분되었으며, CP군이 XEN군에 비해 비교적 NOR군에 가깝게 위치하였다(Fig. 6).

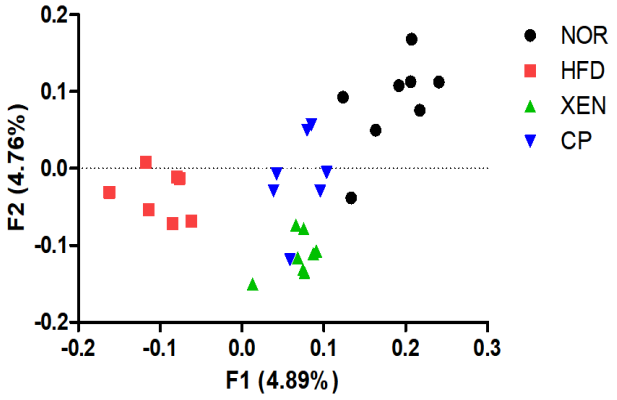

Fig. 6. Effect of CP treatment on gut microbial diversity in HFD induced mouse model after treatment for 9 weeks. Principal coordinates analysis plot of distance between samples matrix from fecal RFLP. PCA score scatter plot of T-RFLP data calculated from operational taxonomic unit levels by QIIME subjected to unweighted UniFrac analysis. NOR: normal diet, HFD: high fat diet, XEN: Xenical, CP: *Crataegus pinnatifida*, RFLP: restriction fragment length polymorphism, PCA: principal component analysis, T-RFLP: terminal restriction fragment length polymorphism, QIIME: quantitative insights into microbial ecology.

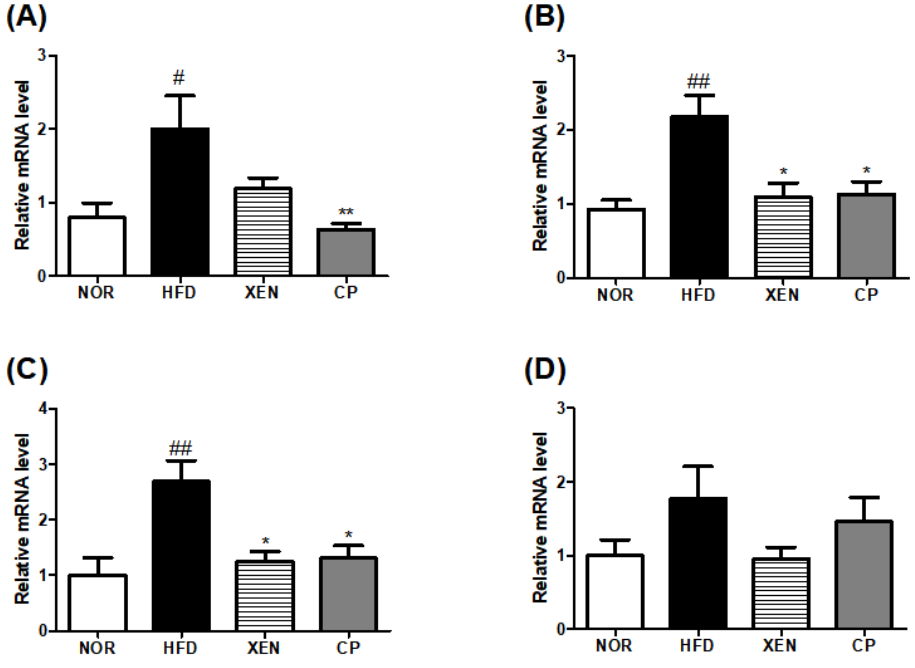

Fig. 5. Effect of CP treatment on gene expression of inflammation markers in HFD induced mouse model after treatment for 9 weeks. The mRNA gene expression of intestine was determined by RT-PCR. The relative gene expression of (A) MCP-1, (B) IL-1β and (C) TNF-α for inflammation were measured in intestine. The relative gene expression of (D) IL-6 was measured in liver. Data shown in mean±standard deviation and evaluated using one-way analysis of variance (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 compared to the Normal group; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to the HFD group). NOR: normal diet, HFD: high fat diet, XEN: Xenical, CP: *Crataegus pinnatifida*, RT-PCR: real-time reverse transcription polymerase chain reaction, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, IL-1β: Interleukin-1beta, TNF-α: tumor necrosis factor-alpha, IL-6: Interleukin 6.

2) 개별 미생물 분포

개별 미생물의 상대적인 분포를 문(phylum) 수준에서 분석한 결과, 실험군 모두 미생물의 대부분이 Firmicutes와 Bacteriodetes로 구성된 것을 관찰하였다. 이때 Firmicutes 비율은 HFD군에 비해 XEN군과 CP군에서 유의하게 감소하였으나, Bacteriodetes 비율은 XEN군과 CP군에서 유의하게 증가하였다. 또한 두 미생물의 비율인 Firmicutes/Bacteriodetes (F/B) 비율이 HFD군과 비교했을 때 XEN군과 CP군에서 감소한 것을 볼 수 있는데, 오직 XEN군에서만 유의성이 있었다. 속(genus) 수준에서는 오직 Bacteriodes가 HFD군에 비해 XEN군과 CP군에서 유의하게 증가하였으며, 그 외 군 간에 유의하게 차이가 나는 미생물은 없었다(Fig. 7).

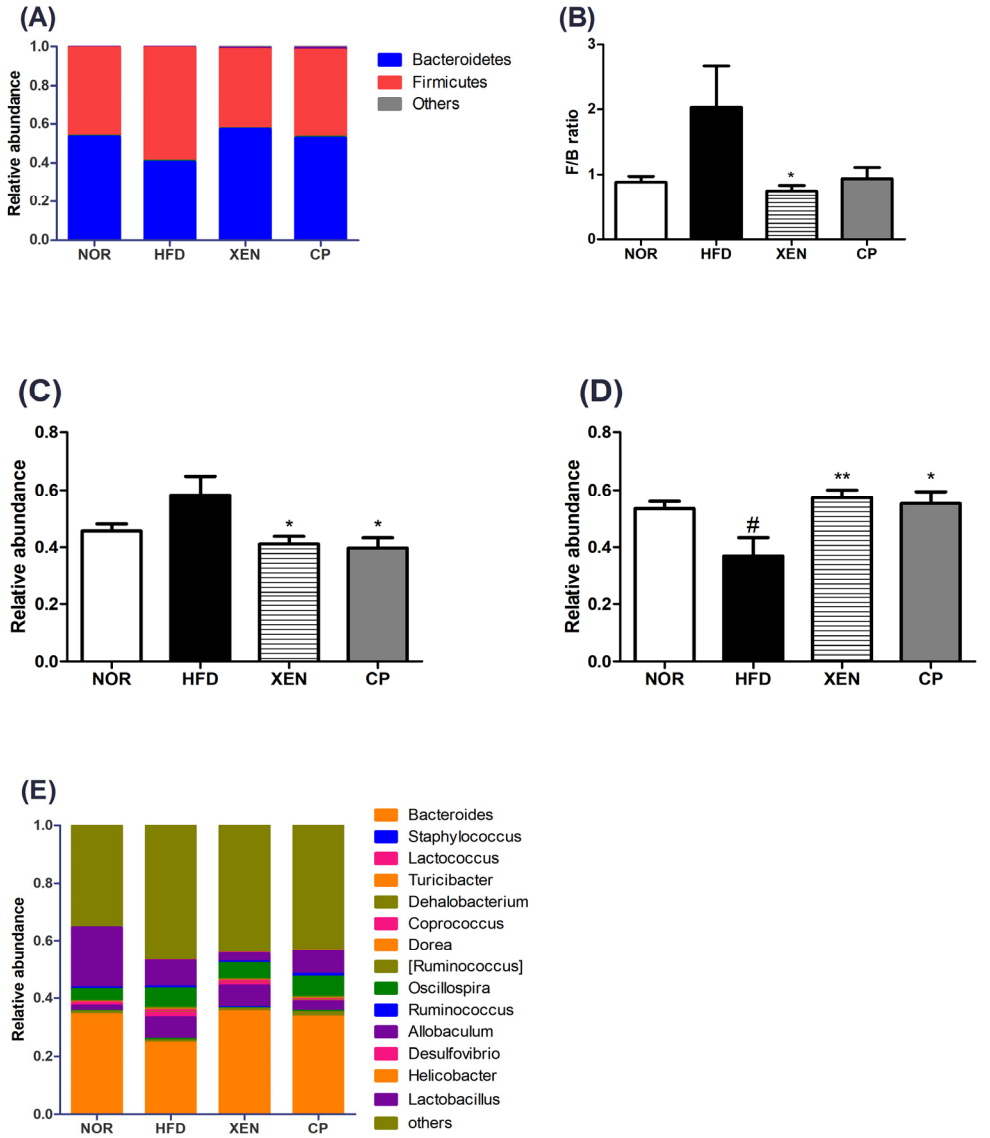

Fig. 7. Inter-group variation in the relative abundances of gut microbial communities in HFD induced mouse model after treatment for 9 weeks. (A) Relative abundance in phylum level, (B) Firmucutes and Bacteriodetes ratio, (C) Relative abundance in Firmicutes phylum, (D) Relative abundance in Bacteriodetes phylum, (E) Relative abundance in genus level. NOR: normal diet, HFD: high fat diet, XEN: Xenical, CP: *Crataegus pinnatifida*.

고찰

비만은 건강에 해를 끼칠 만큼 체내에 지방이 비정상적이거나 과도하게 축적된 상태이다. 원인에 따라 크게 원발성 비만과 이차성 비만으로 나누어 볼 수 있는데 전체 비만의 90% 이상은 원발성 비만이다. 원발성 비만은 에너지 섭취량과 소모량의 불균형이 주된 원인으로, 하나의 특정한 원인이 아닌 식습관, 생활습관, 연령, 인종, 사회경제적인 요소, 유전, 신경내분비 변화 등의 다양한 요인이 복합적으로 작용해서 발생한다[20]. 하지만 현재 비만에 처방되는 약물들은 대부분 특정 경로만을 목적으로 하고 소화기계 부작용이 있기 때문에[7] 비만 치료에 한계점이 있다. 또한 비만은 대사질환과 암의 위험성도 높이기 때문에[3,4], 비만을 안전하고 효율적으로 치료하는 것에 대한 관심이 높아지고 있다.

산사는 한의학적으로 성미가 微溫, 酸甘하고 脾胃肝經에 귀경하여 健脾消食, 破氣散瘀하는 효능이 있다[8]. 이미 산사에 대한 연구는 고지혈증, 당뇨, 동맥경화증, 비만 같은 대사질환을 개선하는 방면에서 많이 진행되었다[9]. 제2형 당뇨가 유발된 쥐에게 산사를 투여한 후 혈당은 감소하고 인슐린이 증가하였고[21], 고지방식이를 한 햄스터는 산사 복용 후 대조군에 비해 유의하게 체중과 지방세포가 감소했고, TC와 low-density lipoprotein-cholesterol이 각각 15%, 20% 감소한 반면 high-density lipoproteincholesterol은 27% 증가하였다[22]. 그리고 산사약침은 지방전구세포의 분화를 약간 억제하고, 농도 증가에 따라 지방분해 효과를 나타냈다[23].

장내 미생물은 우리 몸의 가장 큰 부분 중 하나로 사람의 유전자보다 100배 이상 많은 유전자를 포함하기 때문에[24], 인체 기능의 주요 조절자로 중요성이 점점 더 커지고 있다. 여러 연구에서 정상 체중인 사람과 구별되는 비만한 사람들의 장내 미생물 변화가 관찰되는데, 미생물의 다양성이 감소하고 F/B가 증가한다[25]. 또한 비만인 사람은 Parabacteroides, Ruminococcus, Campylobacter, Porphyromonas, Staphylococcus 등의 비율이 상대적으로 많은 반면, 마른 사람은 Faecalibacterium, Bifidobacterium, Lactobacillus, Butyrivibrio, Akkermansia 등이 풍부하다[26]. 즉 미생물의 구성에 따라 에너지 대사가 달라져 체중조절에 중요한 역할을 담당하기 때문에, probiotics, prebiotics 또는 Fecal microbiota transplantation를 이용하여 비만 및 대사 질환을 개선하는 연구가 진행되고 있다[27]. 하지만 산사의 항비만 작용과 장내 미생물과의 관련성을 연구한 경우는 아직까지 없었다. 따라서 본 연구에서는 비만을 유도한 쥐에게 산사를 7주간 투여하여 이로 인한 체중, 식이섭취량, 혈청 지질 및 간효소 함량, 비만관련 유전자 발현, 그리고 이때 나타나는 장내 미생물의 변화를 함께 분석하였다.

본 실험에서 양성대조군으로 사용한 Xenical은 orlistat계열의 약물로 위와 소장의 점막에서 lipase의 억제를 통해 중성지방이 지방산으로 분해되어 장관 내로 흡수되는 것을 저해하여 체중을 감소시킨다[6]. 실험 전 기간동안 NOR군에 비해 나머지 고지방식이를 했던 HFD군, XEN군, CP군에서 뚜렷하게 체중이 증가하였다. 이때 XEN군과 CP군의 체중증가량은 HFD군에 비해 유의하게 감소하였다. 한편 체질량지수가 높을수록 대사 및 심혈관 질환의 위험이 높아지는 것은 복부의 내장지방 축적 때문이다[28]. HFD군과 비교했을 때 XEN군과 CP군에서 신장지방과 내장지방의 무게도 유의하게 감소하였는데, 이를 통해 산사가 체중을 감량할 뿐 아니라 내장지방을 감소시켜 비만과 관련한 여러 질환을 개선할 가능성이 있음을 확인하였다. 식이섭취량도 HFD군과 비교했을 때 XEN군과 CP군에서 유의하게 감소하였고 간 조직 무게에서는 군 간에 유의한 차이가 없어(Fig. 1), 향후 식욕억제 기전 및 간 조직 내에 지질함량에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 본다.

과다섭취로 체내 잉여 에너지가 많아지면 간에서 콜레스테롤 합성이 촉진되어 TC, TG가 상승하는데[29], 특히 TG는 피부와 내장에 축적되어 비만의 원인이 되며 나아가 간, 심장 등 장기의 기능은 저하된다[30]. HFD과 비교했을 때 TC는 CP군에서 유의한 차이는 없었으나, TG가 CP군에서 유의하게 저하되었다. 즉 산사가 비만과 관련된 지질대사를 개선한다는 것을 알 수 있다. GPT, GOT는 간에서 생성되는 효소로 간손상의 지표이며 간에 지방이 과다하게 축적되는 경우 상승한다[31]. GPT, GOT 모두 CP군에서 NOR군에 비해 상승하는 양상이 나타났지만 유의성은 없었다(Fig. 2).

지방합성은 전구 줄기세포가 지질을 함유하는 지방세포로 분화하는 과정으로 수많은 전사인자의 복잡한 상호작용을 포함한다. 지방합성의 중요한 초기조절인자는 PPARγ와 cytosine-cytosine-adenosine-adenosine-thymidine/

enhancer binding proteins이 있고, 이후 성숙한 지방 세포를 형성하는 인자로는 fatty acid binding protein 4, adiponectin, FAS, LPL이 있다. 본 실험에서는 PPARγ, LPL, FAS 3가지 유전자의 발현을 관찰하였다. PPARγ는 전지방세포를 지방세포로 분화시키는 과정에 필수적이며 PPARγ 유전자의 활성화는 adiponectin을 증가시켜 간과 근육에서 인슐린 감수성을 높인다. LPL과 FAS는 유리지방산의 흡수와 관련된 효소이다[32]. HFD군과 비교하여 XEN군과 CP군에서 PPAR-γ와 LPL 유전자 발현은 유의하게 억제되었으나, FAS 유전자 발현은 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 3). 따라서 산사가 지방합성을 억제함으로써 비만을 개선하는 역할을 하는 것을 확인할 수 있으며, 이는 CP군에서 체중과 신장 및 내장지방 무게가 감소한 결과와도 일맥상통한다.

비만을 개선하는 또 다른 방법으로 UCP1의 발열작용을 이용하여 백색지방을 갈색지방화 하거나 미토콘드리아의 생합성을 증진시키는 방법이 있다. UCP1은 양성자가 미토콘드리아 매트릭스로 누출될 수 있게 해주며 이때 Adenosine Tri-Phosphate 합성에 사용될 에너지는 열로 발산된다. NRF1과 Tfam은 미토콘드리아 생합성에 관련된 인자이다[33,34]. UCP1 유전자 발현이 HFD군에 비해 XEN군과 CP군에서 유의하게 증가하였고, NRF1 발현은 오진 CP군에서만 유의하게 증가하였다(Fig. 4). 따라서 산사가 백색지방의 갈색지방화와 미토콘드리아 생합성을 유도함으로써 항비만 작용을 하는 것을 확인할 수 있다.

비만은 만성적인 저등도의 염증 상태로 볼 수 있는데[15], 본 실험에서 HFD군에 비해 MCP-1 유전자의 발현은 오직 CP군에서만, IL-1β와 TNF-α의 활성은 XEN군과 CP군에서 유의하게 억제되었다. IL-6 유전자 발현은 XEN군과 CP군이 HFD군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 5). 즉 산사는 고지방식이로 유도된 만성적인 염증상태를 완화할 수 있다고 생각된다.

장내 미생물과 비만의 관련성은 단쇄지방산의 생산, 호르몬의 자극, 만성 저등도의 염증상태, 지단백 및 담즙산의 대사 등으로 설명될 수 있다[15]. 특히 비만 환자는 정상 체중인 사람에 비해 장내 미생물의 다양성이 감소되어 있다[35]. 다양성은 장내 미생물의 대사능력을 증가시키는 면에서 중요한데, 대사성 내독소혈증, 점액분해 및 산화 스트레스를 방지하기 때문이다[36]. 또한 비만에서 특정 장내 미생물의 비율이 변화하는 것을 관찰할 수 있는데, 문 수준에서 Bacteroidetes 비율은 감소하는 반면 Firmicutes 비율은 증가하여, 비만에서는 F/B가 증가한다[35]. 본 실험에서 그룹 간의 다양성을 나타내는 베타 다양성을 분석하면 CP군이 HFD군과 NOR군 사이에 있다(Fig. 6). 그리고 개별 미생물의 비율을 보면 XEN군과 CP군에서 Firmicutes 비율은 유의하게 감소하고, Bacteriodetes 비율은 증가했다. F/B는 CP군도 감소하는 경향을 나타냈지만 오직 양성 대조군인 XEN군에서만 유의하게 감소하였다. 속 수준에서는 HFD군에 비해 XEN군과 CP군에서 오직 Bacteriodes가 유의하게 증가하였는데(Fig. 7), 이는 이전의 선행연구의 결과와도 일치한다[17]. 즉 고지방식이에 의해 유발된 미생물 다양성의 저하와 개별미생물의 비율의 변화가 산사의 투여에 의해 개선될 수 있는 가능성을 확인할 수 있다. 또한 장내 미생물의 구성 변화는 장벽의 기능에도 영향을 미치는데 만약 장 내벽이 손상되면 내독소가 혈중으로 쉽게 빠져나갈 수 있다[15]. 앞에서 염증인자인 IL-1β와 TNF-α 유전자 발현이 고지방식이에 의해 증가하지만 CP군에서 유의하게 감소한 것과 연관지어보면, 산사를 투여함으로써 장 내벽의 결합성이 증진되어 염증상태가 완화된 것으로 추측할 수 있다.

본 실험에서 산사는 양성대조군인 Xenical 만큼 체중과 지방무게를 감소시키고 지질대사를 개선할 수 있는 것으로 나타났다. 또한 지방합성과 염증과 관련한 유전자 발현을 하향 조절하고 백색 지방의 갈색화, 미토콘드리아의 에너지 생합성과 관련된 유전자의 발현은 상향 조절하는 것으로 판단된다. 이런 변화와 함께 장내 미생물의 다양성과 개별 미생물의 비율도 함께 대사를 개선하는 방향으로 바뀌는 것을 관찰할 수 있었다. 다만 장내 미생물이 어떤 기전으로 지방합성 및 지질대사에 영향을 미치는지에 대한 연구는 이뤄지지 않아 장내 미생물을 통한 직접적인 항비만 효과를 단정할 수 없다. 또한 비만은 여러 기전이 복합적으로 작용하여 발생하기 때문에 지질과 지방합성만으로는 산사가 비만에 효과가 있다고 확신하기는 어렵다. 따라서 추후 식욕, 당조절, 교감신경 등의 다양한 인자와 함께 장내 미생물의 대사체에 대한 연구가 추가적으로 진행된다면 산사가 비만뿐만 아니라 이와 관련된 대사질환을 개선하는 단미제 또는 prebiotic으로서 적극적으로 활용될

수 있을 것으로 생각된다.

결론»»»»

산사의 항비만효과를 알아보기 위해 고지방식이로 비만을 유도한 쥐를 이용한 실험에서 다음의 결과를 얻었다.

1. XEN군과 CP군에서 HFD군에 비해 식이섭취량, 체중증가량, 신장 지방 및 내장 지방무게가 유의하게 감소하였다. 다만 간 조직 무게는 군 간의 유의한 차이는 없었다.
2. CP군에서 HFD군에 비해 혈청 TG는 유의하게 감소하였으나 TC는 유의한 차이는 없었다. GPT는 NOR군에 비해 HFD군, XEN군, CP군에서 증가하였지만 HFD군에서만 유의성이 있었다. GOT는 군 간의 유의한 차이는 없었다.
3. HFD군과 비교하여 XEN군과 CP군에서 PPAR-γ와 LPL 유전자 발현은 유의하게 감소되었고 FAS 유전자 발현은 저해되는 경향을 보였으나 유의성은 없었다.
4. HFD군에 비해 CP군에서는 UCP1과 NRF1 유전자의 발현이 유의하게 증가하였고, XEN군에서는 UCP1 유전자의 활성만 증가되었다. 반면 Tfam 유전자 발현은 군 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다.
5. 내장에서 IL-1β와 TNF-α의 발현은 HFD군과 비교했을 때 XEN군과 CP군에서 유의하게 감소하였으며 MCP-1 유전자의 발현은 오직 CP군에서만 유의하게 억제되었다. 간에서 IL-6의 활성은 XEN군과 CP군이 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다.
6. 장내 미생물의 베타 다양성은 실험군 모두 뚜렷이 구분되며, XEN군에 비해 CP군은 상대적으로 NOR군에 밀접하게 위치하였다. 개별 미생물의 문 수준에서 HFD군에 비해 XEN군과 CP군에서 Firmicutes의 비율은 유의하게 감소하고 Bacteriodetes의 비율은 유의하게 증가하였다. 이 두 미생물의 비율인 F/B는 HFD군과 비교했을 때 오직 XEN군에서만 유의하게 감소하였고, CP군에서도 감소하는 경향이 있었지만 유의성은 없었다. 속 수준에서는 오직 Bacteriodes의 비율이 HFD군에 비해 XEN군과 CP군에서 유의하게 증가하였다.

결론적으로 산사는 양성대조군인 Xenical보다 유의하거나 유사한 체중 및 지방무게 감소, 지질대사 개선, 지방합성과 염증의 억제를 통해, 비만 환자에 있어 유효한 단미제 또는 prebiotic으로서 가능성이 나타났다.

References»»»»

1. World Health Organization. Obesity and overweight. WHO Fact sheet. 2015. [cited 2019 Sep 13]; Available from: URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight.
2. Seo MH, Kim YH, Han K, Jung JH, Park YG, Lee SS, Kwon HS, Lee WY, Yoo SJ. Prevalence of obesity and incidence of obesity-related comorbidities in Koreans based on National Health Insurance Service Health Checkup Data 2006-2015. J Obes Metab Syndr. 2018;27(1):46-52.
3. Everett E, Tamimi H, Greer B, Swisher E, Paley P, Mandel L, Goff B. The effect of body mass index on clinical/pathologic features, surgical morbidity, and outcome in patients with endometrial cancer. Gynecol Oncol. 2003;90(1):150-7.
4. von Gruenigen VE, Courneya KS, Gibbons HE, Kavanagh MB, Waggoner SE, Lerner E. Feasibility and effectiveness of a lifestyle intervention program in obese endometrial cancer patients: a randomized trial. Gynecol Oncol. 2008;109(1):19-26.
5. Seo MH, Lee WY, Kim SS, Kang JH, Kang JH, Kim KK, Kim BY, Kim YH, Kim WJ, Kim EM, Kim HS, Shin YA, Shin HJ, Lee KR, Lee KY, Lee SY, Lee SK, Lee JH, Lee CB, Chung S, Cho YH, Choi KM, Han JS, Yoo SJ. 2018 Korean Society for the Study of Obesity Guideline for the Management of Obesity in Korea. J Obes Metab Syndr. 2019;28(1):40-5.
6. Kim MK, Kim CS. Recent advances in anti-obesity agents. Korean J Med. 2018;93(6):501-8.
7. Srivastava G, Apovian CM. Current pharmacotherapy for obesity. Nat Rev Endocrinol. 2018;14(1):12-24.
8. Korea Pharmaceutical Information Center. Information of herbal medicines [cited 2019 Sep 14]. Available from: URL: https://www.health.kr/researchInfo/herbalMedicine1_detail.asp?idx=537.
9. Dehghani S, Mehri S, Hosseinzadeh H. The effects of Crataegus pinnatifida (Chinese hawthorn) on metabolic syndrome: A review. Iran J Basic Med Sci. 2019;22(5):460-8.

10. Lee J, Cho E, Kwon H, Jeon J, Jung CJ, Moon M, Jeon M, Lee YC, Kim DH, Jung JW. The fruit of Crataegus pinnatifida ameliorates memory deficits in β -amyloid protein-induced Alzheimer's disease mouse model. J Ethnopharmacol. 2019;243:112107.
11. Ryu SH, Chae JW. Effects of Crataegus Pinnatifida (CP) on allergic contact dermatitis (ACD) induced by DNCB in mice. Korean Journal of Pediatrics. 2014;28(3):59-73.
12. Shin IS, Lee MY, Lim HS, Ha H, Seo CS, Kim JC, Shin HK. An extract of crataegus pinnatifida fruit attenuates airway inflammation by modulation of matrix metalloproteinase-9 in ovalbumin induced asthma. PLoS One. 2012;7(9):e45734.
13. Wang T, Zhang P, Zhao C, Zhang Y, Liu H, Hu L, Gao X, Zhang D. Prevention effect in selenite-induced cataract in vivo and antioxidative effects in vitro of Crataegus pinnatifida leaves. Biol Trace Elem Res. 2011;142(1):106-16.
14. Lee JJ, Lee HJ, Oh SW. Antiobesity effects of Sansa (Crataegi fructus) on 3T3-L1 cells and on high-fat-high-cholesterol diet-induced obese rats. J Med Food. 2017;20(1):19-29.
15. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG. Role of gut microbiota in the aetiology of obesity: proposed mechanisms and review of the literature. J Obes. 2016; 2016:7353642.
16. Ansari A, Bose S, Yadav MK, Wang JH, Song YK, Ko SG, Kim H. CST, an herbal formula, exerts anti-obesity effects through brain-gut-adipose tissue axis modulation in high-fat diet fed mice. Molecules. 2016;21(11):E1522.
17. Zhang S, Zhang C, Li M, Chen X, Ding K. Structural elucidation of a glucan from Crataegus pinnatifida and its bioactivity on intestinal bacteria strains. Int J Biol Macromol. 2019;128:435-43.
18. Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. The 1996 guide for the care and use of laboratory animals. ILAR Journal. 1997;38(1):41-48.
19. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, and Knight B. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods. 2010;7(5): 335-336.
20. Korean Society for the Study of Obesity. Causes of Obesity. [cited 2019 Sep 13]; Available from: URL: http://general.kosso.or.kr/html/?pmode=obesityCause.
21. Aierken A, Buchholz T, Chen C, Zhang X, Melzig MF. Hypoglycemic effect of hawthorn in type II diabetes mellitus rat model. J Sci Food Agric. 2017;97(13):4557-61.
22. Kuo DH, Yeh CH, Shieh PC, Cheng KC, Chen FA, Cheng JT. Effect of Shan zha, a Chinese herbal product, on obesity and dyslipidemia in hamsters receiving high-fat diet. J Ethnopharmacol. 2009;124(3):544-50.
23. Won SH, Kwon KR, Rhim TJ, Kim DH. The effect of crataegi fructus pharmacopuncture on adipocyte metabolism. Journal of Korean Pharmacopuncture Institute. 2008;11(2):63-73.
24. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science. 2005;308(5728):1635-8.
25. Castaner O, Goday A, Park YM, Lee SH, Magkos F, Shiow STE, Schröder H. The gut microbiome profile in obesity: a systematic review. Int J Endocrinol. 2018;2018:4095789.
26. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T; MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. Nature. 2013;500(7464):541-6.
27. Paek JK, Lee SY. Can gut microbiota modulation be used as a practical treatment for obesity? J Obes Metab Syndr. 2018;27(2):75-7.
28. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, Toplak H. European guidelines for obesity management in adults. Obes Facts. 2015;8(6):402-24.
29. Korean Society of Lipid an Artherosclerosis. 2018 Korean Guidelines for the Management of Dyslipidemia 4th ed. 2018. [cited 2019 Sep 13]; Available from: URL: http://www.lipid.or.kr/bbs/?code=care.
30. Korean Society of Lipid an Artherosclerosis. Dyslipidemia. [cited 2019 Sep 13]; Available from: URL: http://www.lipid.or.kr/faq/index2.php#none.
31. Gholam PM, Flancbaum L, Machan JT, Charney DA, Kotler DP. Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects. Am J Gastroenterol. 2007;102(2):399-408.
32. Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. Int J Mol Sci. 2016;17(1):E124.
33. Vargas-Castillo A, Fuentes-Romero R, Rodriguez-Lopez LA, Torres N, Tovar AR. Understanding the biology of thermogenic fat: is browning a new approach to the

treatment of obesity? Arch Med Res. 2017;48(5):401-13.
34. Altshuler-Keylin S, Kajimura S. Mitochondrial homeostasis in adipose tissue remodeling. Sci Signal. 2017; 10(468):eaai9248.
35. Chakraborti CK. New-found link between microbiota and obesity. World J Gastrointest Pathophysiol. 2015; 6(4):110-9.
36. Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Gut microbiota, obesity and diabetes. Postgrad Med J. 2016;92(1087):286-300.