

고지방식으로 유도된 비만 마우스에서 丁香의 항비만 효과

안희연[#], 노성수, 신미래^{*}

대구한의대학교 한의학과 본초약리학교실

The Anti-Obesity Activity of *Syzygium aromaticum* L. in High-Fat Diet-induced Obese Mice

Hui Yeon An[#], Seong-Soo Roh, Mi-Rae Shin^{*}

Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : This study aims to analyze the anti-obesity effect of *Syzygium aromaticum* L. (SA) in obese mice made by a 60% high-fat diet (HFD).

Methods : The antioxidant activities of SA were evaluated in vitro. To assess the anti-obesity effect of SA, male C57BL/6 mice were divided into five groups: Normal, Control, GC100 (*Garcinia cambogia* 100 mg/kg/day), SA100 (SA 100 mg/kg/day), SA200 (SA 200 mg/kg/day). All groups underwent a 6-week regimen of HFD and oral administration, except for the Normal group. Subsequently, we performed blood analysis, western blotting, and histopathological staining.

Results : SA demonstrated effectiveness in antioxidant measurements. SA treatment resulted in a significant decrease in body weight gain, along with reductions in liver and epididymal fat weights. Serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), and leptin levels were reduced with SA treatment. Moreover, in the SA100 group, the reduction of both TG and TC synthesis was caused by inhibiting the sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (SREBP-1) and sterol regulatory element-binding transcription factor 2 (SREBP-2) through the Sirtuin 1 (Sirt1)/phospho-AMP-activated protein kinase (p-AMPK) pathway. Furthermore, SA treatment at a dose of 100 mg/kg reduced the accumulation of lipid droplets in the liver and the adipocyte size of the epididymal fat.

Conclusion : Our research reveals the anti-obesity effects of SA by demonstrating its ability to inhibit body weight gain and lipid accumulation, suggesting that SA might be promising for obesity treatment.

Key words : *Syzygium aromaticum* L., anti-obesity, high-fat diet

*Corresponding author : Mi-Rae Shin, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258

· Fax : +82-53-768-6340

· E-mail : with750@naver.com

#First author : Hui Yeon An, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258

· Fax : +82-53-768-6340

· E-mail : pojin11@naver.com

· Received : 08 December 2023

· Revised : 02 January 2024

· Accepted : 25 January 2024

I. 서론

비만 (Obesity)은 에너지를 효율적으로 소비하지 못해 체내에 지방의 형태로 과도하게 축적되는 상태를 말하며¹⁻³⁾, 세계보건기구 (World Health Organization)에 따르면 체질량 지수가 30 kg/m² 이상인 경우를 비만으로 분류하고 있다⁴⁾. 오늘날, 식품의 다양성과 편의성이 향상되었으나, 불규칙한 식습관, 지나친 고칼로리 음식 섭취와 신체활동 감소 등으로 인해 비만 발병률이 크게 증가하고 있다. 질병관리청 국민건강영양조사 결과에 따르면 체질량 지수에 따른 한국인의 비만율은 2010년 30.9%에서 2021년 37.1%로 증가하였다^{5,6)}. 비만은 관절통, 피로, 피부 악화와 같은 일반적인 신체 변화뿐만 아니라 제2형 당뇨, 고지혈증, 관절염, 간 질환, 뇌졸중, 고혈압, 피부염 등과 같은 다양한 질환의 주요 원인으로 간주되며, 신체 면역체계에도 부정적인 영향을 미친다고 알려져 있다⁷⁾. 또한 우울증 및 스트레스로 인해 정신적, 사회적 측면에서도 문제를 야기한다^{8,9)}. 이러한 이유로 비만에 대한 심각성이 높아지고 치료 및 관리에 대한 중요성이 강조되고 있다. 현재 비만 치료에 phentermine, orlistat, liraglutide, mirabegron과 같은 약물이 널리 사용되고 있다. 이들은 중추신경계, 소장, 방광 등에서 작용하여 소화 효소 억제, 배뇨기능 조절을 통해 식욕 억제, 에너지 소비 촉진 및 체내 지방 흡수 억제 등으로 항비만에 탁월한 효과가 있다. 그러나 두통, 불면, 소화불량 등의 부작용이 발생할 수 있으며, 나이가 심장질환, 췌장염, 방광암과 같은 위험한 질병을 일으킬 수 있다^{10,11)}.

인체 내에서는 leptin 호르몬이 분비되어 시상하부에서 식욕 억제 뉴런을 활성화시켜 포만감을 주고 식욕을 조절한다. 이 호르몬은 지방세포에서 분비되기에 비만한 사람에게서 더 높은 수치로 나타난다. 문제는 과도하게 분비되었을 때 leptin에 대한 저항성이 발생하여 정상적인 작용을 제한할 수 있다¹²⁾. 따라서 비만 치료에 있어서 leptin 저항성을 개선하는 것이 무엇보다 중요한 문제로 대두되고 있다.

丁香 (*Syzygium aromaticum* L.)은 도금낭과에 속하는 정향나무의 꽃봉오리로, 영명으로 clove라고 불린다. 원산지는 몰루카 제도이며 인도네시아, 브라질, 말레이시아 등에서 생산된다. 향신료의 일종으로, 특유의 강한 향과 풍미가 있어 조리 목적으로도 널리 활용된다. 전통 의학에서는 홍색일 때 채취하여 달이거나 분말 형태로 만들어 약재로 사용하며 소화 촉진, 진통, 항균, 항염증 효능이 있다고 알려져 있다^{13,14)}. 東醫寶鑑에서는 성질이 따뜻하고 독이 없어 賁豚氣, 冷氣로 인한 복통, 霍亂으로 인한 구토, 소화불량, 설사를 없애고 胃寒證을 치료하며, 술독과 풍독을 없애고 齒疳을 치료하는 약초로 수록되어 있다. 池大明에서는 몸이 찬 증상, 전염 병증, 脹症, 積塊를 없애는 약초로 수록되어 있다. 丁香의 주요 성분으로 알려진 flavonoid 성분의 kaempferol과 phenol 성분의 gallic acid는 항산화 및 항노화에 대한 효과가 있으며, ketone 성분의 eugenol은 살균 및 항균 효과가 있다¹⁵⁾. 또한 선행 연구에서 항당뇨병¹⁶⁾과 혈관 확장¹⁷⁾, 마취¹⁸⁾, 항진균¹⁹⁾에 대한 약리활성이 밝혀졌다.

이에 본 연구자는 丁香의 항비만 효과와 비만 치료제로서의 활용 가능성에 대해 확인하고자 본 연구를 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Ethanol, sodium carbonate, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, quercetin, potassium persulfate, potassium phosphate monobasic과 7 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS) 및 1,1-diphenyl-2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)는 Sigma aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. L-ascorbic acid와 aluminium chloride, bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit를 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Phosphate-buffered saline (PBS)은 Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT, USA)에서 구입하였으며, nitrocellulose membranes, enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagents를 Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. β -actin, sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1), sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP-2), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), acetyl-CoA carboxylase (ACC)는 Santa Cruz Biotechnology (TX, USA)에서 구입하였고, histone H3, sirtuin1 (Sirt1), TATA box-binding protein (TBP), AMP-activated protein kinase (AMPK), phospho-AMP-activated protein kinase (p-AMPK)를 Cell Signaling Technology Inc. (MA, USA)에서 구매하였다. 2차 항체는 GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA)에서 구매하였다.

2. 시료 추출

실험에 사용한 丁香은 용기한약국 (Daegu, Korea)에서 구매하였다. 열탕추출기 (Daewoong Bio, Hwaseong, Korea)를 사용하여 丁香 100 g을 증류수 1 L에 100°C에서 2시간 동안 끓여 추출하였다. 추출액은 회전식 감압 농축기 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)로 농축하고 동결 건조기 (Ilshin, Gyeonggi-do, Korea)로 건조하여 파우더 형태 (*Syzygium aromaticum* extract (SA))로 만들었으며 수율은 6.77%였다.

3. Total polyphenol 및 total flavonoid 함량

Total polyphenol의 함량은 Folin Ciocalteu's 방법을 통해 측정하였다²⁰⁾. 표준물질로 gallic acid를 사용하였다. 7.5%로 희석한 sodium carbonate 400 μ L, 10%로 희석한 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μ L, SA 100 μ L를 e-tube에 넣고 혼합하여 30분 동안 차광 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선에 대입하여 값을 mg (gallic acid equivalents (GAE))/g으로 환산하였다.

Total flavonoid의 함량은 aluminium chloride 비색법을 통해 측정하였다²¹⁾. 표준물질로 quercetin을 사용하였다. SA

100 μL 를 넣은 e-tube에 1 M potassium acetate solution 20 μL , 10%로 희석한 aluminium chloride solution 20 μL 와 증류수 560 μL , methanol 300 μL 를 넣고 섞어 30분 동안 차광 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선에 대입하여 값을 mg (quercetin equivalents (QE))/g으로 환산하였다.

4. DPPH free radical 소거능

Blois 방법²²⁾을 통해 SA의 DPPH free radical 소거능을 평가하였다. 희석한 시료 100 μL 와 ethanol에 60 μM 로 희석된 DPPH 용액 100 μL 을 96-well plate에 넣고 혼합 후 실온에서 30분 동안 차광 반응시킨 후 microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 L-ascorbic acid를 사용하였으며, DPPH free radical 소거 활성이 50%가 되는 농도를 IC_{50} 값으로 나타내었다.

5. ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거능을 측정하였다²³⁾. 7 mM ABTS에 2.45 mM의 potassium persulfate를 넣고 증류수로 희석하여 약 15시간 동안 차광 반응시켜 ABTS^+ 를 만든 후 Microplate Reader를 이용하여 30°C, 415 nm에서 흡광도 0.70 ± 0.02 가 되도록 보정하였다. 희석한 시료 5 μL 와 만들어진 ABTS^+ 95 μL 를 96-well plate에 넣고 혼합 후 실온에서 15분 동안 차광 반응시켜 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 L-ascorbic acid를 사용하였으며, ABTS radical 소거 활성이 50%가 되는 농도를 IC_{50} 값으로 나타내었다.

6. 실험동물

본 실험에서는 생후 4주령 옹성 C57BL/6 mice를 DBL (Eumseong, Korea)에서 구매하였다. 물과 고형사료 (Zeigler Bros, Inc., PA, USA)를 충분히 공급하며 동물 사육실의 conventional system (온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암 주기 12시간)에 1주일 동안 적응시켰다.

정상군 (Normal)은 일반고형사료 (조단백질 18.0% 이상, 조지방 5.0% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하)를 공급하였고, 대조군과 약물 투여군은 매일 60% HFD (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA)를 새로 공급하였다 (Table 1). 대조군은 증류수를 경구투여 하였으며 (Control), 양성 대조군은 (-)-hydroxycitric acid (HCA) 함량이 1,080 mg인 *Garcinia cambogia* (Daom, Sancheon-si, Korea)를 100 mg/kg의 농도로 경구투여 하였다 (GC100). SA 투여군은 저농도 (SA100)와 고농도 (SA200)로 나누어 각각 100 mg/kg과 200 mg/kg의 농도로 경구투여 하였다. 6 주간의 실험기간 동안 체중 측정과 약물투여를 매일 일정한 시간에 시행하였다.

실험은 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회 승인 (승인 번호 DHU2023-027)을 받아 동물관리 규정을 준수하여 실

험을 진행하였다.

Table 1. The ingredients of 60 kcal% high-fat diet.

Product #	D12492	
	kcal%	gm%
Protein	20	26.2
Carbohydrate	20	26.3
Fat	60	34.9
Total	100	
kcal/gm	5.24	
Product #	kcal	gm
FD&C Blue Dye#1	0.05	0
L-Cystine	12	3
Cellulose, BW200	0	50
Casein, 80 Mesh	200	800
Dicalcium phosphate	13	0
Soyabean oil	225	25
Lard	2205	245
Vitamin mix V10001	40	10
Mineral mix S10026	0	10
Calcium Carbonate	0	5.5
Potassium citrate	0	16.5
Maltodextrin 10	125	500
Choline bitartrate	0	2
Sucrose	275.2	68.8
Corn starch	0	0

7. 혈액분리 및 조직 채취

Isoflurane을 사용하여 마우스를 마취한 후 부검을 실시하였다. 심장에서 혈액을 채취한 후 4°C, 1,508 rcf에서 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻었다. 또한 조직 염색과 단백질 정량을 위해 간 조직과 부고환주지방 조직을 채취하였으며, 사용하기 직전까지 -80°C에서 냉동 보관하였다.

8. 혈액분석

Triglyceride (TG), total cholesterol (TC) 및 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) kit는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 또한, leptin kit는 Koma Biotech Inc. (Seoul, Korea)에서 구매하여 제조사의 assay protocols에 따라 측정하였다.

9. Western Blotting

2 mM MgCl₂, 1 M DTT, 0.1mM EDTA, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.1 mM PMSF, protease inhibitor를 혼합하여 만든 buffer A를 간 조직에 넣고 tissue grinder (Biospec Product, Bartlesville, OK, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 추가하였다. 30분 동안 ice 위에 방치한 후 2분 동안 13,572 rcf로 원심 분리하여 세포질이 포함된 상층액을 분리하였다. 그 후 10% NP-40 용액이 첨가된 buffer A로 두 번 헹구고 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 50 mM HEPES, 0.1 mM PMSF, 1% glycerol, protease inhibitor를 혼합하여 만든 buffer C를 첨가하여 재부유시켜 10분 주기로 세 번 vortexing 하였다. 이후 4°C, 13,572 rcf에서 10분 동안 원심 분리하여 핵이 포함된 상층액을 분리하였다. 단백질 발현량 측정을 위해 8~12% SDS polyacrylamide gel으로 단백질을 전기연동하여 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane에 이동시킨 후 1:1000의 비율로 PBS-T에 희석한 1차 항체를 membrane에 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음, PBS-T로 세척하였다. 각 1차 항체에 사용되는 2차 항체를 1:3000의 비율로 PBS-T에 희석하여 membrane에 처리한 후 상온에서 1시간 동안 반응시키고 PBS-T로 세척하였다. 처리된 membrane을 ECL 용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Seoul, Korea)을 사용하여 band를 촬영하고 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램으로 단백질을 정량하여 비교하였다 (Fold of normal).

10. 조직병리학적 분석

적출한 부고환주위지방 조직을 10% 포르말린 용액으로 고정시키고 탈수처리를 거쳐 파라핀으로 보존하였다. Microtome을 사용하여 조직을 두께 2 μm로 절단하여 Hematoxylin & Eosin staining (H&E)을 시행하였다. 적출한 간 조직은 Oil Red O staining을 시행하였다. 염색된 조직 슬라이드는 PANNORAMIC 250 Flash III digital slide scanner (3DHISTECH Ltd, Hungary)로 촬영하여 Caseviewer program (3DHISTECH Ltd, Hungary)로 분석하였다.

11. 통계분석

실험 결과 값은 mean ± SEM으로 표시하였으며, SPSS (Version 26.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance test를 실시하였다. 사후 검정은 least-significant differences test (LSD)를 실시하였으며, 약물 간 효과 분석은 Tukey's post-hoc test로 검증하였다. 각 군의 통계적 유의성은 p-value < 0.05 수준에서 유의성이 있다고 판단하였다.

III. 결 과

1. Total polyphenol 및 total flavonoid 함량

SA의 항산화 활성 효과를 평가하기 위해 total polyphenol과 total flavonoid의 함량을 측정하였다.

Total polyphenol 함량은 230.18 ± 0.63 mg (GAE)/g으로 나타났으며, total flavonoid 함량은 26.86 ± 0.10 mg (QE)/g으로 나타났다 (Table 2).

Table 2. Total polyphenol and total flavonoid content in SA.

Sample	Total polyphenol (mg (GAE)/g)	Total flavonoid (mg (QE)/g)
SA	230.18 ± 0.63	26.86 ± 0.10

All values are expressed as mean ± SEM.
SA ; Syzygium aromaticum L.

2. SA의 radical 소거능

DPPH free radical 소거능 측정 결과, L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 1.21 ± 0.01 μg/mL, SA의 IC₅₀ 값은 2.90 ± 0.02 μg/mL로 나타났다. ABTS radical 소거능 측정 결과, L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 3.32 ± 0.02 μg/mL, SA의 IC₅₀ 값은 8.15 ± 0.08 μg/mL로 나타났다 (Table 3).

Table 3. DPPH and ABTS radical scavenging activities in SA.

Sample	DPPH IC ₅₀ (μg/mL)	ABTS IC ₅₀ (μg/mL)
L-ascorbic acid	1.21 ± 0.01	3.32 ± 0.02
SA	2.90 ± 0.02	8.15 ± 0.08

The DPPH and ABTS radical scavenging activities were expressed as IC₅₀ (μg/mL). All values are expressed as mean ± SEM.

3. 체중 변화율과 조직 무게

SA 투여가 체중 및 간과 부고환주위지방 무게 변화에 미치는 영향을 확인하였다 (Table 4).

체중 변화율은 대조군이 정상군의 1.77배로 유의하게 증가하였으며 (p<0.001), 대조군에 비해 GC100군이 29.66% (p<0.001), SA100군이 36.94% (p<0.001), SA200군이 22.84% (p<0.01)로 모든 군이 유의적인 감소 효과를 나타내었다. 간 무게는 대조군이 정상군의 1.16배로 유의적인 증가 수치를 나타내었으며 (p<0.05), 대조군에 비해 GC100군이 12.47%, SA200군이 5.65% 감소하는 경향을 보였다. 특히 SA100군은 대조군의 13.23%로 유의적인 감소 효과를 나타내었다 (p<0.05). 부고환주위지방 무게는 대조군이 정상군의 4.02배로 유의하게 증가하였으며 (p<0.001), 대조군 대비 GC100군이 26.98% (p<0.05), SA100군이 42.73% (p<0.01), SA200군이 23.75% (p<0.05)로 모두 유의적인 감소 효과를 나타내었다.

Table 4. Initial and final body weight, body weight change, liver weight, and epididymal fat weight by SA treatment.

Sample	Initial B.W. (g)	Final B.W. (g)	B.W. change (g)	Liver weight (g)	Epididymal fat weight (g)
Normal	20.06 ± 0.34	27.75 ± 0.58	7.70 ± 0.46	1.14 ± 0.08	0.23 ± 0.03
Control	20.17 ± 0.31	33.75 ± 1.00 ^{###}	13.58 ± 0.87 ^{###}	1.32 ± 0.03 [#]	0.92 ± 0.10 ^{###}
GC100	19.92 ± 0.38	29.48 ± 1.14 ^{**}	9.55 ± 0.86 ^{***}	1.15 ± 0.08	0.67 ± 0.09 [*]
SA100	19.94 ± 0.26	28.77 ± 0.93 ^{***}	8.84 ± 0.74 ^{***}	1.14 ± 0.05 [*]	0.53 ± 0.12 ^{**}
SA200	20.29 ± 0.20	30.77 ± 0.54 ^{**}	10.48 ± 0.40 ^{**}	1.24 ± 0.04	0.70 ± 0.05 [*]

Body weights were measured at the beginning (initial) and on the last day (final) after the treatment.

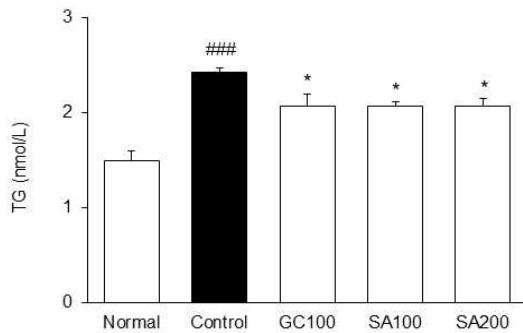
All values are expressed as mean ± SEM. Normal, normal mice; Control, the obese mice; GC100, the obese mice were treated with *Garcinia cambogia* 100 mg/kg body weight; SA100, the obese mice were treated with *Syzygium aromaticum* L. 100 mg/kg body weight; SA200, the obese mice were treated with *Syzygium aromaticum* L. 200 mg/kg body weight.

[#]p<0.05, ^{###}p<0.001 vs. Normal group. ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, and ^{***}p<0.001 vs. Control group.

4. 비만 관련 바이오마커 측정

혈청 내에서 TG와 TC 수준을 측정하였다 (Figure 1).

TG 측정 결과, 대조군은 정상군의 1.62배로 유의하게 증가하였으며 (p<0.001), GC100군은 대조군의 14.51%, SA100군은 14.67%, SA200군은 14.71%로 모두 유의적인 감소 효과를 보였다.



과를 보였다 (p<0.05). TC 측정 결과, 대조군은 정상군의 1.34배로 유의하게 증가하였으며 (p<0.001), GC100군은 대조군의 10.36% (p<0.05)로 유의하게 감소하였으며, SA100군은 14.09% (p<0.01), SA200군은 9.26% (p<0.05)로 모두 유의적인 감소 효과를 보였다.

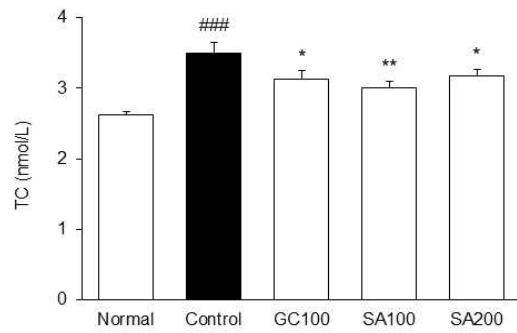


Figure 1. Effects of TG and TC in serum by SA treatment.

To assess the potential influence of SA supplementation on circulating lipid levels, serum lipid profile such as TG and TC was conducted. TG, triglyceride; TC, total cholesterol. All values are expressed as mean ± SEM.

^{###}p<0.001 vs. Normal group. ^{*}p<0.05 and ^{**}p<0.01 vs. Control group.

5. 혈청 내 간 기능 평가

혈청 내에서 간 기능 지표인 GOT와 GPT를 측정하였다 (Figure 2). GOT 측정 결과, 대조군은 정상군의 1.20배로 증가하였으며, 대조군 대비 GC100군이 19.66%, SA100군이 11.49%, SA200군이 15.34% 감소하는 경향을 보였다. GOT

측정 결과, 대조군은 정상군의 1.19배로 증가하였다. 대조군에 비해 GC100군이 18.84% 감소하는 경향을 보였으며, SA100군에서 23.36% (p<0.05), SA200군이 32.67% (p<0.01)로 유의적인 감소 효과를 보였다.

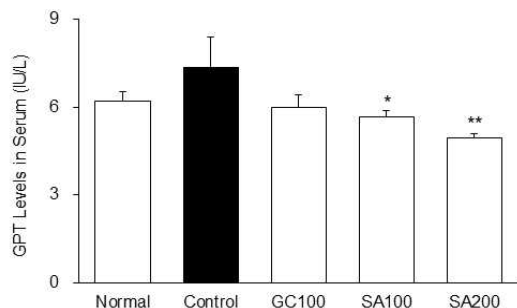
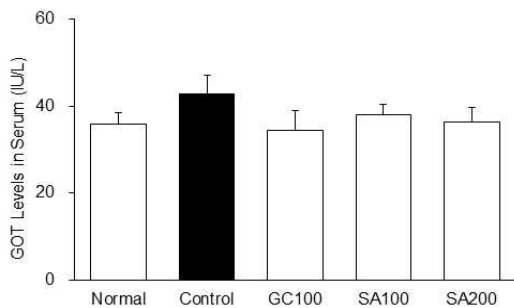


Figure 2. Effects of GOT and GPT in serum by SA treatment.

HFD intake induces liver injury. We examined whether SA ameliorated biomarkers of liver injury, such as GOT and GPT. All values are expressed as mean ± SEM.

^{*}p<0.05 and ^{**}p<0.01 vs. Control group.

6. 혈청 내 leptin의 변화

식욕조절에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청에서 leptin을 측정하였다 (Figure 3). 대조군은 정상군에 비해 7.30배 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.001$), 대조군 대비 GC100군이 24.42% ($p < 0.05$), SA100군이 69.27% ($p < 0.001$), SA200군이 31.56% ($p < 0.01$) 모두 유의적인 감소 효과를 나타내었다. 특히 SA100군이 대조군에 비해 69.27% ($p < 0.001$) 감소하여 탁월한 개선 효과를 보였다. 특히, SA100군은 GC100군과 비교하였을 시, 59.34%로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.01$).

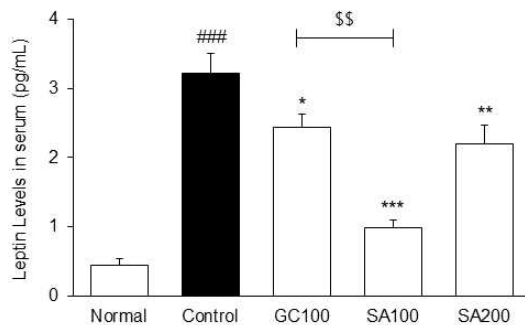


Figure 3. Effects of leptin in serum by SA treatment. Level of serum leptin was measured using a commercial kit at the end of experimental treatment. All values are expressed as mean \pm SEM. ### $p < 0.001$ vs. Normal group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. Control group. \$\$ $p < 0.01$ vs. GC100 group.

7. 에너지 대사 관련 단백질 발현량 측정

간 조직 내에서 에너지 대사를 조절하는 단백질인 Sirt1과 p-AMPK의 발현량을 측정하였다 (Figure 4). Sirt1 측정 결과, 대조군은 정상군에 비해 67.39% 유의적인 감소 수치를 나타내었으며 ($p < 0.01$), GC100군은 대조군의 1.30배 증가하는 경향을 보였다. SA 투여군은 대조군 대비 저농도군 4.28배, 고농도군 2.75배로 모두 유의하게 증가하였다 (SA100, $p < 0.001$; SA200, $p < 0.05$). p-AMPK 측정 결과, 대조군은 정상군에 비해 37.83% 유의적인 감소 수치를 나타내었으며 ($p < 0.01$), GC100군과 SA200군은 각각 대조군의 1.15배, 1.06배로 증가하는 경향을 보였다. 특히 SA100군은 대조군의 1.52배로 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 특히, SA100군은 GC100군과 비교하였을 시, 3.3배 유의하게 증가하였다 ($p < 0.01$).

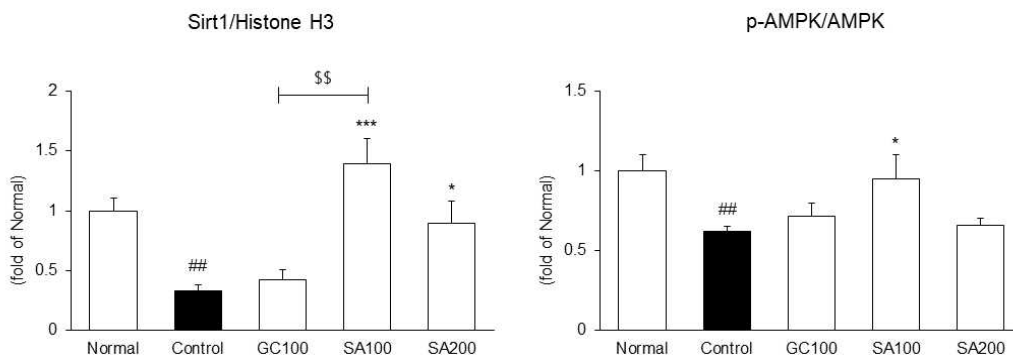
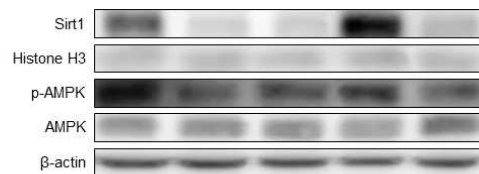


Figure 4. Effects of Sirt1 and p-AMPK protein expressions induced by SA treatment in the liver tissue. Protein lysates from the liver were used for western blot analyses to evaluate Sirt1 and p-AMPK expressions. All values are expressed as mean \pm SEM. ## $p < 0.01$ vs. Normal group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. Control group. \$\$ $p < 0.01$ vs. GC100 group.

8. TG 합성 관련 인자 발현량 측정

간 조직 내에서 TG 합성 인자 SREBP-1과 ACC의 발현량을

측정하였다 (Figure 5). SREBP-1 측정 결과, 대조군은 정상군 대비 1.56배 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.01$), GC100군은

대조군 대비 32.95% 유의적인 감소 효과를 보였다 ($p < 0.01$). SA100군은 대조군 대비 24.44% 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.05$), SA200군은 대조군 대비 15.93% 감소하였다. ACC 측정 결과, 대조군은 정상군 대비 1.22배 유의하게 증가

하였으며 ($p < 0.05$), GC100군의 발현량은 대조군 대비 31.85% 유의적인 감소 효과를 보였다 ($p < 0.001$). SA100군은 대조군 대비 21.81% 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.01$), SA200군 또한 대조군에 비해 13.14% 감소하였다.

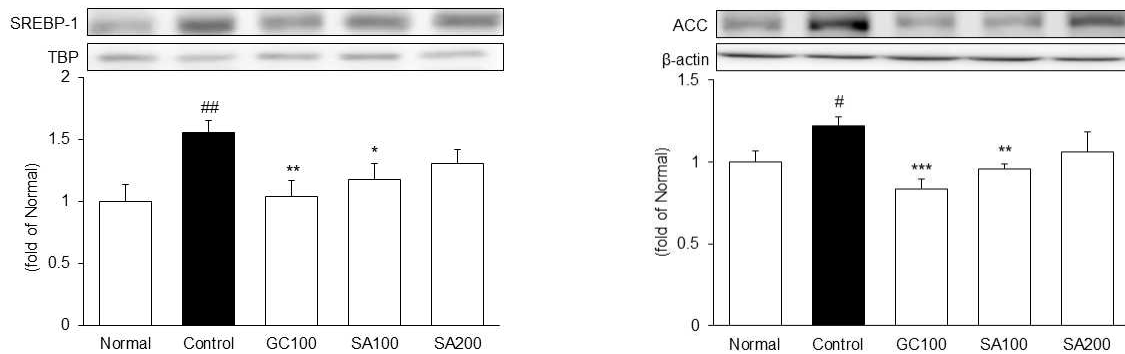


Figure 5. Effects of SREBP-1 and ACC protein expressions induced by SA treatment in the liver tissue.

Protein lysates from the liver were used for western blot analyses to evaluate SREBP-1 and ACC expressions. All values are expressed as mean \pm SEM.

[#] $p < 0.05$ and ^{##} $p < 0.01$ vs. Normal group. ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, and ^{***} $p < 0.001$ vs. Control group.

9. TC 합성 관련 인자 발현량 측정

간 조직 내에서 TC 합성 인자 SREBP-2와 HMGCR의 발현량을 측정하였다 (Figure 6). SREBP-2 측정 결과, 대조군은 정상군 대비 1.76배 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.001$), GC100군의 발현량은 대조군 대비 32.38% 유의한 감소 효과를 보였다 ($p < 0.01$). SA100군은 대조군 대비 26.13% 유의하게

감소하였으며 ($p < 0.05$), SA200군은 대조군의 19.31% 감소하는 경향을 나타냈다. HMGCR 측정 결과, 대조군은 정상군 대비 1.58배 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.001$), GC100군은 대조군 대비 13.92% 유의적인 감소 효과를 보였다 ($p < 0.05$). SA100군은 대조군 대비 21.52% 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.01$), SA200군은 대조군의 17.09% 유의한 감소효과를 나타내었다 ($p < 0.05$).

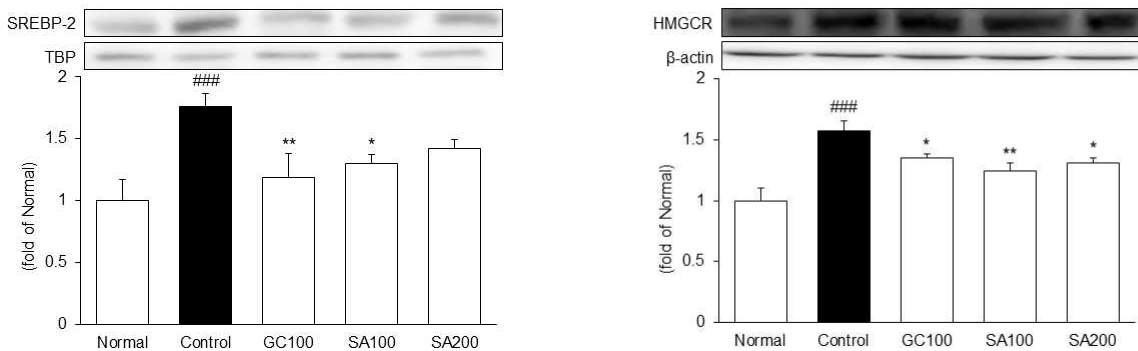


Figure 6. Effects of SREBP-2 and HMGCR protein expressions induced by SA treatment in the liver tissue.

Protein lysates from the liver were used for western blot analyses to evaluate SREBP-2 and HMGCR expressions. All values are expressed as mean \pm SEM.

^{###} $p < 0.001$ vs. Normal group. ^{*} $p < 0.05$ and ^{**} $p < 0.01$ vs. Control group.

10. 조직병리학적 분석

간 조직에서 H&E와 Oil Red O 염색법을 통해 지질 축적 상태를 확인하였고, 부고환주위지방 조직에서 H&E 염색법을 통해 지방세포의 크기 변화를 확인하였다 (Figure 7). 간 조직 상태를 H&E, Oil red O 염색으로 확인한 결과, 정상군에 비해 대조군의 간 조직에서 lipid droplets이 증가하였으나 약물 투

여군에서 크기와 수가 확연하게 줄어드는 것이 관찰되었다. 특히 SA100군에서는 지방 세포의 수와 크기가 줄어든 것을 확인하였다. 부고환주위지방 조직 상태를 H&E 염색으로 확인한 결과, 지질은 정상군에 비해 대조군에서 지방 세포의 크기가 커졌으나, 대조군에 비해 약물 투여군에서 두드러지게 크기가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

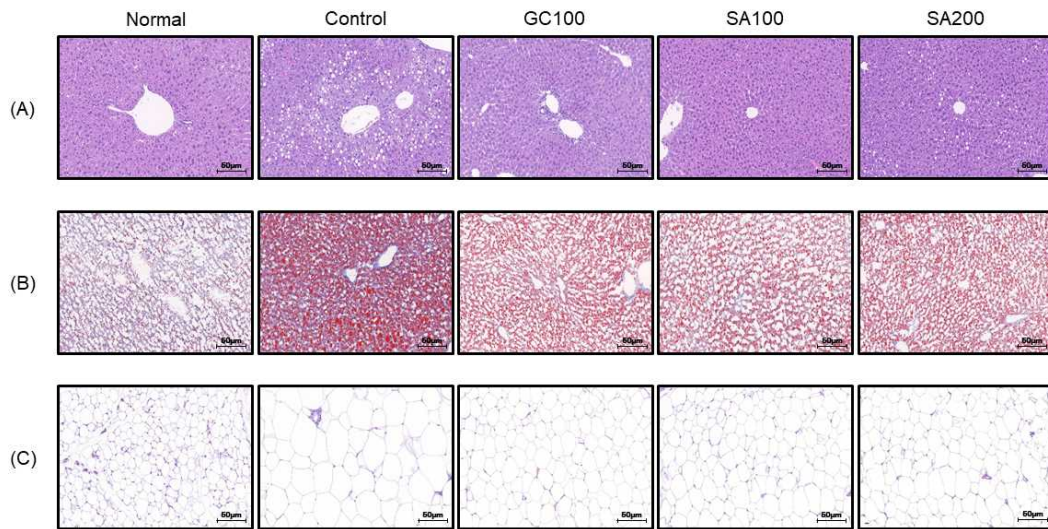


Figure 7. Effect of histopathological change tissues by SA treatment of high-fat diet ($\times 200$, scale bar $50 \mu\text{m}$).

(A) The representative photomicrographs of liver tissues sections stained by H&E staining, (B) The representative photomicrographs of liver tissues sections stained by Oil Red O staining, (C) The representative photomicrographs of epididymis fat tissues sections stained by H&E staining. Normal, normal mice; Control, the obese mice; GC100, the obese mice were treated with *Garcinia cambogia* 100 mg/kg body weight; SA100, the obese mice were treated with *Syzygium aromaticum* L. 100 mg/kg body weight; SA200, the obese mice were treated with *Syzygium aromaticum* L. 200 mg/kg body weight.

IV. 고찰

비만은 신체 내에 과도하게 지방이 축적되는 상태를 의미하며, 낮은 등급의 만성 염증을 유발하는 것으로 보고되어 있다. 이는 산화 스트레스를 증가시켜 염증 및 세포 손상을 촉진하여 심혈관 질환 및 뇌졸중과 같은 만성질환의 주요 요인으로 작용한다. 최근 비만 발병률이 크게 증가하고 있어 예방과 치료가 중요시되고 있는 사안이다²⁴. 현재 사용되는 orlistat 등과 같은 약물은 심각한 부작용을 초래할 수 있기 때문에 복용하기에 불편함이 있어 신체에 안전한 비만 치료제 연구가 시급하다. 이에 항염증 효능을 가지고 있으면서, 지방 축적 및 합성을 억제해 체중 감소 효과를 보이는 부작용이 적은 약물을 찾고자 하였다. 본 연구에 사용된 丁香油은 선행연구를 통해 Raw264.7 cells에서 NLRP3 inflammasome의 억제와 Sirt1의 활성화를 통해 염증을 개선함을 확인하였다²⁵. 또한, 丁香油의 항비만 효과에 관한 기존 연구의 경우, ethanol 추출을 통한 지방산합성 효소 (FAS)의 억제 효과를²⁶, 3T3-L1 세포에서 adipogenesis와 동물모델에서의 lipogenesis 억제를 통한 丁香油의 지질 개선 효과를 확인하였다²⁷. 그러나 丁香油의 열수 추출법을 통한 항비만 효과 연구는 미흡하기에 본 연구를 통해 丁香油 열수 추출물의 항비만 효과를 양성대조군인 *Garcinia cambogia*와의 비교를 통해 검증하고자 하였다.

SA의 in vitro에서 항산화효과를 평가하기 위해 total polyphenol과 total flavonoid의 함량을 측정하고, DPPH와 ABTS radical 소거능을 측정하였다. DPPH와 ABTS assay는 free radical 및 radical을 안정된 형태인 non-radical로 중화시키거나 소거하는 능력을 평가한다^{28,29}. IC₅₀ 값은 활성의 50%에 해당하는 농도이므로 낮게 나타날수록 항산화 활성 능

력이 높다고 간주된다. 측정 결과, SA는 매우 강한 항산화 활성 효과를 보였다.

동물실험을 위해 C57BL/6 4주령 여성 mice를 사용하여 60% 고지방식으로 비만을 유도하였으며, 丁香油 열수 추출물을 경구투여하여 丁香油의 항비만 효과를 평가하였다. 실험이 종료되고, 최종적인 체중 변화와 조직 무게를 측정하였을 때 대조군에서 정상군에 비해 증가하였으며, 이를 SA 투여군에서 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다.

고지방식이 섭취로 인한 혈중 지질의 수치를 평가하기 위해 혈청에서 지질의 한 종류인 TG와 TC를 측정하였다. TG는 하나의 glycerol에 세 개의 fatty acid가 결합된 형태로, 체지방의 구성성분이다. TC는 세포막에 있는 지질로, 세포막이 많은 간과 근육에서 높은 수치로 나타난다. 이들은 과도하게 축적되면 심혈관 질환 및 대사 질환을 일으킬 수 있다. 측정 결과, 정상군에 비해 대조군의 수치가 증가하였으며, SA 투여군에서 대조군 대비 유의적으로 감소된 수치를 나타냈다.

간 손상 정도를 평가하기 위해 혈청에서 GOT와 GPT를 측정하였다. 주로 간 기능 검사를 할 때 측정하며 간과 근육, 심장 및 적혈구 등에 다량 포함되어 있다. 조직 세포가 파괴되면 혈액 속에서 수치가 크게 증가한다. 고지방식이 섭취로 인해 정상군에 비해 증가한 수치가 SA 투여군에서 감소된 경향이 확인되었다.

SA 투여가 식욕억제에 미치는 효과를 확인하기 위해 leptin 호르몬의 수치를 측정하였다. Leptin은 지방세포에서 분비되며 포만감을 주고 식욕을 억제하는 호르몬이다. 일반적으로 지방세포가 증가함에 따라 수치가 증가한다. 그러나 고지방식으로 유도된 비만에서는 leptin 저항성이 증가하여 leptin의 신호 전달을 방해하기 때문에 에너지 소모가 줄어들고 체중이

늘어난다. 측정 결과, 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 수치가 증가하였으나 SA 투여군에서 수치를 유의하게 감소시키는 효과를 나타냈다. 특히, SA100군에서 탁월한 감소 효과를 보였다.

SA 투여의 항비만 효과를 간 조직 내에서 western blot으로 Sirt1, p-AMPK, SREBPs, ACC 및 HMGCR를 분석하였다. Sirt1이 활성화되면 p-AMPK가 활성화된다. 그 후, SREBP-1 억제를 통해 표적 인자인 ACC의 활성을 억제하고 이로써 TG 합성을 억제한다. SREBP-2가 활성화되면 HMGCR의 발현을 증가시켜 cholesterol의 합성을 유도한다. 분석 결과, 정상군 대비 대조군에서 유의적으로 지질 합성이 증가하였으며, 이러한 증가는 SA 투여를 통해 유의적으로 억제된 것으로 나타났다.

비만으로 인한 조직 변화를 관찰하기 위해 부검 후 적출한 간 조직과 부고환주위지방 조직을 H&E와 Oil Red O 방법으로 염색하였다. H&E 염색법은 핵과 세포질을 푸른색, 분홍색으로 염색하며 지방은 염색되지 않아 세포의 손상 및 지방 침착 등 구조적 변화를 알 수 있다. Oil Red O 염색법은 세포 내의 중립 지질을 붉은색으로 염색하여 축적 정도를 시각화한다. 대조군의 세포 조직에서 지방이 다량 축적되어 있고 크기가 커진 것으로 나타났으며, SA 투여군에서 수와 크기가 현저하게 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 이러한 실험 결과를 통해 SA 투여가 leptin의 저항성을 개선하였으며, 지방 합성 및 지방 축적을 억제하여 항비만에 탁월한 효능이 있다는 것을 확인하였다.

에너지 센서인 AMPK가 활성화가 되면 지질 합성에도 관여하지만 β -oxidation과 같은 지방산 산화에도 영향을 미친다. 하지만 본 연구에서는 지방산 산화와 관련된 부분에 대해서는 다루지 못하였다. 따라서 추후 연구에서는 지방산 산화 관련 추가적인 연구가 필요하다.

V. 결 론

본 연구는 丁香 열수 추출물 투여가 고지방식이 섭취로 유도된 비만의 개선 효과를 알아보기 위해 진행되었으며,

다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 丁香 추출물은 DPPH free radical 및 ABTS radical scavenging activity 측정 결과로 탁월한 항산화 활성을 나타냈다.
2. 몸무게 변화량과 조직 무게 변화는 대조군에 비해 丁香 추출물 투여군에서 유의하게 감소하는 효과를 보였다.
3. 丁香 추출물 투여가 TG와 TC의 합성을 유의적으로 감소시켰으며, GOT와 GPT의 수치 또한 대조군에 비해 감소하는 효과를 나타냈다.
4. 丁香 추출물 투여로 leptin 호르몬 수치를 효과적으로 낮

추였으며, 특히, 정향 저농도군에서는 가장 우수한 감소 효과를 보였다.

5. 간 조직에서 Sirt1, p-AMPK, SREBPs, ACC, HMGCR을 western blot으로 분석한 결과, 丁香 추출물 투여가 지질 합성 억제에 대해 탁월한 효과를 나타냈다.
6. 세포의 구조적 변화를 확인하기 위해 조직을 염색한 결과, 대조군에 비해 지방세포의 수와 크기가 丁香 추출물 투여가 지질 합성 억제에 대해 탁월한 효과를 나타냈다.

실험 결과, 丁香 열수 추출물은 지질 합성 억제를 통해 고지방식이로 유도된 비만을 개선하였다. 丁香 추출물 중 저농도가 고농도에 비해 효과적으로 나타난 것은 정향에 휘발성 정유 (essential oil)의 주성분인 유제놀 (eugenol)의 흡수와 관련된 것으로 사료되기에 추후 항비만 후보 소재로 丁香을 사용하기 위해서 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단되어진다.

감사의 글

이 성과물은 정부 (과학기술정보통신부, No.2018R1A5A2 025272; 교육부, 2021R111A1A01059605)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

1. Shon MS, Kim RH, Song JH, Kwon OJ, Lee AR, Kim HO, Roh SS, Kim GN. Potential of Fisetin as a Nutri-cosmetics Material through Evaluating Anti-oxidant and Antiadipogenic Activities. *Asian J Beauty Cosmetol*. 2016;14(1):6-17. doi: 10.20402/ajbc.2016.0003W.
2. Kim SH, Kim SJ, Kim KJ, Lee AR, Roh SS, Lee YC. Antioxidant and Anti-Obesity Effect of SM17 in High-Fat Diet Induced C57BL/6 Mice. *Kor J Herbol*. 2017;32(5):47-55. doi: 10.6116/kjh.2017.32.5.47.
3. Jang YE, Seo BI. The Anti-obesity Effects of Platycodi Radix, Combination of Platycodi Radix and Cyperi Rhizoma on Obesity Induced by High Fat Diet. *Kor J Herbol* 2016;31(3):1-11. doi: 10.6116/kjh.2016.31.3.1.
4. World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2000;894:i-xii, 1-253.
5. Roh SS, Kim JS, Yim SC. The Efficacy of Eriobotryae Folium Pharmacopuncture on Local Fat of High Fat

- Diet Induced Obesity Mice. *The Acupuncture* 2013; 30(3):15–25. doi: 10.13045/acupunct.2013002.
6. Ministry of Health and welfare. Obesity rate, 2021.
 7. Milner JJ, Beck MA. The impact of obesity on the immune response to infection. *Proc Nutr Soc.* 2012; 71(2):298–306. doi: 10.1017/S0029665112000158.
 8. Lee SH, Park HJ, Shin MR, Roh SS. Anti-Obesity Effect of *Schizandrae Fructus* Water Extract through Regulation of AMPK/Sirt1/PGC-1 α signaling pathway. *Kor J Herbol.* 2022;37(2):1–11. doi: 10.6116/kjh.2022.37.2.1.
 9. Jung SM, Seol YH, Chun KY, Park MH, Kang SY, Park YK, Jung HW. Antiobesity and Antidiabetic Effects of Polyherbal Extract with *Atractylodis Rhizoma*, *Anemarrhenae Rhizoma*, *Cinnamomi Cortex*, and *Moutan Radicles Cortex* in High Fat Diet-induced Obesity Mice. *J Korean Med Obes Res.* 2020;20(2):69–77. doi: 10.15429/jkomor.2020.2.2.69.
 10. Shin WY, Seo GS, Song JH, Baek CH. The Retrospective Analysis on Obese and Overweight Female Patients with Korean Medical Treatment and Its Effectiveness for Clinical Setting of Seasonal Treatment. *J Korean Med Obes Res.* 2017;17(1):10–9. doi: 10.15429/jkomor.2017.17.1.10.
 11. Song MY. The Mixed Herbal Extract, CAPA, Prevents Obesity and Glucose Intolerance in Obese Mice. *J Korean Med Obes Res.* 2017;17(2):119–26. doi: 10.15429/jkomor.2017.17.2.119.
 12. Yoon JH, Cheong SH, Choi EJ. Effects of Exercise Intensity on PPAR γ , FOXO-1, MyoD, Myostatin, IGF-1 and Leptin mRNA in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetic Mice. *Exercise Science.* 2014; 23(4):307–14. doi: 10.15857/ksep.2014.23.4.307.
 13. Lee JM, Hur SS. Isolation and Identification of Antifungal Compounds from *Eugenia caryophyllata* Extracts. *J Korean Oil chem Soc.* 2014;31(4): 740–7. doi:10.12925/jkocs.2014.31.4.740.
 14. Lee JA, Kim MJ, Seo SW, Shin MR. Study of the Effect and Underlying Mechanism of Clove Extract on Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rats. *J Int Korean Med.* 2022;43(6):1089–104. doi: 10.22246/jikm.2022.43.6.1089.
 15. Yang YY, Lee MJ, Lee HS, Park WH. Screening of Antioxidative, Anti-platelet Aggregation and Anti-thrombotic Effects of Clove Extracts. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 2011;25(3): 471–81.
 16. Prasad RC, Herzog B, Boone B, Sims L, Waltner-Law M. An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. *J Ethnopharmacol.* 2005;96(1–2):295–301. doi: 10.1016/j.jep.2004.09.024.
 17. Damiani CE, Rossoni LV, Vassallo DV. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. *Vascul Pharmacol.* 2003;40(1):59–66. doi: 10.1016/s1537-1891(02)00311-7.
 18. Cooke SJ, Suski CD, Ostrand KG, Tufts BL, Wahl DH. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture.* 2004;239(1–4):509–29. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.06.028.
 19. Jahanshiri Z, Shams-Ghahfarokhi M, Allameh A, Razzaghi-Abyaneh M. Effect of Curcumin on *Aspergillus parasiticus* Growth and Expression of Major Genes Involved in the Early and Late Stages of Aflatoxin Biosynthesis. *Iran J Public Health.* 2012;41(6):72–9.
 20. De Vasconcelos MC, Bennett RN, Rosa EA, Ferreira-Cardoso JV. Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. *J Sci Food Agric.* 2010;90(10):1578–89. doi: 10.1002/jsfa.4016.
 21. P Rama, A Vignesh, G Lakshmanan. In vitro antioxidant activity of *achyranthes aspera* linn *Int J Med Pharm.* 2013;2013(3):67–78.
 22. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;26:1199–200. doi: org/10.1038/1811199a0.
 23. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9–10):1231–7. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
 24. Lee HI, Jeong HJ, Kwon SH. Weight Loss Experience of Highly Obese Young Adult Who Underwent Bariatric Surgery. *J Korean Acad Nurs.* 2023; 53(2):260–73. doi: 10.4040/jkan.23004.
 25. Seo SW, Kim K, Shin MR. Anti-inflammatory Effect by Cloves Treatment in LPS-induced RAW264.7 Cells. *Pharmacognosy Magazine.* 2023;19(1):105–16. doi: 10.1177/09731296221137420.
 26. Ding Y, Gu Z, Wang Y, Wang S. Clove extract function as a natural fatty acid synthesis inhibitor and prevent obesity in a mouse model. *Food & Function.* 2017;8(8):2847–56. doi: 10.1039/C7FO00096K.
 27. Jung CH, Ahn J, Jeon TI, Kim TW, Ha TY. *Syzygium aromaticum* ethanol extract reduces high-fat diet-induced obesity in mice through downregulation of adipogenic and lipogenic gene expression. *Exp Ther Med.* 2012;4(3):409–14. doi: 10.3892/etm.2012.609.

28. Oh JH, Kim EH, Kim JL, Moon YI, Kang YH, Kang JS. Study on Antioxidant Potency of Green Tea by DPPH Method. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2004;33(7):1079-84. doi: 10.3746/jkfn.2004.33.7.1079
29. Lee KJ, Song NY, Oh YC, Cho WK, Ma JY. Isolation and Bioactivity Analysis of Ethyl Acetate Extract from *Acer tegmentosum* Using In Vitro Assay and On-Line Screening HPLC-ABTS(+) System. *J Anal Methods Chem*. 2014;2014:150509. doi: 10.1155/2014/150509.