

가뱌다차(茶)가 고지방식으로 유도된 비만 마우스에서 항염증에 미치는 효과

오량량 · 임수경 · 신승우¹ · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실, ¹신강한의원

The Anti-Inflammatory Effect of Gabyeobda Tea in High Fat Diet-Induced Obese Mice

Liangliang Wu, Soo Kyoung Lim, Seung-Uoo Shin¹, Hojun Kim

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University, ¹Shinkang Korean Medicine Clinic

Received: May 5, 2022

Revised: June 3, 2022

Accepted: June 7, 2022

Correspondence to: Hojun Kim
Department of Korean Medicine
Rehabilitation, Dongguk University
Ilsan Oriental Hospital, 27
Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang
10326, Korea
Tel: +82-31-961-9111
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2022 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: The purpose of this study was to investigate the effects of Gabyeobda tea (GT) on anti-inflammation in ice induced high fat diet (HFD).

Methods: The C57BL/6 mice fed HFD were administrated with GT once daily for 8 weeks. The changes of body weight, calorie intake levels were measured in mice. The level of serum total cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein cholesterol, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), and glutamic pyruvic transaminase (GPT) were measured in mice by enzyme-based assay. It was also observed the histological changes of liver, and fat tissues with hematoxylin and eosin staining. Further real-time polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay were employed to detect inflammatory cytokine levels such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, and IL-1 β .

Results: HFD+GT group, which was administered with GT with HFD, showed no body weight gain compared with HFD group. However, levels of GOT, GPT, and inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β in the blood of HFD+GT group were significantly reduced compared with HFD group. In addition, the messenger RNA (mRNA) expression level of the IL-12 gene was significantly reduced and the mRNA expression level of the IL-10 was increased in the liver.

Conclusions: It suggests that Gabyeobda tea can alleviate inflammatory responses induced by high fat diet by inhibiting inflammatory cytokines production.

Key Words: Gabyeobda tea, Anti-inflammatory effect, High-fat diet, C57BL/6 mice

서론

염증(炎症, inflammation)은 다양한 병원균, 유해한 자극 등에 대한 생체의 방어기작 중 하나로 면역세포와 염증 매개체들이 관여하는 보호반응이다¹⁾. 비만, 인슐린 저항성 및 제2형 당뇨병은 비정상적인 사이토카인 생성, 염증 신호 전달 경로 네트워크를 활성화하는 만성염증과 밀접하게 연관되어 있다²⁾. 비만 환자의 지방세포에서는 inter-

leukin (IL)-6와 같은 염증 관련 물질의 분비가 증가되고 이는 대식세포의 활성을 증가시켜 tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6 등과 같은 염증성 사이토카인 분비를 촉진시켜 전신의 만성염증 상태를 일으킨다³⁾. 또한 비만도가 높을수록 간에서 생성되는 c-reactive protein (CRP)이 증가한다는 연구결과가 많이 보고되고 있다⁴⁾. 미국 심혈관 건강 연구(American Cardiovascular Health Study)에 따르면 체내 염증 인자가 높은 사람은 당뇨병에 걸릴 확률이

2.3배 높으며, 그 이유는 염증 인자가 췌장의 베타 세포 피사를 일으켜 인슐린 분비와 혈당 조절이 불충분하게 될 수 있기 때문이다⁵⁾. 따라서 비만에 의한 대사성 증후군을 개선하면 비만으로 인한 염증을 개선할 수 있으므로 이를 타깃으로 하는 약물들이 임상적으로 사용되고 있다. 대표적으로 TNF- α signaling pathway를 제어하는 약물, thiazolidinedione과 statin 계열 약물, salicylate 등은 인슐린 저항성과 인슐린 감수성을 연결하는 분자 경로에 관여하여 염증을 완화하는 항염증 효과에 대해 임상 결과가 보고되고 있다⁶⁾. 그러나 이들 약물은 항염증을 직접적으로 표적으로 삼는 접근법이 아니므로 그 사용도 제한적일 수 밖에 없다.

식물에서 유래된 천연화합물은 오랜 기간 질병을 치료하는 데 사용되어왔다. 이러한 식물을 차로 우려 마실 경우 그 안에 있는 성분들이 항산화 작용 및 항고혈압, 항당뇨, 항비만 등 다양한 생리활성이 있어 내장지방과 염증을 줄이는 데 도움이 되며, 대부분의 차에 포함된 항산화 성분은 산화스트레스를 줄이고 면역기능을 개선하여 면역력 강화 및 항염증 효과가 있다는 선행연구가 보고되었다⁷⁾. 이전 연구에 의하면 호박즙, 팔차, 옥수수 수염차 등의 혼합물을 고지방식이로 유도된 비만 쥐에 섭취시켰을 때 지방을 줄이고 간세포 손상을 줄여주며 항산화성에도 효과가 있으며⁸⁾ 특히 호박은 IL-12, IL-1 β 및 TNF- α 를 포함한 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킬 수 있다⁹⁾. 또한 한방에서는 비알코올성 지방간염의 처방에 대부분 진피와 하엽이 포함되는데 이들 약물은 ‘소간건비(疏肝健脾), 화담청습(化痰清濕), 청열이습(清熱利濕), 강지활혈(降脂活血)’의 역할이 있다¹⁰⁾.

본 연구에서는 항염증 효능이 있는 호박, 팔, 비파엽, 하엽과 진피가 혼합된 Gabyeobda tea (GT)를 우려낸 차가 장기간 고지방식이로 비만이 유발된 C57BL/6 마우스 모델에서 염증 감소 효과를 보이는지 효능을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 가법다차(GT)는 (주)한방비만학회에서 받아 실험에 사용하였다. GT 티백 1개(2 g)는 호박(0.8 g), 팔(0.4 g), 비파엽(0.4 g), 하엽(0.2 g), 진피(0.2 g)가 들어 있다. 성인(60 kg) 섭취기준(2티백/1일)을 마우스에 적용하여 환산하였을 경우 평균 25 g의 마우스 한 마리 1일 투

여량은 20.50 mg으로 계산되었다. 티백 2개에 증류수 1 L를 넣고 25°C에서 2시간 동안 교반 추출하였으며 농축기(EYELA N-1200A; EYELA, Tokyo, Japan)로 농축한 후 증류수에 녹여 -80°C에 보관하였다. 증류수에 녹인 농축액은 매일 투여하기 직전에 실온에서 완전히 해동하여 구강 투여하였으며 일일 투여량은 증가하는 마우스 체중(25~40 g)에 맞춰 투여를 증가(100~160 μ l)하였다.

2. 실험동물 및 추출물 투여

실험에 사용된 마우스는 6주령 수컷 C57BL/6 (대한바이오링크, Eumseong, Korea)로 실험 환경은 항온(24 \pm 2°C), 항습(55 \pm 5%)을 유지하고 12시간 간격의 명암주기인 specified pathogen-free 사육실에서 사육하였다. 체중은 주 1회, 음식 섭취량은 주 2회 측정하여 모니터링하였다. 모든 동물 실험은 동국대학교 일산병원의 연구동물윤리위원회의 지침에 따라 수행하였다(IACUC-2021-01211). 총 35마리의 실험동물은 4주간 실험 환경에 적응시킨 후 무작위 배정으로 세 가지의 실험군으로 나누었고 각 실험군은 9마리로 cage당 3마리씩 분리하여 사육하였다. 실험군은 총 칼로리의 10% 지방이 포함된 정상식이군 Normal (Nor; AIN-93G; Reserch-Diet, Inc. New Brunswick, NJ, USA)과 총칼로리의 60% 고지방식이군 high fat diet (HFD; D12492; Reserch-Diet, Inc.), 고지방식이와 동시에 GT 추출물 투여군(HFD+GT)으로 나누었으며 총 8주간 식이 제공과 함께 추출물을 투여하였다.

3. 공복혈당 및 경구 당부하검사 측정

실험 종료 1주일 전 혈중 내당 검사(oral glucose tolerance test)를 실시하기 전 모든 동물은 12시간 동안 금식시키고, 1 g/kg의 glucose 수용액을 oral gavage를 이용하여 경구 투여한 후 각 개체의 꼬리 정맥을 통해 0분, 30분, 60분, 90분, 120분의 시간대에 소량의 혈액을 채취하고 Accu-check (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 혈당검사를 이용하여 혈당을 측정하였다. 결과 값은 area under curve (AUC)로 분석하였고 AUC (min \cdot mg/dl)=30 minutes \times [1/2 \times (0분 후 혈당+120분 후 혈당)+1 \times (30분 후 혈당+60분 후 혈당+90분 후 혈당) 공식으로 계산하였다^{11,12)}.

4. 조직 채취 및 조직학적 분석

실험동물은 8주간의 식이 및 약물 투여 후 부검 전 12

시간 동안 금식시켜 zoletil (Virbac, Carros, France)로 마취 후 각 조직을 채취하였다. 간, 부고환 지방은 적출 후 멸균된 phosphate buffered saline로 세척하고 수분을 제거하여 무게를 측정하였다. 유전자 발현 분석을 위한 간 조직은 작게 조각내어 1.5 mL 마이크로튜브에 담아 액체질소에 넣고 급속 냉동 후 -80°C에 보관 후 분석하였다. 간 및 부고환 지방 조직 샘플은 4% formalin으로 고정하였다. 탈수된 조직은 파라핀에 심어 4 µm 두께로 박절한 후 절편 슬라이드를 제작하였으며 hematoxylin and eosin (H&E; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)로 시료를 염색하였다.

5. 혈청 내 생화학인자 분석

실험동물의 혈액은 실험 종료 12시간 동안 절식시킨 후 심장에서 채혈하여 상온에서 30분 방치 후 3,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 혈청(serum)을 분리하였고 -80°C에 보관하였다가 분석하였다. 혈액의 생화학적 검사를 실시하기 위하여 triacylglycerol (TG; AM157S; Asanpharm, Co., Seoul, Korea) total cholesterol (TC; AM202; Asanpharm, Co.), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C; AM203; Asanpharm, Co.), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT; AM103-K; Asanpharm, Co.), glutamic pyruvic transaminase (GPT; AM102; Asanpharm, Co.)는 효소법을 이용한 정량 측정 kit (AsanPharm, Co., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 혈액 내 염증 사이토카인 IL-6 (#KET7009; Abbkine Scientific Co., Wuhan, China), IL-1β (#KET7005; Abbkine Scientific Co.), TNF-α (#KET7015; Abbkine Scientific Co.), CRP (41-CRPMS-E01; ALPCO, Salem, NH, USA)는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법을 이용하여 측정하였다. ELISA kit를 이용한 반응액의 발색 정도는 흡광도 450 nm에서 측정한 후 표준곡선을 이용하여 각 사이토카인의 농도를 정량화 하였다.

6. RNA 분리 및 유전자 발현 분석

간 조직의 total RNA는 TRIsure (Bioline Meridian Bioscience, London, UK)를 이용하여 추출하였다. 분리된 total RNA가 파괴 없이 추출되었음을 확인하기 위해서 1.5% agarose gel 전기영동을 통해 28S rRNA 밴드와 18S rRNA 밴드의 선명도와 진하기를 비교하여 검증하였다. RNA 순도는 분광광도계(Implen, Munich, Germany)를 이용하여 흡광도를 측정하여 정량하였고, 각 개체에서 얻은 1 µg의 RNA는

cDNA synthesis kit (RT-PCR premix; Bioneer, Daejeon, Korea)로 cDNA를 합성한 후 template로 사용하였다. 각 시료는 LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green (Roche, Indianapolis, ID, USA)과 각 primer (Table 1)를 사용해 LightCycler instrument (Roche 480 real time PCR system; Roche)를 통해 진행하였다. Polymerase chain reaction (PCR) 증폭은 denaturation 95°C 20초, annealing 57°C 15초, extension 72°C 10초로 하여 40 cycle로 진행하였다. 실험 결과는 LightCycler Software (Roche)를 통해 분석하였고 유전자의 발현량은 $2^{-(\Delta Ct)}$ 를 구하는 방식으로 계산하였다.

7. 통계 방법

본 실험의 결과 값은 GraphPad Prism 분석프로그램 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 평균±표준오차(mean±standard error of the mean)로 표시하였다. 각 실험군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 통해 비교하였으며 유의성은 P<0.05 수준일 때 유의한 것으로 간주하였다.

Table 1. Sequences of Primer used in real-time PCR analysis

Name	Primer sequence
IL-4	Forward 5'-AGATGGATGTGCCAAACGTCCTCA-3'
	Reverse 5'-ATATGCGAAGCACCTTGAAGCC-3'
IL-6	Forward 5'-TAGTCCTCCTACCCCAATTTCC-3'
	Reverse 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
MCP-1	Forward 5'-GCAGCAGGTGTCCCAAAGAA-3'
	Reverse 5'-ATTACGGGTCAACTTCACATTCAA-3'
IL-18	Forward 5'-GCCTCAAACCTTCCAAATCA-3'
	Reverse 5'-TGGATCCATTTCTCAAAGG-3'
IL-10	Forward 5'-GACCAGCTGGACAACATACTGCTAA-3'
	Reverse 5'-GATTAGGCTTGGCAACCCAAGTAA-3'
IL-12	Forward 5'-AGGTCACACTGGACCAAAGG-3'
	Reverse 5'-TGGTTTGTATGATGTCCTCGA-3'
IL-1β	Forward 5'-TCCAGGATGAGGACATGAGCAC-3'
	Reverse 5'-GAACGTCACACACCAGCAGGTTA-3'
TNF-α	Forward 5'-GACCCTCACACTCAGATCATCATCTTCT-3'
	Reverse 5'-CCACTTGGTGGTTTGCTACGA-3'
GAPDH	Forward 5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3'
	Reverse 5'-ATACCAGGAATGAGCTTGACAAA-3'

PCR: polymerase chain reaction, IL: interleukin, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, TNF-α: tumor necrosis factor-α, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

결과

1. 식이군 간 체중 변화 비교

실험을 시작한 후 약 1주일에는 그룹 간 마우스의 체중에 유의한 차이가 없었다. 8주간의 실험 후 Nor군에 비해 HFD군의 섭취량은 유의하게 증가하였고, HFD+GT군의 섭취량도 HFD에 비해 유의하게 증가하였다(Figs. 1A, 1B).

그러나 Nor군에 비해 HFD군은 체중의 유의적 증가는 있었으나 HFD+GT군은 섭취량은 증가하였어도 체중 변화에는 유의적 영향을 미치지 않았다(Figs. 1C, 1D).

2. 경구 당부하검사 결과 비교

실험 종료 1주일 전 실시한 경구 당부하검사 결과를 AUC로 분석했을 때 실험동물의 공복혈당은 Nor군에 비해 HFD

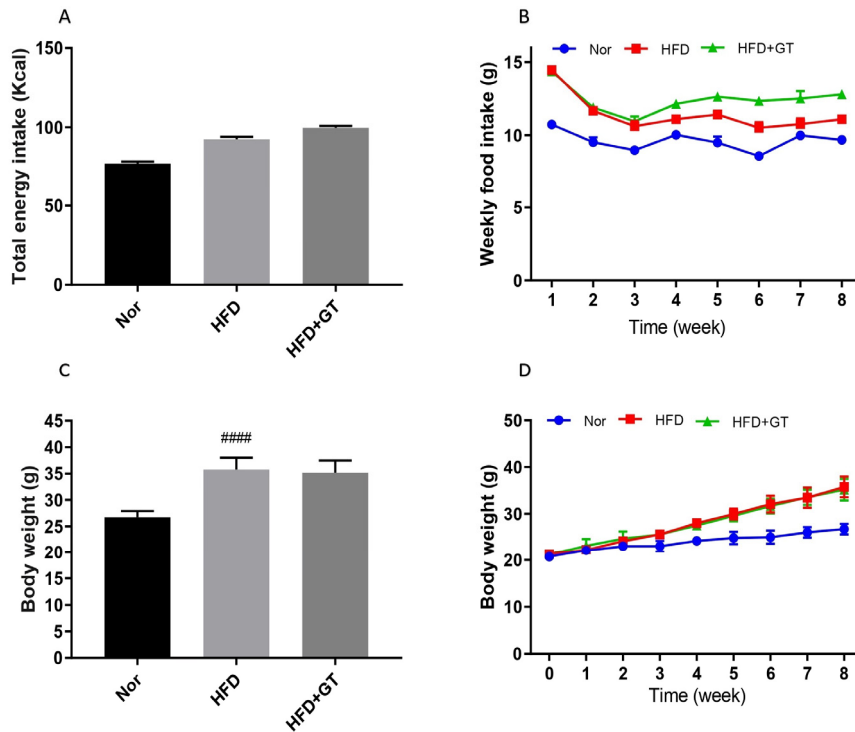


Fig. 1. Changes of weekly increased body weight and food consumption. (A) Total energy intake, (B) energy intake measured weekly, (C) total body weight, (D) body weight measured weekly. The data are presented as the mean±standard error of the mean (n=9/group). Statistical analyses were performed by Student's t-test. ####P<0.0001 (#; HFD vs Nor), HFD group compared to Nor group. Nor: normal diet control group, HFD: high fat diet control group, HFD+GT: high fat diet+Gabyeobda tea group.

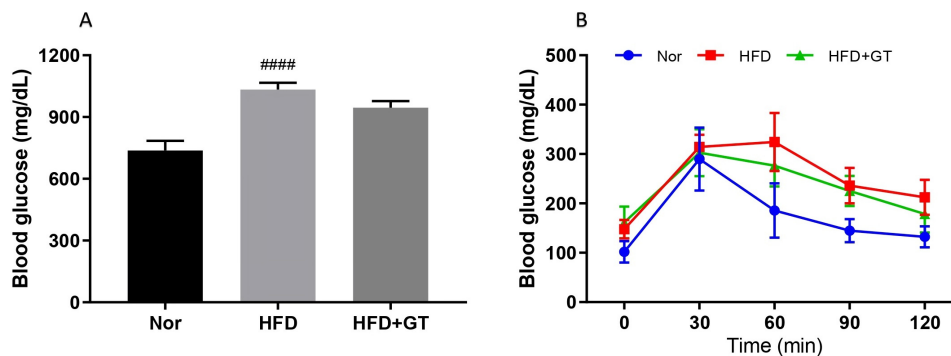


Fig. 2. Change of blood glucose level during oral glucose tolerance test. The data are presented as the mean±standard error of the mean per group. ####P<0.0001 (#; HFD vs Nor). Nor: normal diet control group, HFD: high fat diet control group, HFD+GT: high fat diet+Gabyeobda tea group.

군에서 유의적($P<0.0001$)으로 높았다. 그러나 HFD+GT군의 혈당은 HFD군에 비해 약간의 감소 추세를 보였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 2).

3. 장기 조직 무게 및 조직학적 분석

실험동물 부검 후 간과 부고환 지방 조직을 채취하여 무게를 측정하였다. 간의 무게는 모든 실험군에서 유의적 차이가 나타나지 않았다. 부고환 지방(epididymal fat)의 무게는 Nor군에 비해 HFD군에서 유의적으로 증가하였고, HFD+GT군은 Nor군에 비해 유의적으로 증가하였으나 HFD군과 비교하면 지방 무게의 유의적 차이가 관찰되지 않았다(Figs. 3C, 3D).

H&E 염색으로 간 조직을 관찰한 결과, Nor군에 비해 HFD군과 HFD+GT군의 간 조직에서 지방구 축적이 많이 관찰되었다. 또한 부고환 지방의 지방세포의 크기도 Nor

군에 비해 HFD군에서 그 크기가 현저하게 유의적으로 증가하였으나 HFD+GT군의 지방세포의 크기는 HFD와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Figs. 3A, 3B).

4. 혈청 내 지질 및 간 독성 비교

혈청 내 TG, TC의 농도를 측정하였다. Nor군과 비교하여 HFD군의 혈청 내 TG 및 TC 수준은 유의하게 증가하였다(Figs. 4A, 4B). HFD+GT군의 혈청 내 HDL-C는 HFD군과 비교하여 유의적 차이는 나타나지 않았다(Fig. 4C). 혈청에 있는 간 손상 지표인 간 효소 GOT, GPT를 측정한 결과 HFD군의 GOT와 GPT의 수치는 Nor군보다 유의적으로 높았고 HFD+GT군의 혈청 GOT와 GPT는 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였다(Figs. 4D, 4E).

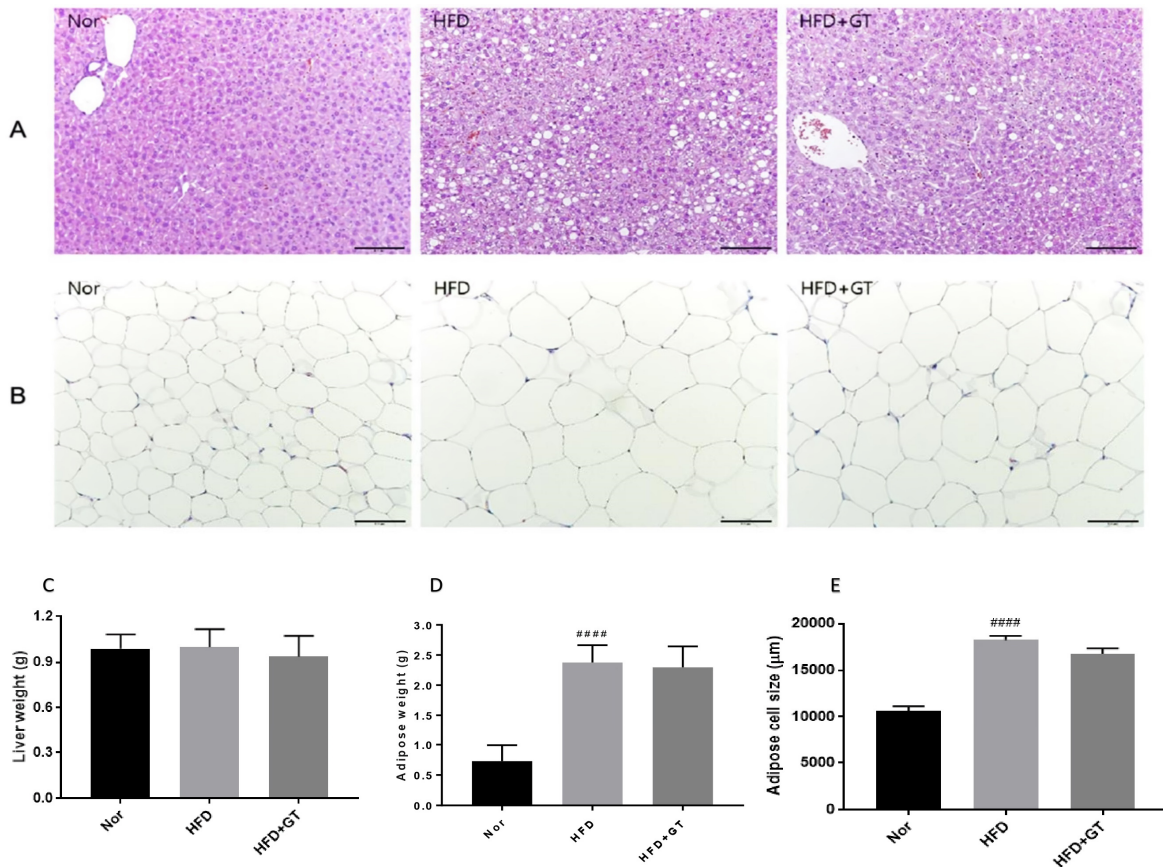


Fig. 3. Histological difference of liver tissue and adipose tissue analyzed with H&E staining. (A) H&E staining of liver, (B) H&E staining of epididymal adipose tissue, (C) liver weight, (D) epididymal fat weight, (E) adipose cell size. Data are presented as the mean±standard error of the mean (n=9/group). Statistical analyses were performed by Student's t-test. ^{###} $P<0.0001$ ([#]; HFD vs Nor). Nor: normal diet control group, HFD: high fat diet control group, HFD+GT: high fat diet+Gabyeobda tea group. H&E: hematoxylin and eosin.

5. 혈청 내 염증 관련 마커 분석

고지방식이로 유도한 비만 쥐에 GT를 투여하고 모든 동물의 혈청에서 염증성 사이토카인의 수치를 측정하였

다. 염증성 사이토카인은 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 단백질 수준을 ELISA로 측정하였다. 비만 쥐의 혈청에서 IL-1 β , TNF- α 는 HFD군에 비해 HFD+GT군에서 Nor군 수준으로 유의

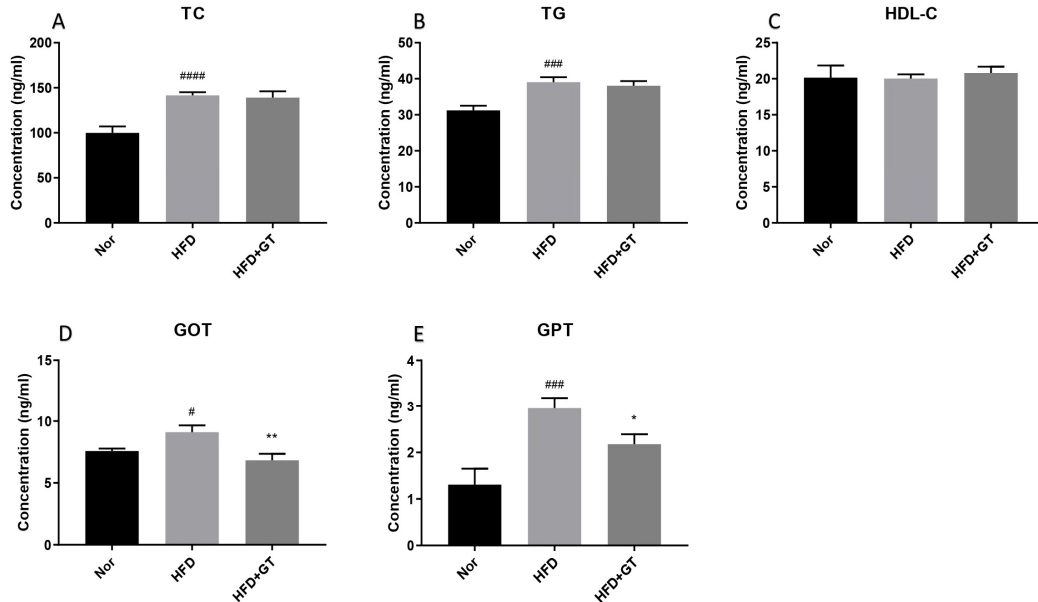


Fig. 4. (A) Total cholesterol (TC), (B) triacylglycerol (TG), (C) high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), (D) glutamic oxaloacetic ransaminase (GOT) level, (E) glutamic pyruvic transaminase (GPT) level in serum. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (n=7/group). Statistical analyses were performed by Student's t-test. ####P<0.0001, ###P<0.001, #P<0.05 (#; HFD vs Nor), **P<0.01 *P<0.05 (*; HFD+GT vs HFD). Nor: normal diet control group, HFD: high fat diet control group, HFD+GT: HFD+Gabyeobda tea group.

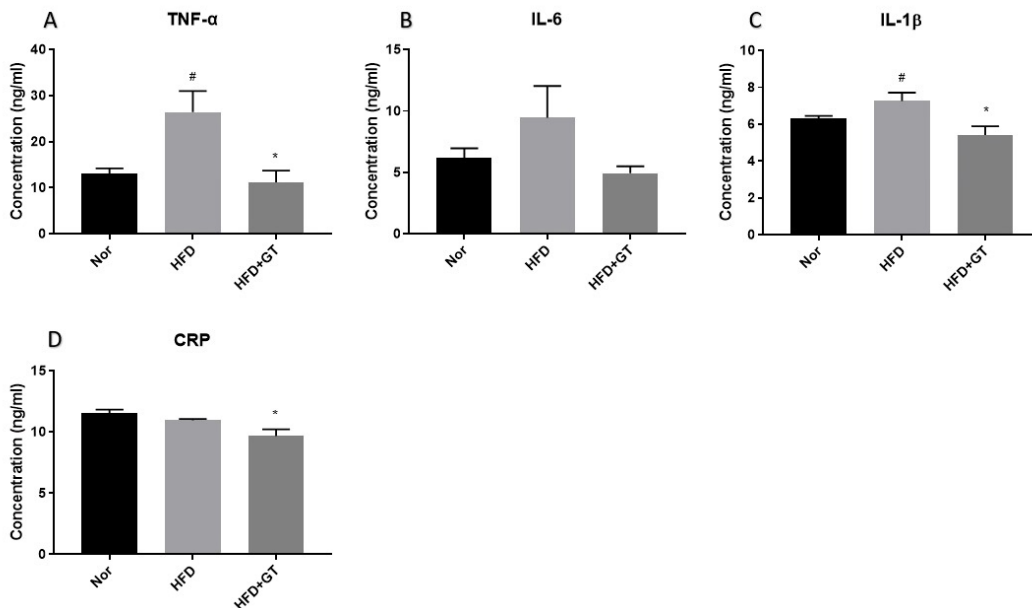


Fig. 5. Effects of GT on serum inflammatory cytokines and CRP level in HFD-fed mice. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (n=7/group). Statistical analyses were performed by Student's t-test. #P<0.05 (#; HFD vs Nor), *P<0.05 (*; HFD+GT vs HFD). Nor: normal diet control group, HFD: high fat diet control group, HFD+GT: high fat diet+Gabyeobda tea group, CRP: c-reactive protein, HFD: high fat diet, TNF- α : tumor necrosis factor- α , IL: interleukin.

적인 감소를 보였고, IL-6는 감소하는 경향은 보이나 유의성을 나타내지 않았다(Fig. 5). 염증성 사이토카인 이외에 CRP 수치로도 염증반응을 측정하였다. 정상 사료를 섭취한 Nor군과 HFD군과의 CRP 수치는 차이를 보이지 않았으며 유의성도 나타나지 않았다. 그러나 비만을 유도하는 8주간 고지방식이만 섭취한 HFD군과 고지방식이와 함께 GT를 투여한 HFD+GT군과 비교하였을 때 HFD+GT군에서 CRP 단백질 수치가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 GT가 혈중 염증인자들을 감소시켜 비만으로 인해 유도된 체 내 염증반응을 개선시킬 수 있음을 시사한다.

6. 간에서 염증 관련 유전자 비교

고지방식으로 유도한 동물의 간에서 messenger RNA (mRNA)를 추출하여 염증과 관련된 유전자의 발현 양상

을 관찰하였다. IL-4, IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), IL-18, IL-10, IL-12, IL-1 β 및 TNF- α 발현을 quantitative real-time PCR을 통해 분석을 수행하였다. HFD군의 IL-4, MCP-1, IL-18, IL-12, TNF- α 의 유전자 발현 수준은 대조군인 Nor군보다 유의한 증가를 보였다. 그러나 HFD+GT군의 IL-4, MCP-1, IL-12, TNF- α 의 유전자 발현 수치는 HFD군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 또한 IL-6와 IL-1 β 는 HFD군에 비해 HFD+GT군에서 감소하는 경향은 보이지만 유의성은 없었다. 반면 항염증 IL-10의 유전자 발현은 HFD군에 비해 HFD+GT군에서 유의적으로 증가하였다(Fig. 6). 따라서 GT가 HFD에 의해 유발되는 염증반응을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었는데, 이는 혈청 내 TNF- α , IL-6, IL-1 β 가 감소하는 결과와 일치하므로 GT에 의한 염증 개선 효과가 있

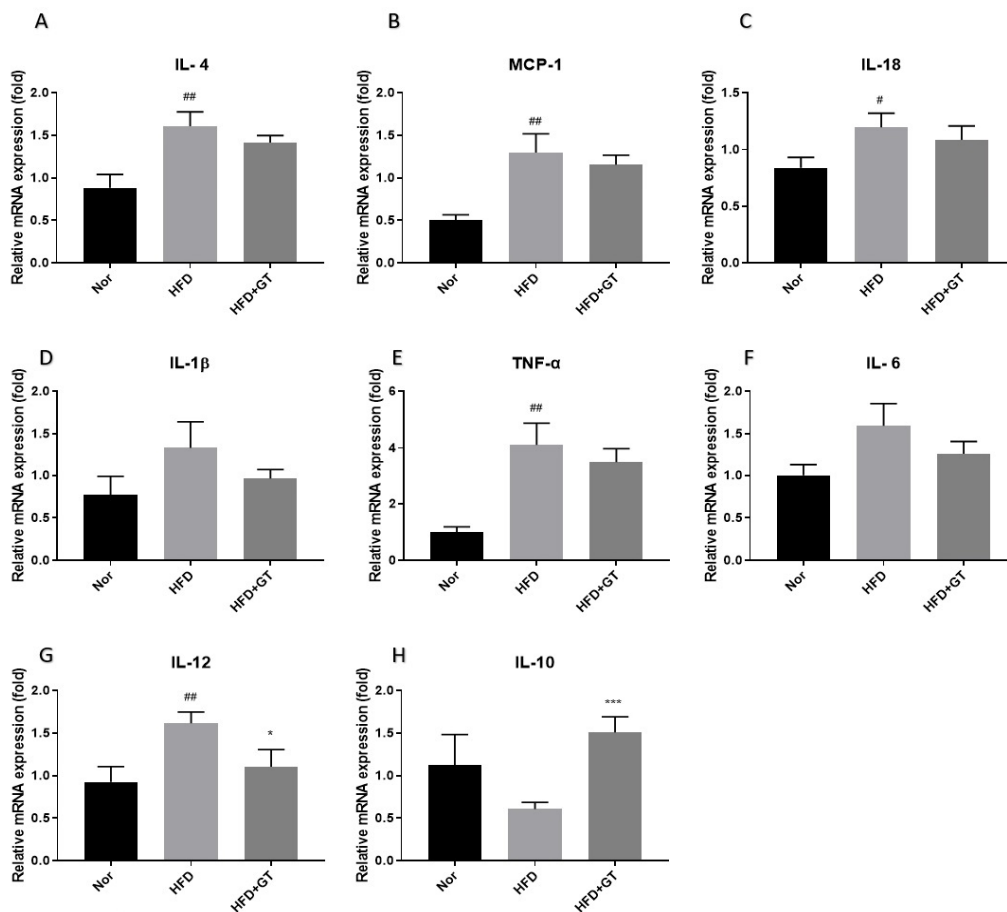


Fig. 6. Effects of GT on HFD-induced inflammation-related gene expression. IL-4, IL-6, MCP-1, IL-18, IL-10, IL-12, IL-1 β and TNF- α in liver mRNA levels were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (n=7/group). ^{##}P<0.01, [#]P<0.05 ([#]; HFD vs Nor), ^{***}P<0.001, ^{*}P<0.05 (^{*}; HFD+GT vs HFD). Nor: normal diet control group, HFD: high fat diet control group, HFD+GT: high fat diet+Gabyeobda tea group, IL: interleukin, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, TNF- α : tumor necrosis factor- α , mRNA: messenger RNA.

음을 명확히 알 수 있었다.

고찰

본 연구는 고지방식으로 비만이 유도된 C57BL/6 마우스 모델에서 비만에 의한 염증 관련 마커의 변화를 관찰하였다. 실험동물에게 8주간의 GT 투여는 칼로리 섭취량의 증가로 이어졌으나 체중 및 공복 혈당의 유의한 증가는 없는 것으로 확인되었다. 한편 비만과 인슐린 저항성은 비알코올성 지방간 질환과 같은 지방증의 가장 흔한 위험 인자이며, 인슐린 저항성으로 인한 고인슐린 혈증은 간의 지방 축적을 더욱 증가시키고 지방산 산화를 억제하는 것으로 알려져 있다^{3,14}. TG, TC, HDL-C, GOT, GPT 등의 수치 변화로 이상지질혈증을 평가할 수 있는데¹⁵, GT 투여 후 총콜레스테롤과 중성지방은 HFD 대조군에 비해 차이를 보이지는 않았다. 따라서 본 실험으로 GT 투여가 비만 관련 지표에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

본 실험에 이용한 GT는 실험동물의 체중 및 체지방 등 비만 관련 지표에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 이전 연구에서는 호박, 팔 등을 재료로 한 항비만 효능에 대한 연구결과가 보고된 바 있다⁸. 그러나 본 실험에서는 가법다차에 의한 항비만 효능은 관찰되지 않았는데 이는 가법다차(GT) 성분의 함량 및 추출방법이 이전에 보고된 호박, 팔 등을 사용한 항비만 관련 연구보고의 실험 방법과 차이가 있기 때문인 것으로 생각된다. 즉 항비만 효능에 관련된 이전 연구결과에서는 실험에 사용한 호박과 팔의 양이 본 실험에 사용한 성분들의 양보다 많았고, 티백으로 25°C에서 2시간 동안 교반 추출한 본 실험과는 달리 열탕 처리 추출하여 항비만 유효성분에 차이가 있을 것으로 생각된다. 한편 기대한 바와 달리 체중감량 및 지질-당대사에 미치는 효과는 미미하였지만 가법다차가 염증 유발 인자를 조절하여 항염증 효과를 보인 점은 본 제품의 향후 활용방안을 시사한 것으로 고찰한다.

한편 아미노전달효소인 GOT와 GPT는 세포성 간염과 같은 간 질환을 추측할 수 있는 지표로서 특히 간세포에 주로 존재하는 GPT가 간 손상의 특이적 지표로 많이 활용하고 있다¹⁶. HFD군과 HFD+GT군에서 체중 차이는 보이지 않았으나 GT를 투여한 후 GOT, GPT의 수치가 크게 낮아진다는 것은 GT의 유효성분이 비만으로 인한 간 손상을 억제한다는 것을 말해준다. 이는 고지방식으로 유도

된 비만 마우스에서 GT에 의한 간 손상이 유의적으로 개선되었음을 알 수 있다. 이는 하엽과 진피에 의한 다른 연구의 간 손상 억제 결과와도 일치하였다^{17,18}. 이전 연구에 따르면 비만은 순환하는 피브리노젠(fibrinogen) 및 기타 급성기 염증반응 물질의 수준을 증가시키는 것으로 알려져 있는데 TNF- α , IL-6 및 CRP를 포함한 염증 반응물은 비만 환자에서 증가하는 것으로 나타났다¹⁹. 본 연구에서는 GT 투여군의 혈중 TNF- α , IL-1 β 의 단백질 수준은 HFD군과 비교하여 유의하게 감소하였다. 염증반응은 인슐린에 대한 저항성 또는 고혈당 상태에 의해 제2형 당뇨병에 의한 합병증을 유발할 수 있다²⁰. 따라서 GT는 비만으로 인한 염증을 개선시키는 효과가 있으므로 비만으로 인한 당뇨병에도 예방효과가 있을 것으로 기대한다. 혈중 CRP는 비만, 고혈압, 고지혈증 등 대사증후군과 관련된 중요한 요소로 제시되어 왔는데²¹, 비만에서 CRP 농도가 증가하는 것은 지방세포에서 TNF- α 가 생성되고 이로 인해 IL-6의 분비가 촉진되어 간에서 CRP 생성이 증가하기 때문이다. 본 연구에서는 Nor군과 HFD군의 혈중 CRP가 차이를 보이지 않았는데, 비록 가설과는 다르게 고지방식 이에서 CRP가 유의하게 증가하지 않았지만 GT에서 유의적인 감소를 확인한 것으로 GT의 전반적인 염증개선 효과를 확인할 수 있었다. 이 결과는 호박과 팔에 의한 항염증 효능을 보고한 기존 연구 결과와도 일치하였다^{22,23}.

한편 간에서 염증 관련 유전자 발현을 비교한 결과, GT 투여군에서 IL-4, MCP-1, IL-18, IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 유전자 발현 값이 HFD군과 비교하여 감소하는 경향성을 보였지만 유의한 차이는 없었고 전염증성 사이토카인 IL-12의 유전자 발현은 유의미하게 감소하였다. IL-10의 일차적인 효과는 활성화된 대식세포와 수지상 세포에 의한 IL-12 생성을 억제하며²⁴ 세포핵 내 전염증 전사인자 (pro-inflammatory transcription factor) nuclear factor-kappa B의 활성을 억제하는 등 많은 항염증 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다²⁵⁻²⁷. 본 연구에서는 실험동물에 GT를 투여한 후 IL-10의 유전자 발현 수준이 증가하였고, 동시에 IL-12 발현을 억제함으로써 항염증에 효과가 있음을 확인하였다. 이는 GT가 염증성 반응은 낮추고 항염증성 반응은 증가시킴으로써 비만으로 유도된 체내 염증에 효능이 있음을 시사한다.

본 연구의 실험 결과에 따르면 가법다차(GT) 추출물을 고지방식으로 유도된 비만 마우스에 섭취시켰을 때 체중

감량이나 혈당 개선, 혈액 내의 지질 수준 개선 등에는 유의한 효과는 관찰되지 않았으나 혈중 염증반응 및 간 독성을 개선하는 데는 유의한 효과가 있는 것으로 확인되었다.

결론

본 연구의 호박, 팥, 비파엽, 하엽 및 진피를 포함하는 가법다차(GT) 혼합물은 체중이나 혈중 지질 수준을 직접적으로 감소시키는 효과는 없으나 비만으로 인한 염증과 그에 따른 간 독성을 완화한다는 점에서 추후 추가적인 연구를 통해 염증 개선 효능차로 활용될 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 2021년도 (주)한방비만학회의 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

이해충돌

공저자 중 신승우 이사는 (주)한방비만학회 소속으로 연구비와 시료를 제공하였지만 본 실험의 결과 도출과 논문 작성에는 관여하지 않았음.

References

- Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol*. 2007 ; 147(2) : 227-35.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 ; 444(7121) : 860-7.
- Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *J ISRN Inflamm*. 2013 ; 2013 : 139239.
- Cook DG, Mendall MA, Whincup PH, Carey IM, Ballam L, Morris JE, et al. C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*. 2000 ; 149(1) : 139-50.
- Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, Cushman M, Kuller LH, Resnick HE, et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the cardiovascular health study. *Diabetes*. 2001 ; 50(10) : 2384-9.
- Kim MS. Inflammation in obesity-induced metabolic disease. *Bulletin of Food Technology*. 2010 ; 23(1) : 28-39.
- Deka A, Vita JA. Tea and cardiovascular disease. *Pharmacological Research*. 2011 ; 64(2) : 136-45.
- Park JH, Lee E, Park E. Effect of pumpkin, corn silk, adzuki bean, and their mixture on weight control and antioxidant activities in high fat diet-induced obesity rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2016 ; 45(9) : 1239-48.
- Hosny H, Omran N, Handoussa H. Edible seeds with potential anti-obesity impact: a review. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*. 2022 ; 2(1) : 64-81.
- Ma XT, Zhang FY, Bai TF, Hao B. The law of the prescription for non-alcoholic steatohepatitis: a data mining analysis. *Med Data Min*. 2020 ; 3(1) : 28-32.
- Chang S, Wang JH, Choi HS, Chin YW, Kim HJ. The effect of *Scutellariae Radix* combined with metformin on obesity-relating biomarker in high fat fed C57BL/6 mice [J]. *Journal of Korean Medicine for Obesity Research*. 2017 ; 17(1) : 20-8.
- Brouns F, Bjorck I, Frayn KN, Gibbs AL, Lang V, Slama G, et al. Glycaemic index methodology [J]. *Nutrition Research Reviews*. 2005 ; 518(1) : 145-71.
- Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010 ; 51(2) : 679-89.
- Abdelmalek MF, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. *Med Clin North Am*. 2007 ; 91(6) : 1125-49.
- Wu KT, Kuo PL, Su SB, Chen YY, Yeh ML, Huang CI, et al. Nonalcoholic fatty liver disease severity is associated with the ratios of total cholesterol and triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Lipidol*. 2016 ; 10(2) : 420-5.
- Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *The American Journal of Cardiology*. 1998 ; 81(4) : 18B-25B.

17. Wu Y, Tan F, Zhang T, Xie B, Ran L, Zhao X. The anti-obesity effect of lotus leaves on high-fat-diet-induced obesity by modulating lipid metabolism in C57BL/6J mice. *Applied Biological Chemistry*. 2020 ; 63(1) : 1-11.
18. Wu J, Ye X, Yang S, Yu H, Zhong L, Gong Q. Systems pharmacology study of the anti-liver injury mechanism of Citri Reticulatae Pericarpium. *J Front Pharmacol*. 2021 ; 12 : 618846.
19. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2007 ; 132(6) : 2169-80.
20. Nesto R. C-reactive protein, its role in inflammation, type 2 diabetes and cardiovascular disease, and the effects of insulin-sensitizing treatment with thiazolidinediones. *Diabetic Medicine*. 2004 ; 21(8) : 810-7.
21. Fulop T, Tessier D, Carpentier A. The metabolic syndrome. *Pathologie-biologie*. 2006 ; 54(7) : 375-86.
22. Men X, Choi SI, Han X, Kwon HY, Jang GW, Choi YE, et al. Physicochemical, nutritional and functional properties of Cucurbita moschata. *Food Science and Biotechnology*. 2021 ; 30(2) : 171-83.
23. Kim C, Kim MB, Hwang JK. Red bean extract inhibits immobilization-induced muscle atrophy in C57BL/6N mice. *Journal of Medicinal Food*. 2020 ; 23(1) : 29-36.
24. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2004 ; 18(3) : 385-405.
25. Jung SH, Park HS, Kim KS, Choi WH, Ahn CW, Kim BT, et al. Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2008 ; 19(6) : 371-5.
26. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor κ B (NF κ B) activation in human monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms (*). *Journal of Biological Chemistry*. 1995 ; 270(16) : 9558-63.
27. Lindmark E, Tenno T, Chen J, Siegbahn A. IL-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood. *British Journal of Haematology*. 1998 ; 102(2) : 597-604.