

가미온담탕 전탕액과 발효액의 지방전구세포와 고지방식이 유도 비만쥐에 대한 항비만효과

이선정¹ · 성주영^{2,3} · 박은정^{2,3,*}

¹비례부부한의원, ²원광대학교 대학원 소아과학교실, ³원광대학교 전주한방병원 한방소아과

Abstract

A Study on the Anti-Obesity Effect of Gami-Ondam-Tang Water Extract and Fermented Product in Preadipocytes and High-Fat Diet Induced Obese Mice

Lee Sun Jung¹ · Sung JU-yeong^{2,3} · Park Eun-jeong Park^{2,3,*}

¹Bareunbubu Korean Medicine Clinic

²Department of Korean Pediatrics, Graduate School, Wonkwang University

³Department of Korean Pediatrics, Wonkwang University Jeonju Korean Medicine Hospital

Objective

This study aimed to determine the anti-obesity effect of Gami-ondam-tang (ODT) and fermented Gami-ondam-tang (FODT) in high-fat diet (HFD)-induced mice with obesity.

Methods

3T3-L1 cells and human adipose mesenchymal stem cells (hAMSCs) used for in vitro experiments were incubated with ODT and FODT at 200 µg/mL and 400 µg/mL. The growth rate was assessed using the MTS assay. The cellular lipid content was assessed using Oil-Red-O staining. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α) were measured using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and western blotting. The anti-obesity effects of ODT and FODT were confirmed in HFD-fed mice using hematoxylin and eosin staining and serum analysis.

Results

ODT and FODT did not show toxicity at the indicated concentrations of 200 µg/mL and 400 µg/mL. FODT significantly inhibited the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and hAMSCs at concentrations of 200 µg/mL and 400 µg/mL. FODT (400 µg/mL) significantly inhibited gene and protein expressions of PPAR γ . In addition, ODT (400 µg/mL) and FODT (200 µg/mL, 400 µg/mL) reduced the expression of C/EBP α . ODT and FODT inhibited lipid accumulation in the fatty liver and epididymal white adipose tissue of HFD-induced mice. Moreover, FODT reduced body weight gain, total cholesterol, and LDL cholesterol levels in mice.

Conclusions

Based on these results, ODT and FODT have anti-obesity effects. Therefore, ODT and FODT may be clinically useful for the treatment of obesity. Furthermore, FODT showed better anti-obesity effects than ODT.

Key words: Gami-ondam-tang (ODT), Obesity, Adipocyte differentiation, Serum lipid

•Received: January 9, 2025 •Revised: February 13, 2025 •Accepted: February 17, 2025
*Corresponding Author: Park Eun Jung
Department of Pediatrics, Wonkwang University Jeonju Korean Medicine Hospital, 99
Garyeonsan-ro, Deokjin-gu, Jeonju, Jeollabuk-do, 54887, Republic of Korea
TEL: +82-63-270-1019 / FAX: +82-63-270-1199
E-mail: ejpark@wonkwang.ac.kr

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

I. Introduction

비만은 열량의 섭취가 소비보다 많아서 지방조직이 과도하게 축적된 상태이다¹⁾. 우리나라는 서구적인 식습관으로의 변화와 운동량의 감소가 원인이 되어, 우리나라의 19세 이상 성인의 비만 유병률은 1998년 25.8%에서 2016년 35.3%, 2018년 35%로 상승하였고, 청소년 비만율은 2007년 8.2%에서 2019년 11.1%로 증가된 바 있다^{2,3)}. 소아 비만은 치료가 어렵고, 적응장애, 따돌림, 우울, 섭식 장애 등 심리 사회적인 문제가 동반되기도 한다. 또한, 소아 청소년 비만으로 인한 동반 질환은 성인까지 지속될 수 있으므로 소아기에 비만을 예방하고 중재할 필요성이 있다⁴⁾.

소아 비만의 치료에는 식이조절, 행동치료, 운동치료, 약물치료 등이 있다. 서양의학적으로 항비만 약물은 작용 기전에 따라 크게 에너지 섭취를 줄일 수 있는 억제제와 에너지 소비를 증가시키는 약제로 분류된다. 그 중, 소아에서 비교적 장기 처방이 가능한 약은 올리스타트 (Orlistat)와 시부트라민 (sibutramine)으로 알려져 있다. 올리스타트는 위장 및 췌장의 리파아제 억제제로 섭취된 지방의 약 30%를 소화, 흡수시키지 않고 배출시키는데 지방변이 나타날 수 있고, 지용성 비타민 보충이 필요하다는 단점이 있다. 시부트라민은 세로토닌과 노르아드레날린의 재흡수 동시 억제제로 에너지 섭취를 감소시키고 갈색지방조직의 아드레날린 수용체를 항진시켜 열 생산을 증가시키는 약물로 장기적으로 소아 청소년의 체중 감량에 효과적이며 비만의 합병증을 없애 줄지 미지수이며 두통, 구역, 현기증, 혈압 상승 등의 부작용이 보고되어 있다⁵⁾.

이러한 부작용으로 최근 한의학적 치료인 침 치료, 한약 치료에 대한 관심이 늘어나고 있다. 하지만, 소아는 침 치료와 같은 침습적인 행위에 두려움을 느끼고 거부하는 경향이 많기 때문에 아프지도 않고, 간편한 한약 복용이 접이 많은 소아의 비만 치료에 주된 수단이 되고 있다.

국내에서 비만 치료에 가장 많이 활용된 처방은 태음조위탕과 조위승청탕이고, 단미로는 마황이 빈도가 제일 높으나⁶⁾, 이는 주로 성인을 대상으로 한 연구이며, 마황은 복용 시 고혈압, 빈맥, 부정맥, 신경과민, 진전, 불면, 식욕부진 등의 부작용이 있는 것으로 보고된 바 있으므로 신중하게 사용하여야 한다⁷⁾. 소아의 비만은 적극적인 체중의 감량보다는 소아가 성장하고 있다

는 점, 심리적인 문제에 취약하다는 점을 고려하여 비만도의 감소를 목표로 해야 한다⁸⁾.

한의학적으로 소아의 비만은 비허습저 (脾虛濕阻), 비신양허 (脾腎陽虛), 간기울결 (肝氣鬱結) 등으로 변증하여 건비 (健脾), 이습 (利濕), 화담 (化痰), 소간이기 (疏肝理氣) 등의 치법 (治法)을 활용하여 치료하며, 평위산 (平胃散), 육군자탕합오자연중환 (六君子湯合五子衍宗丸), 시호소간산 (柴胡疏肝散) 등의 처방을 사용할 수 있다^{8,9)}.

온담탕 (溫膽湯)은 『三因極一病證方論』에서 “治心膽虛怯, 觸事易驚, 或夢寐不祥…”라고 수록된 이래 심담허겁 (心膽虛怯)한 병리에 활용한 대표적인 처방으로 정신신경이 쇠약하거나 자율신경계가 예민한 경우 응용할 수 있는 방제이다^{10,11)}. 온담탕의 효과에 대한 선행연구로는 정신신경계와 관련한 연구 외에 혈관내피세포의 조직괴사를 막고 혈압을 강하시키는 효과¹²⁾, 가미온담탕의 항고지혈 효과¹³⁾ 등 심혈관계와 연관된 연구가 주를 이루고 있지만 비만과 관련된 실험 연구로 온담탕과 사물안신탕, 시호소간산이 비만과 스트레스에 미치는 영향에 대한 연구¹⁴⁾가 존재한다. 이를 통해, 이 등은 온담탕 투여군에서 Total cholesterol, High-Density Lipoprotein (HDL) cholesterol에서의 유의성 있는 감소를 확인한 바 있다¹⁴⁾.

한편, 발효한약은 약리적 기능성뿐만 아니라 한약의 제형개량과 포제 방법을 향상시킨 새로운 한약제제로 최근 신기능 한약제품 개발 분야에서 주목받고 있다. 발효한약추출물 HP-1이 알코올을 투여한 쥐의 알코올 대사에 미치는 영향¹⁵⁾, 지방전구세포와 고지방식이비만마우스에서 가미곽향정기산의 전탕액과 발효액의 항비만 효과¹⁶⁾ 등 발효한약의 유효성과 안전성에 대해 꾸준히 연구가 시행되고 있다. 발효는 미생물에 의하여 유기물이 분해되는 과정으로, 발효한약은 약효성분의 체내 흡수율과 생체 이용률을 활성화시킬 수 있어 비만 치료에 유효성을 기대할 수 있고, 부작용 없이 장기간 사용할 수 있는 안정성이 있다¹⁷⁾. 또한, 장내미생물 균총의 균형은 비만에 영향을 미칠 수 있으므로¹⁸⁾, 에너지 대사에 관여하는 장내세균총의 변화를 일으키고 미생물 균총의 균형을 맞추기 위해 발효한약을 활용해볼 수 있다.

가미온담탕 전탕액과 발효액의 체중 증가 억제 효과 및 기전에 관한 연구는 없는 상황에서 가미온담탕 전탕액과 발효액이 항비만효과가 있을 것으로 가설을 세우고 가미온담탕 처방을 구성하였다. 본 연구에 사

용한 가미온담탕 (Gami-ondam-tang, 이하 ODT)은 온담탕에 소간해울 (疏肝解鬱)의 효능이 있는 시호 (柴胡)를 포함해 비만에 유효한 약재들을 가미하여 심리적인 스트레스를 동반한 소아의 비만에 응용하기 위해 구성되었다.

저자는 고지방식으로 유도한 비만쥐에 가미온담탕 전탕액 (ODT)과 가미온담탕 발효액 (Fermented Gami-ondam-tang, 이하 FODT)을 투여한 이후 세포 독성 시험, 지방세포분화, 지방세포 분화 주요 조절 인자인 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α), AMP-activated protein kinase alpha (AMPK α)의 유전자 및 단백질 발현에 미치는 영향, 체중 변화, 혈중 지질 농도의 변화, 간기능과 신기능에 대한 영향을 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. Materials and methods

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 원광대학교 부속 전주한방병원에서 구입하여 사용하였다. ODT와 FODT의 처방 내용과 1첩 분량은 Table 1과 같다.

검액의 경우, 가미온담탕 2첩에 물 2500 ml를 넣어서 2시간 동안 가열한 960 ml 전탕액과 800 ml 발효액을 동결건조해서 각각 51.96 g, 42.02 g의 분말을 얻었다. 발효액은 가미온담탕 2첩에 물 2500 ml를 넣어서 발효기 (서울 우성금속 제작)에서 100 °C로 끓여서 85 °C로 온도를 낮춘 후 10시간 동안 전탕하였다. 이를 50 °C로 식힌 상태에서 복합 발효균 (청주 중앙미생물 연구소 제품 : 바실러스, 효모균, 유산균 포함)을 넣어서 스위치를 켜고 난 후 48시간 동안 발효 숙성시키는 과정을 통해 만들어졌다.

2) 시약

Insulin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone (Dex), indomethacin, Oil Red O solution은 Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), new born calf serum (CS), fetal bovine serum (FBS), penicillinstreptomycin은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)

제품을 사용하였다. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP α), AMP-activated protein kinase alpha (AMPK α), phospho AMPK α 에 대한 antibody는 Cell Signaling Technology (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 제품을 사용하였고, Anti-GAPDH antibody는 Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) 제품을 사용하였다.

Table 1. Prescription of Gami-ondam-tang

Herbal names	Pharmacognostic name	Weight (g)
半夏	Pinellia ternata	8
陳皮	Citri Unshii Pericarpium	8
白茯苓	Hoelen	12
枳實	Ponciri Fructus	6
竹茹	Bambusae Caulis In Taeniam	4
甘草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	8
生薑	Zingiberis Rhizoma Crudus	2
大棗	Zizyphi Fructus	2
薏苡仁	Coicis Semen	20
桑葉	Mori Folium	8
山茱萸	Corni Fructus	8
山藥	Dioscoreae Rhizoma	4
柴胡	Bupleuri Radix	12
黃芩	Scutellariae Radix	8
黃芪	Astragali Radix	12
黃精	Polygonati Rhizoma	6
枸杞子	Lycii Fructus	6
神麩	Massa Medicata Fermentata	6
蘿藦子	Raphani Semen	6
豬苓	Polyporus	8
澤瀉	Alismatis Rhizoma	6
Total amount		160

3) 3T3-L1 cell 분화유도 과정

3T3-L1 지방전구세포는 American Type Culture Collection (Rockwill, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3T3-L1을 6 well에서 세포가 접시 바닥에 가득 찰 때까지 배양한다. 세포가 가득 찬 후 1-2일 더 유지시킨다. 그 후, MDI (0.5 mM IBMX, 1 μ M dexamethasone, 1 μ M insulin) 시약을 각 well에 처리한다. MDI 시약 처리 48시간 후에 약물 처리를 한다. 약물 처리를 하는 동시에 각 well에 인슐린을 1 μ M로 처리한다. Blank군은 아무 것도 처리를 하지 않으며, Control군은 분화시약과 insulin만을 처리하며 약물군은 추가로 ODT, FODT 200, 400 μ g/ml를 처리한다. 약물 처리 후 48시간 뒤에 배양

액을 모두 버리고 insulin이 1 μM 로 첨가된 배양액을 첨가하여 48시간을 더 유지시키는데 Blank군은 인슐린도 처리하지 않는다. 배양액의 경우, Blank군은 10% calf serum (CS)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였으며 나머지 군은 10% fetal bovine serum (FBS)가 포함된 DMEM에서 배양하였다. 배양조건은 5% CO₂, 37 °C이다.

4) hAMSCs 분화유도 과정

Human adipose mesenchymal stem cells (hAMSCs)는 CEFO Bio (CEFO Bio, Seoul, Republic of Korea)에서 구입하여 사용하였다. hAMSCs를 6 well에서 세포가 접시 바닥에 가득 찰 때까지 배양한다. 세포가 가득 찬 후 1-2일 더 유지시킨다. 그 후, 0.5 mM IBMX, 1 mM Dex, 1 mM insulin, 100 mM indomethacin으로 구성된 Differentiation media (DM) 시약을 각 well에 처리한다. (Day 0). DM 시약 처리 72시간 후에 새롭게 만든 DM을 추가로 72시간 동안 더 처리하여 준다. 총 6일간의 분화유도 후 약물 처리를 시작한다. Day 6부터 Day 15까지 매 3일마다 insulin 및 약물을 각 군에 처리하여 준다. Blank군은 아무것도 처리를 하지 않으며, Control군은 분화시약과 insulin만을 처리하며 약물군은 추가로 ODT와 FODT를 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한다. 배양액은 Blank군은 10% calf serum (CS)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였으며 나머지 군은 10% fetal bovine serum (FBS)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 앞서 설명한 실험방법을 따라 배양하였다. 배양 조건은 5% CO₂, 37 °C이다.

2. 방법

1) *in vitro* 실험

(1) 3T3-L1에서의 세포 독성 시험

지방세포 분화억제 효과 탐색을 위한 약물 처리 농도 결정을 위해 96 well plate에서 MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) 시약 (Promega Corporation, Madison, USA)을 사용하여 MTS assay를 수행한다. 각 약물을 처리한 세포를 48시간 배양하고 MTS 시약 10 μl 를 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에 4시간 배양한다. 이때, 흡광도는 VERSA max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 490 nm에서 측정한다.

(2) Human adipose mesenchymal stem cells (hAMSCs)에서의 세포독성시험 (MTS assay) 약물이 세포의 생존율에 끼치는 영향을 확인하기 위해 MTS assay를 수행하였다.

hAMSCs를 96 well에서 배양한다. 96 well의 바닥이 세포로 가득 차면 농도별로 약물 처리를 한다. 약물 처리 후, 72시간 뒤에 각 well에 MTS 시약을 10 μl 를 첨가하고 4시간 동안 배양기에서 배양한다. 이때, 흡광도는 VERSA max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 490 nm에서 측정한다.

(3) Oil-Red-O 염색법

지방세포로 분화된 세포 내의 지방을 염색하여 분화 정도를 측정하기 위하여 Oil-Red-O 염색법을 수행하였다. 세포를 10% 포르말데하이드 (formaldehyde)로 1시간 동안 고정시킨 후 60% 이소프로판올 (isopropylalcohol) 액으로 세척하였다. 세포를 60% Oil-Red로 30분간 염색하였다. 세포질 내 붉은색 과립이 있는 세포를 분화된 지방세포에서 생성된 지질로 간주하고, 염색된 지방세포는 EVOS XL Core Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 활용하여 각 그룹의 대표 이미지를 촬영하였다. 지질생성 정도를 수치로 비교하기 위해, Oil-Red-O를 100% 이소프로판올로 녹여내어 흡광도를 측정하였다. 이때, 흡광도는 VERSA max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 500 nm에서 측정한다.

(4) 실시간 역전사 폴리머화 연쇄반응 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, Real time RT-PCR)

지방분화 진행 중 발현되는 전사인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 에 미치는 영향을 알아보기 위해 Real-time RT-PCR을 수행하였다. 지방세포를 분화시켜 약물을 농도별로 처리한 후, QIAzol Lysis reagent (QIAGEN sciences, Maryland, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 템플릿으로 power cDNA synthesis kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 single stranded cDNA를 제조하였다. 발현 정도는 cDNA에 유전자를 특이적으로 증폭하는 PPAR γ , C/EBP α primers를 넣어 Real-time RT-PCR 방법을 이용하여 측정하였으며 프라이머 (primer)의 순서는 Table 2와 같다. 이때, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogen-

ase (GAPDH)와 h36b4는 각각 쥐와 사람 세포에 대하여 내인성 대조군 (endogenous control)으로 사용되었다.

Table 2. The Primer Sequences Used for Real-Time Reverse transcription-polymerase chain reaction

Target gene	Primer sequences
mPPAR γ	5'-TTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3' (sense)
	5'-TTATTCATCAGGGAGGCCAG-3' (antisense)
mC/EBP α	5'-GCCGAGATAAAGCCAAACAA-3' (sense)
	5'-CGTAAATGGGGATTGGTCA-3' (antisense)
mGAPDH	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3' (sense)
	5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3' (antisense)
hPPAR γ	5'-TGAATGTGAAGCCATTGAA-3' (sense)
	5'-CTGCAGTAGCTGCAGTGT-3' (antisense)
hC/EBP α	5'-TGTATACCCCTGGTGGGAGA-3' (sense)
	5'-TCATAACTCCGGTCCCTCTG-3' (antisense)
h36b4	5'-AAACTGCTGCCTCATATCCGG-3' (sense)
	5'-TGTAGATGCTGCCATTGTCGA-3' (antisense)

mPPAR γ : mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma, mC/EBP α : mouse CCAAT/enhancer binding protein alpha, mGAPDH: mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hPPAR γ : human peroxisome proliferator-activated receptor gamma, hC/EBP α : human CCAAT/enhancer binding protein alpha, h36b4: human acidic ribosomal phosphoprotein P0

(5) 웨스턴 블롯 (Western blot)

지방세포를 분화시켜 약물을 농도별로 처리한 후, 3T3-L1 세포와 hAMSCs를 protease inhibitor (Sigma Chemical Co., Mannheim Germany)가 첨가된 ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCL (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 1 mM dithiothreitol (DTT), 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride)로 용해시킨다. 시료를 13,000 rpm, 4 °C에서 20 분간 원심분리한다. 8% SDS-polyacrylamide gel 전기 영동한 다음 PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)에 전사한다. 5% skim milk로 차단 (blocking)한 후 1차 항체 (PPAR γ , C/EBP α) 및 horseradish peroxidase가 부착된 anti-rabbit 또는 anti-mouse 2차 항체 (Dako, Glostrup, Denmark)로 반응시키고 ECL 용액 (SantaCruz, CA, USA)을 사용하여 목적 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

2) *in vivo* 실험

(1) 실험동물

실험동물은 식이로 비만이 유도되는 형질을 가진 4주령 수컷 C57BL/6J 쥐 24마리를 대한 바이오 링크에

서 구입하였다. 실험에 앞서 1주일 동안 일반 고형 사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경 (23 ± 2 °C, 습도 55 ± 5%)으로 유지하고, 12시간씩 명암을 자동 조절하여 적응시켰다. 본 연구는 원광대학교 동물윤리심의위원회의 승인을 받아 윤리요강에 따라 실시하였다 (승인번호: WKU17-127).

(2) 실험군의 식이와 검액의 투여 방법

동물군은 일반식이 (ND, Normal diet), 고지방식이 (HFD, 60% High fat diet), 고지방식이 + ODT (HFD + ODT), 고지방식이 + FODT (HFD + FODT)군으로 설정하였고, 각 군에 6마리씩 무작위로 배정하였다. 고지방식이군은 실험 1주차부터 고지방식이를 통해 비만을 유도하였고, HFD + ODT군과 HFD + FODT군은 고지방식이를 투여하며 각각 ODT와 FODT를 증류수에 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 녹여 주 5회, 하루에 한 번 일정한 시간에 경구 투여하였다. 일반식이와 고지방식이의 kg당 조성의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 3).

Table 3. Composition of Experimental Diets (g/kg)

Consistents	Normal diet	High fat diet
Casein	200.0	265.0
L-Cysteine	3.0	4.0
Corn Starch	397.486	-
Maltodextrin	132.0	160.0
Sucrose	100.0	90.0
Lard	-	310.0
Soybean Oil	70.0	30.0
Cellulose	50.0	65.5
Mineral Mix*	35.0	48.0
Calcium Phosphate, dibasic	-	3.4
Vitamin Mix ⁺	10.0	21.0
Choline Bitartrate	2.5	3.0
TBHQ [†] , antioxidant	0.014	-
Blue Food Color	-	0.1

*: Mineral Mix containing (g/kg): calcium phosphate dibasic 500, sodium chloride 74, potassium citrate 220, potassium sulfate 52, magnesium oxide 24, manganous carbonate 3.5, ferric citrate 6, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, sodium selenite 0.01, chromium potassium sulfate 0.55

⁺: Vitamin Mix containing (g/kg): thiamin HCl 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine HCl 0.7, niacin 3, calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, biotin 0.02, vitamin B12 (0.1% trituration in mannitol) 1, dry vitamin A palmitate (500,000 U/g) 0.25, manadione sodium bisulfite complex 0.15

[†]: tertiary butylhydroquinone

(3) 체중 측정

쥐에 실험 1주차 (day 0)부터 10주차 (day 70)까지 60% 고지방식이를 통해 비만을 유도하면서 200 mg/kg/day 용량 (성인 60 kg일 때 하루 섭취량 (≈ 8 g/60 kg/day)을 기준으로 산정)으로 ODT와 FODT를 투여한 약물 투여군과 10주 동안 고지방식이만 투여한 대조군에서 몸무게 변화를 측정하였다. 이 때, 고지방식이만 투여한 대조군은 약물 투여군과 동일한 용량의 증류수를 같은 시간에 투여하였다.

(4) Serum Analysis

실험종료 후 실험동물을 6시간 동안 절식시킨 후 혈액을 채취하였으며, 채취한 혈액을 원심분리를 통해 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 -70 °C에서 보관한 후 분석에 사용하였다. Total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, triglyceride, glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine, blood urea nitrogen (BUN) 항목을 Seoul Medical Science Institute (Seoul Clinical Laboratories, Seoul, Korea)에 의뢰하여 분석하였다.

(5) Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색

간 조직 및 지방 조직의 조직학적 분석을 위해 H&E 염색을 시행하였다. 실험동물에서 간과 부고환 백색지방조직을 적출하여 10% 포르말린에서 48시간 동안 고정된 후, 탈수 및 파라핀 침투과정을 거쳐, 파라핀 포매기로 포매하였다. 포매한 조직은 rotary microtome으로 5 μm 의 절편을 만들어 hematoxylin과 eosin (H&E) 염색

을 수행하여 EVOS XL Core Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 지방 및 간 조직의 변화를 관찰하였다.

3) 통계분석

실험 결과는 각 실험에 대한 평균값 \pm Standard deviation (SD)로 표기하였다. 각 그룹간의 차이를 결정하기 위한 통계 분석은 Independent t-Test를 이용하였으며, 이를 위해 3번의 독립된 실험을 수행하였다. 모든 통계 분석은 SPSS statistical analysis software version 11.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL)을 이용하여 수행하였다. $P < 0.05$ 인 값을 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. Results

1. 세포독성 시험

1) 3T3-L1에서의 세포 독성 시험 (MTS assay)

먼저, 본 실험에서는 ODT 및 FODT의 지질 생성 억제 효과를 확인하기 위해 3T3-L1 세포를 활용하였다. 3T3-L1 지방전구세포는 지방 세포 생성 (adipogenesis)의 분자기전을 연구하기 위한 시험관 내 모델로 활용된다.

3T3-L1 지방전구세포의 생존율에 영향을 끼치지 않는 ODT와 FODT의 농도를 실험에 활용하기 위해 MTS assay를 진행하였다. 그 결과, ODT와 FODT 모두 200 $\mu\text{g/ml}$ 와 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였으며 (Fig. 1), 이 농도를 실험 농도로 사용하였다.

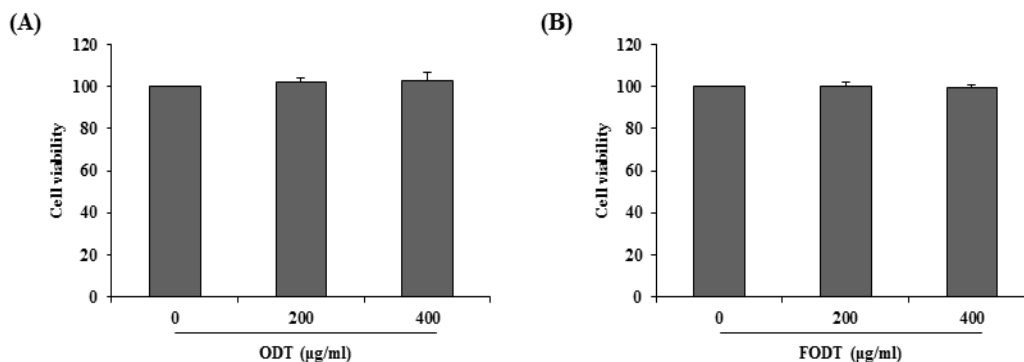


Fig. 1. Effects of gami-ondam-tang and fermented gami-ondam-tang on cell viability in 3T3-L1 cells

Cells were incubated with Gami-ondam-tang (ODT) and Fermented Gami-ondam-tang (FODT) at the indicated concentrations (200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$) for 48 hours and the growth rate was assessed by MTS assays.

2) Human adipose mesenchymal stem cells (hAMSCs)에서의 세포독성시험 (MTS assay)

3T3-L1 지방전구세포와 마찬가지로 hAMSCs의 생존율에 영향을 끼치지 않는 ODT와 FODT의 농도를 실험에 활용하기 위해 MTS assay를 진행하였다. 그 결과, ODT와 FODT 모두 200 µg/ml와 400 µg/ml 농도에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였으며 (Fig. 2), 이 농도를 실험 농도로 사용하였다.

2. 지방세포 분화억제 효과

1) 지방축적 억제 효과

Oil-Red-O 측정을 통해서 ODT와 FODT의 농도별 분화억제 정도를 알아보았다. 3T3-L1 preadipocyte와 hAMSCs에 각각 ODT와 FODT를 처리하여 분화억제 정도를 측정한 결과, FODT 200 µg/ml, 400 µg/ml 농도에서 지방세포 분화억제 효과를 나타냄을 확인하였다 (Fig. 3, 4).

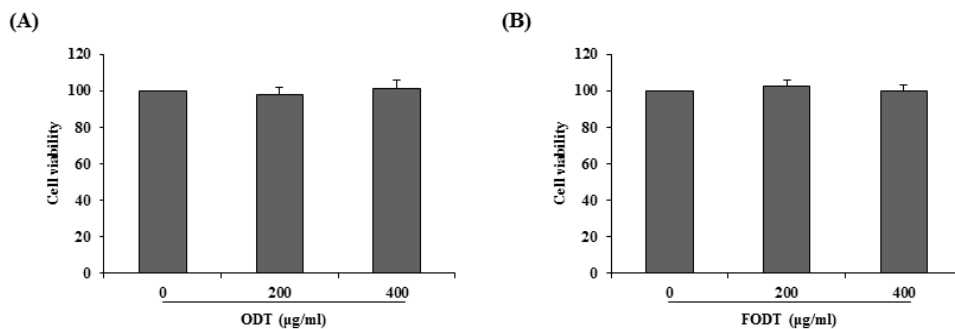


Fig. 2. Effects of gami-ondam-tang and fermented gami-ondam-tang on cell viability in human adipose mesenchymal stem cells

Cells were incubated with Gami-ondam-tang (ODT) and Fermented Gami-ondam-tang (FODT) at the indicated concentration (200 µg/ml, 400 µg/ml) for 72 hours and the growth rate was assessed by MTS assays.

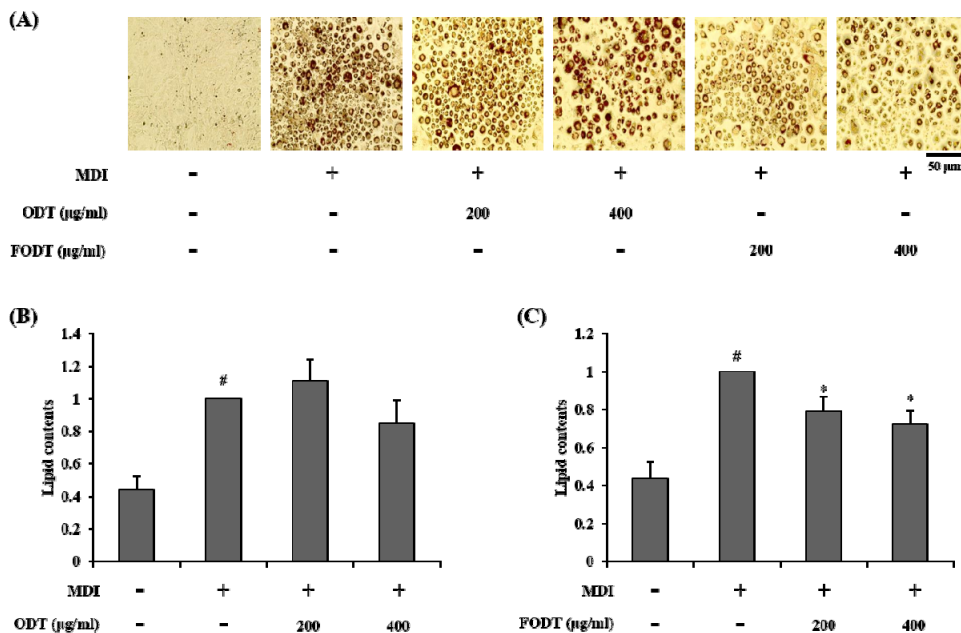


Fig. 3. Anti-adipogenic effect of gami-ondam-tang and fermented gami-ondam-tang on 3T3-L1 cells

Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or presence of Gami-ondam-tang (ODT) and Fermented Gami-ondam-tang (FODT) (200 µg/ml, 400 µg/ml). Lipid droplets stained by Oil Red O were observed (A) and the absorbance at 500 nm was measured after being resolved in isopropanol (B, C).

[#]: *P* < 0.05, significantly different from MDI-uninduced preadipocytes.

^{*}: *P* < 0.05, significantly different from MDI-induced adipocytes.

MDI: 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, 1 µM insulin

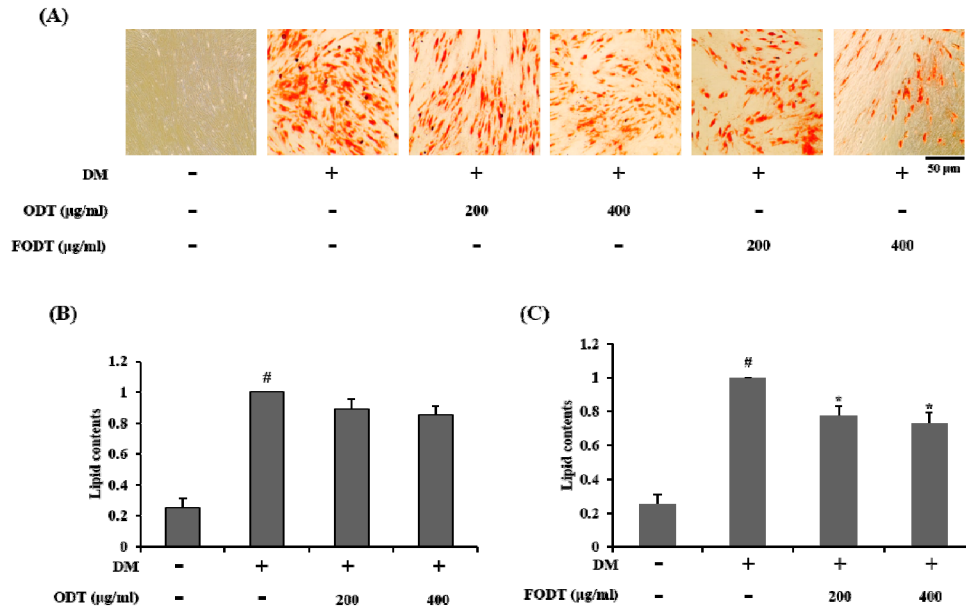


Fig. 4. Anti-adipogenic effect of gami-ondam-tang and fermented gami-ondam-tang on human adipose mesenchymal stem cells

Post-confluent human adipose mesenchymal stem cells (hAMSCs) were differentiated in the absence or presence of Gami-ondam-tang (ODT) and Fermented Gami-ondam-tang (FODT) (200 μg/ml, 400 μg/ml). Lipid droplets stained by Oil Red O were observed (A) and the absorbance at 500 nm was measured after being resolved in isopropanol (B, C).

#: $P < 0.05$, significantly different from differentiation media (DM)-uninduced preadipocytes.

*: $P < 0.05$, significantly different from differentiation media (DM)-induced adipocytes.

2) 지방세포 분화조절인자 유전자 발현 및 단백질 발현에 대한 효과

Real-time RT-PCR과 Western blot을 통해 지방세포 분화 조절인자 유전자 발현 정도를 측정하였다. FODT 400 μg/ml 농도에서 PPAR γ 억제 효과가 있었으며 (Fig. 5A), ODT 400 μg/ml, FODT 200 μg/ml, 400 μg/ml 농도에서 C/EBP α mRNA 발현에 대해 유의하게 억제 효과를 나타냈다 (Fig. 5B).

뿐만 아니라, mRNA의 결과와 마찬가지로 Western blot analysis를 통해 측정된 단백질 발현량에서도 PPAR γ 와 C/EBP α 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다.

또한, ODT와 FODT는 AMPK α 의 전체 발현량은 변화시키지 않으면서 AMPK α 의 인산화를 유도함으로써 AMPK α 를 활성화시켰다 (Fig. 5C).

3. 체중 변화와 간 및 부고환 지방 무게 비교

세포 실험의 결과를 동물모델에서 확인하기 위해 고지방식이로 비만을 유도한 쥐 모델을 사용하였다. 총 10주간의 HFD의 투여를 통해 HFD군은 ND군에 비해 유의한 체중 증가가 유도되었음이 확인되었다. HFD + FODT군은 HFD군에 비해 유의한 체중 증가

억제 효과를 관찰할 수 있었다 (Fig. 6A, B).

총 10주간의 약물 투여 종료 후, 조직 내 지질 축적량을 확인하기 위해 간 및 부고환 지방을 적출하였다. 간 무게는 대조군에 비해 HFD + ODT, HFD + FODT 두 군 모두에서 유의하게 감소하였으며, HFD + FODT 군에서 부고환 백색지방조직의 무게가 대조군에 비해 유의하게 감소해 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 6C).

1) 간조직과 부고환 백색지방조직의 병리조직학적 분석

간 조직에서 대조군은 정상군에 비해 지질이 축적되어있음을 볼 수 있다. 비만이 유발된 간 조직에서는 간세포에 축적된 중성지방의 수포의 크기가 증가하여 거대수포성 지방증 (macrovesicular steatosis)을 나타낸다. 대조군과 비교하여 ODT 투여군과 FODT 투여군에서 지방증과 공포변성 (vacuolar degeneration)이 개선되었음을 볼 수 있다 (Fig. 7A).

부고환 백색지방조직에서 고지방식이로 비만을 유발한 대조군에서는 지방세포의 크기가 현저히 증가했으며, 대조군과 비교하여 HFD + ODT 투여군과 HFD + FODT 투여군에서는 지방세포의 크기가 감소되어 있음을 관찰할 수 있다 (Fig. 7B).

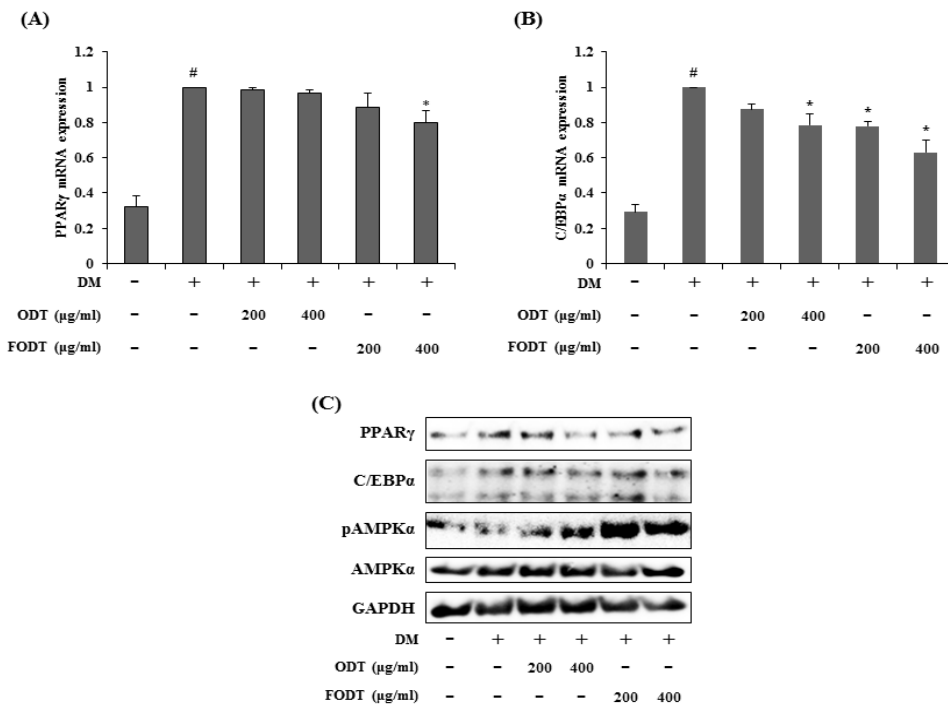


Fig. 5. Effects of gami-ondam-tang and fermented gami-ondam-tang on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT/enhancer binding protein alpha in differentiated adipocytes

The effects of Gami-ondam-tang (ODT) and Fermented Gami-ondam-tang (FODT) on the mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) and CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPα) in human adipose mesenchymal stem cells (hAMSCs) were analyzed by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. The effects of ODT and FODT on the protein levels of PPARγ and C/EBPα in hAMSCs were determined by western blot analyses.

The effects of ODT and FODT on the phosphorylation level of AMP-activated protein kinase (AMPK) in human adipose mesenchymal stem cells were determined by western blot analyses. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) was used as endogenous control.

[#]: $P < 0.05$, significantly different from differentiation media (DM)-uninduced preadipocytes.

^{*}: $P < 0.05$, significantly different from differentiation media (DM)-induced adipocytes.

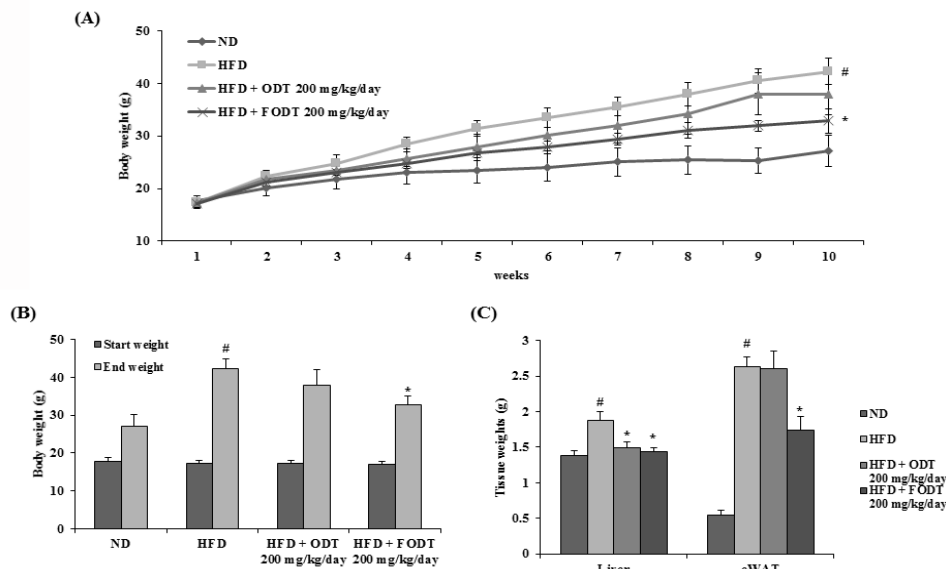


Fig. 6. Effects of gami-ondam-tang and fermented gami-ondam-tang on high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice

Weight changes over 10 weeks and the difference between the start and end weight of each group (A and B), epididymal white adipose tissue (eWAT) and liver weight (C) were measured.

[#]: $P < 0.05$, significantly different from normal diet (ND) group.

^{*}: $P < 0.05$, significantly different from high fat diet (HFD) group.

ODT: Gami-ondam-tang, FODT: Fermented Gami-ondam-tang

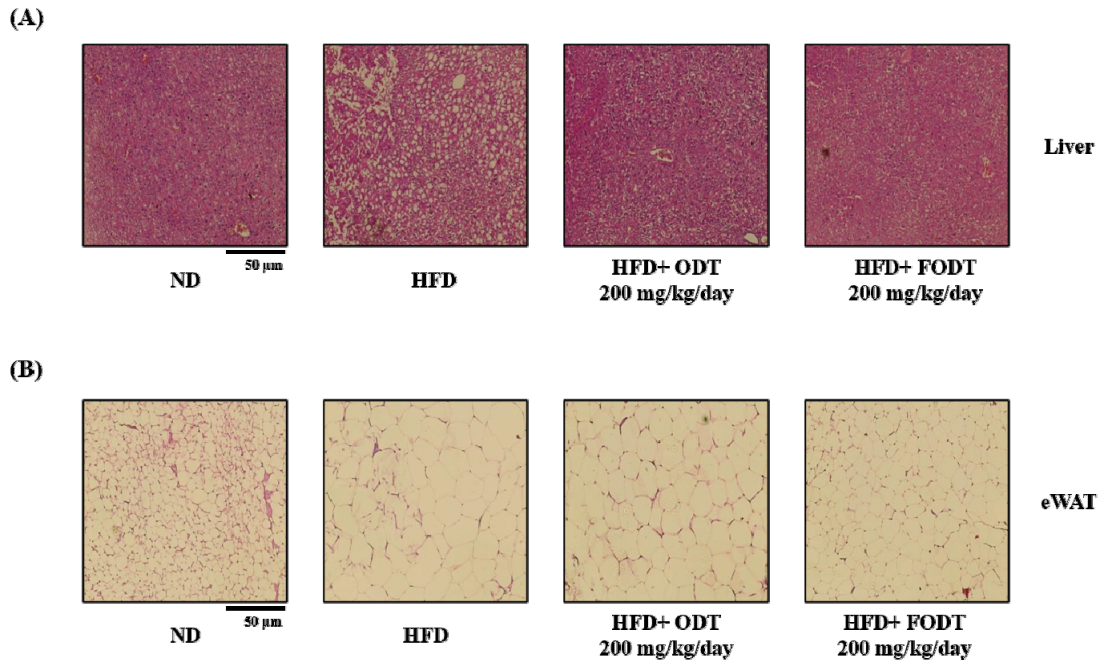


Fig. 7. Effects of gami-ondam-tang and fermented gami-ondam-tang on liver and epididymal white adipose tissue in high-fat diet-induced obese mice histology of adipose tissue of the mice

Sections from liver (A) and epididymal white adipose tissue (eWAT) (B) were stained with hematoxylin and eosin (H&E). (magnification, 200 x, scale bar, μm)

2) 간과 부고환 백색지방조직에서 지방세포 분화조절 인자 유전자와 단백질 발현에 미치는 영향

간의 PPAR γ mRNA 발현은 HFD + FODT군에서 유의하게 감소하였고 (Fig. 8A), C/EBP α mRNA 발현은 HFD + ODT, HFD + FODT군에서 유의한 억제효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 8B). Western blot analysis를 통해 측정한 결과 단백질 수준에서도 간과 부고환 백색 지방조직의 PPAR γ 와 C/EBP α 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 8C and D).

4. 간기능, 신기능에 대한 영향

ODT 및 FODT의 장기간의 투여가 간독성 및 신독성을 유발하지 않으면서 체중만 효과적으로 감소시키는지를 확인하기 위해 간독성 및 신독성을 혈액 내 AST, ALT, creatinine, BUN을 분석하여 평가하였다. 간독성 평가를 위해 혈청 중 AST, ALT의 함량을 분석한 결과, ODT 투여군, FODT 투여군은 HFD군 대비 AST, ALT를 증가시키지 않았으며, 이를 통해 10주간의 200 mg/kg/day의 ODT 및 FODT의 투여는 간독성을 유발하지 않음을 확인하였다 (Fig. 9A and B).

신독성 평가를 위해 혈청 중 creatinine과 BUN 함량

을 분석한 결과, ODT 투여군, FODT 투여군은 HFD군 대비 creatinine과 BUN을 증가시키지 않았으며, 이를 통해 10주간의 200 mg/kg/day의 ODT 및 FODT의 투여는 신독성을 유발하지 않음을 확인하였다 (Fig. 9C and D).

따라서, ODT와 FODT의 체중 감소 효과는 모두 간독성 (Hepatic toxicity), 신독성 (Renal toxicity)에 의한 것이 아님이 확인되었다.

5. 혈중 지질 농도에 미치는 영향

혈중 지질학적 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위해 Triglyceride, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol 함량을 분석하였다. 정상군에 비하여 대조군의 Triglyceride 함량은 증가하였고, 대조군에 비해 ODT와 FODT 투여군은 변화가 없었다 (Fig. 10A).

정상군에 비해 대조군의 total cholesterol 양은 유의하게 증가하였으며, FODT 투여군에서 대조군에 비해 total cholesterol 양은 유의하게 감소하였다 (Fig. 10B).

대조군의 HDL은 정상군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으나, ODT 투여군과 FODT 투여군은 변화가 없었다 (Fig. 10C).

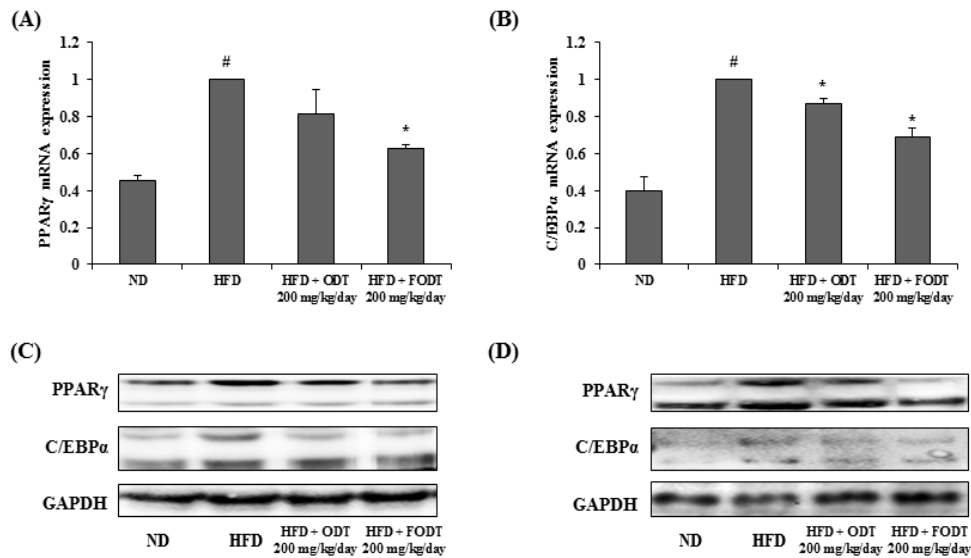


Fig. 8. Anti-adipogenic effect of gami-ondam-tang and fermented gami-ondam-tang on liver and epididymal white adipose tissue

(A), (B) The effects of Gami-ondam-tang (ODT) and Fermented Gami-ondam-tang (FODT) on the mRNA expression of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α) in liver were analyzed by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as endogenous control.

(C) The effects of ODT and FODT on the protein levels of PPAR γ and C/EBP α in liver were determined by western blot analyses. (D) The effects of ODT and FODT on the protein levels of PPAR γ and C/EBP α in epididymal white adipose tissue (eWAT) were determined by western blot analyses. GAPDH was used as loading control.

#: $P < 0.05$, significantly different from normal diet (ND).

*: $P < 0.05$, significantly different from high fat diet (HFD).

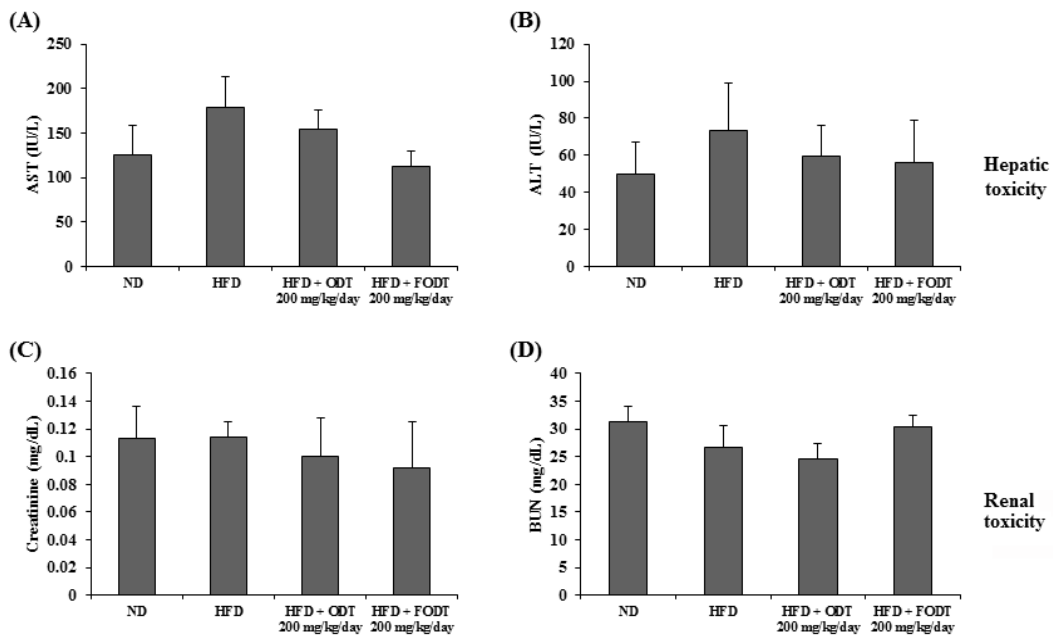


Fig. 9. Hepatic toxicity and renal toxicity of gami-ondam-tang and fermented gami-ondam-tang in the serum of high fat diet-induced mice

ND: Normal diet group, HFD: High fat diet, ODT: Gami-ondam-tang, FODT: Fermented gami-ondam-tang

대조군의 LDL은 정상군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으며, FODT 투여군에서 대조군에 비해 LDL은

유의하게 감소하였다(Fig. 10D).

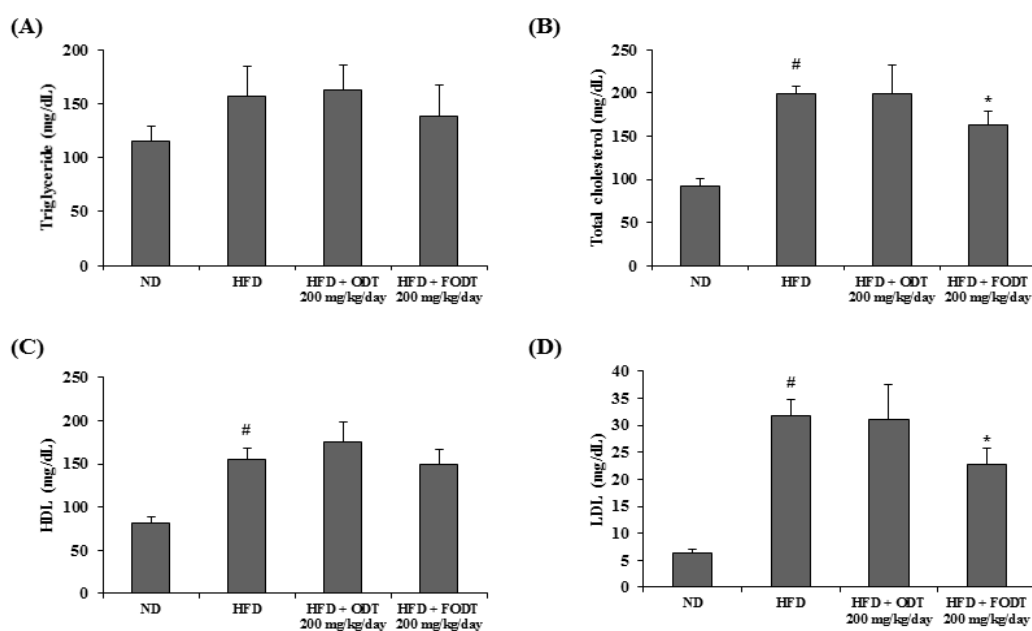


Fig. 10. Effects of gami-ondam-tang and fermented gami-ondam-tang in the serum of high fat diet-induced mice

ND: Normal diet group, HFD: High fat diet, ODT: Gami-ondam-tang, FODT: Fermented Gami-ondam-tang

[#]: $P < 0.05$, significantly different from the ND group.

^{*}: $P < 0.05$, significantly different from the HFD group.

IV. Discussion

비만은 섭취된 열량보다 소비가 부족하여 초래되는 에너지 불균형의 상태로, 대사장애로 인해 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 말한다¹⁾. 비만이 세계보건기구 질병코드에 포함된 지 불과 50여년이 지났지만, 전 세계적으로 사망과 장애의 중요한 원인이 되고 있으며 최근 우리나라에서도 유병률이 높아지고 있는 추세이다⁹⁾.

비만의 발생에는 유전이나 내분비 장애와 같은 요인 이외에도 운동부족, 과도한 열량 섭취 및 부적절한 식습관과 같은 행동요인과 스트레스 등의 심리적 요인이 영향을 미친다고 알려져 있으며, 대사증후군, 지질 대사 이상, 고혈압, 당뇨병, 심혈관질환, 당뇨병 및 당 대사 이상, 퇴행성 관절염, 불임, 수면 무호흡, 암, 식이 장애 등과도 연관되어 있다⁹⁾.

비만 치료는 식이요법과 운동요법, 장기적인 행동수정요법을 병행하는 것이 핵심이지만, 동시에 비만을 변증별, 유형별로 세분화하여 각 특성에 따른 장부 기능의 조절을 목표로 한 치료적 접근이 필요하다. 이를 위해, 부작용을 최소화하면서도 효과적인 치료 한약을

개발하는 것이 중요하다. 그 중, 소아비만은 치료가 어렵고, 소아의 자부심이 낮아지며, 적응 장애, 파도립, 우울, 섭식 장애 등 심리 사회적인 문제가 동반되기도 한다. 소아비만은 신체 이미지와 자아 존중감에 직접적으로 영향을 미치고 이는 직접적으로 혹은 간접적으로 우울/불안을 매개하여 삶의 질에 영향을 주는 것으로 파악되었다⁹⁾. 또한, 소아비만의 80%가 성인 비만으로 이행되며, 소아 청소년 비만으로 인한 동반 질환 역시 성인까지 지속될 수 있기 때문에 소아기에 비만을 예방하고 중재할 필요성이 있다⁴⁾.

이에 본 연구에서는 소아비만에 응용하기 위해 가미온담탕 전탕액과 발효액의 체중 증가 억제 효과 및 기전을 파악해보고자 실험을 시행하였다. 이를 통해 세포 수준에서 실험을 진행하여 세포독성과 지방세포 분화억제 효과를 관찰하는 *in vitro* 실험과 고지방식이 쥐에서 체중증가 억제 효과 및 지질 개선 효과 등을 살펴보는 *in vivo* 실험을 진행하였다.

본 연구에 사용한 가미온담탕 (ODT)은 온담탕에 소간이기 (疏肝解鬱)의 효능이 있는 시호 (柴胡)를 가하고 시호 (柴胡)와 상수 (相須)효과가 있는 황금 (黃芩)을 가하였으며 그 외 비만에 유효한 의이인 (薏苡仁), 상엽 (桑葉), 산수유 (山茱萸), 산약 (山藥), 황기 (黃芪),

황정 (黃精), 구기자 (枸杞子), 신곡 (神麴), 나복자 (蘿菔子), 저령 (猪苓), 택사 (澤瀉)를 가미하여 심리적인 스트레스를 동반한 소아의 비만에 응용하고자 하였다.

온담탕은 반하 (半夏), 진피 (陳皮), 백복령 (白茯苓), 지실 (枳實), 죽여 (竹茹), 감초 (甘草), 생강 (生薑), 대조 (大棗)로 이루어져 있는 방제로, 반하 (半夏)는 조습화담 (燥濕化痰), 강역화위 (降逆和胃)하는 효능, 진피 (陳皮)는 이기건비 (理氣健脾), 화중소체 (和中消滯) 하는 효능, 백복령 (白茯苓)은 이수삼습 (利水滲濕), 건비보중 (健脾補中), 영심안신 (寧心安神)하는 효능, 지실 (枳實)은 파기행담 (破氣行痰), 산적소비 (散積消痞) 등의 효능이 있으며, 죽여 (竹茹)는 청열화담 (清熱化痰), 강역화위 (降逆和胃) 하는 효능, 감초 (甘草)는 보비익기 (補脾益氣), 윤폐지해 (潤肺止咳), 완급지통 (緩急止痛), 청열해독 (清熱解毒) 하는 효능이 있다²⁰.

시호 (柴胡)는 소시호탕 (小柴胡湯)을 구성하는 주요 약물이다. 소시호탕은 비만 유발 쥐에서의 체중 감소 효과, 간 조직 내 지방의 면적 비율 감소, 부고환 지방조직에서의 중량감소, 혈청 total cholesterol 감소 등의 효과²¹가 있는 것으로 알려져 있으며, 소시호탕의 주요 약제인 황금 (黃芩)과 시호 (柴胡)가 상수 (相須) 효과를 일으켜 지방조직에서의 효과를 보여주는 기존 연구가 있다²¹. 의이인 (薏苡仁)은 이수삼습 (利水滲濕), 건비지사 (健脾止瀉) 등의 효능을 가진 약제로 신경내분비계의 조절을 통한 식이 억제를 하며, 지방세포 크기 감소, 간 조직 내 지질 침착 감소 및 간 기능 개선 효과, 고인슐린 개선, 혈청 지질 개선 효능이 있으며, 비만 치료에 있어서 빈용되는 약물로 체감의이인탕, 태음조위탕, 조위승정탕에 다용된다^{20,22-24}.

상엽 (桑葉)은 인슐린 저항성 및 지방세포 염증에 미치는 효과, 항비만 효과가 있다는 기존 연구가 있고²⁵, 산수유 (山茱萸)는 항당뇨 및 항산화 효과가 있으며²⁶ 산약 (山藥)은 혈당강하 효과가 있다고 알려져 있다²⁷. 박²⁸은 이를 종합하여 상엽 (桑葉), 산수유 (山茱萸), 산약 (山藥), 지각 (枳殼) 혼합 추출물이 체중증가 억제 효과 및 지방세포 분화억제 효과가 있음을 확인하였다.

본 연구에서는 ODT와 FODT의 세포독성과 분화를 확인하는 과정에서 3T3-L1 세포와 hAMSCs 세포를 사용하였다. 3T3-L1 cell은 쥐 배아의 섬유아세포로부터 유래된 지방전구 세포로 *in vivo* 지방전구세포에서의 분화 과정과 유사성이 있어 지방 세포 생성 (adipogenesis)와 관련된 연구에 널리 활용된다^{29,30}. ODT와 FODT를 인간에게 적용하여 항비만 효과가 있는지 세

포 수준에서 확인해보기 위해 *in vitro* 실험에 hAMSCs를 사용하였다. hAMSCs는 다분화능을 가진 세포로 특정한 환경에서 지방세포로 분화할 수 있으며, 인간의 지방 세포 생성 (adipogenesis)를 연구하는데 있어서 적절한 *in vitro* 모델로 활용되고 있다³¹.

지방세포 분화억제 효과를 알아보기 위해 3T3-L1 지방전구세포와 hAMSCs에 ODT와 FODT를 처리하고 Oil-Red-O 측정을 한 결과 FODT 200 $\mu\text{g/ml}$ 와 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 지방세포 분화를 억제함을 관찰할 수 있었다. 이를 통해 FODT가 지방세포 분화억제를 통해 지방축적을 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

지방전구세포에서 지방세포로 분화를 초래하기 위해서는 지방생성과 연관된 특정 유전자와 단백질의 영향을 받는다. 지방세포 분화 과정에서 C/EBP β 는 즉시 발현되는데 주요 전사 인자로서 핵심 역할을 하는 C/EBP α , PPAR γ 와 같은 두 가지 주요 지방 생성 관련 인자의 발현을 필요로 한다^{32,33}. PPAR γ 는 지방세포의 형성과 연관되어 있으며³⁴, C/EBP α 는 지방세포의 분화를 촉진하는데³⁵, C/EBP α 의 발현은 여러 표적 유전자의 하류에서 양성 피드백 루프와 트랜스 활성화를 통해 PPAR γ 와 교차 조절된다³⁶.

AMPK는 세 개의 서브 유닛 (α , β , γ)으로 구성된 이중 삼량체 (heterotrimeric) 복합체이며 에너지 항상성을 조절하는 일종의 serine/threonine protein kinase³⁷로 항비만효과를 일으키는 주요한 조절인자이다³⁴. AMPK의 인산화는 스트레스와 기아 기간 동안 생존에 중요하며 제 2형 당뇨병, 비만, 대사 증후군, 수명 및 암에도 영향을 미친다³⁸. 여러 연구에 따르면 AMPK의 인산화는 지방전구세포 분화를 억제하고 지방 세포 생성 (adipogenesis)를 일으키는 PPAR γ 및 C / EBPa와 같은 전사 인자를 억제한다³⁷.

본 연구에서는 ODT와 FODT가 지방세포 분화조절인자인 PPAR γ , C/EBP α , AMPK의 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위해 유전자 발현 및 단백질 발현 정도를 관찰하였다. 실험결과, FODT 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 PPAR γ 억제 효과가 있었으며, ODT 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도와 FODT 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의하게 C/EBP α 발현 억제 효과가 있었다. Western blot analysis를 통해 측정된 결과 단백질 수준에서도 PPAR γ 와 C/EBP α 발현 억제효과를 확인할 수 있었다. 또한, 이 결과를 통해 발효액이 전탕액에 비해 같은 농도에서 더 좋은 효과를 나타냄이 확인되었다.

ODT와 FODT는 AMPK α 의 전체 발현량은 변화시

키지 않으면서 AMPK α 의 인산화를 유도함으로써 AMPK α 를 활성화 시켰다. PPAR γ , C/EBP α 의 결과와 동일하게 AMPK α 의 활성화도 발효 한약에서 더 강하게 유도되었다. 이러한 결과를 종합해 보았을 때, ODT와 FODT는 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 과정을 억제하며, 이는 AMPK α 의 활성화, PPAR γ 와 C/EBP α 발현 억제와 관련이 있는 것으로 사료된다.

세포 실험의 결과를 동물모델에서 확인하기 위해 고지방식이로 비만을 유도한 쥐 모델을 사용하였다. 이 모델은 현재 사용되는 항비만 모델 중 가장 안정된 동물 실험모델로서 많은 항비만 연구에서 체중 감소 효과를 확인하기 위해 사용되는 모델이다³⁹⁾. 총 10 주간의 HFD의 투여를 통해 HFD군이 ND군에 비해 유의한 체중 증가가 유도되었음이 확인되었으며, 이는 본 실험의 항비만 동물모델이 효과적으로 설계되었음을 보여준다. 10 주간의 FODT투여는 HFD군에 비해 유의하게 체중 증가를 억제했음이 확인되었다. 반면 ODT의 투여는 HFD에 의한 체중증가를 효과적으로 억제하지 못했는데, 이는 세포 실험의 결과와 일치된 경향을 보여준다. 총 10 주간의 약물 투여 종료 후, 조직 내 지질 축적량을 확인하기 위해 간 및 부고환 지방을 적출하였다. Fig. 6C에서 보이는 것처럼 간 무게는 대조군에 비해 HFD + ODT, HFD + FODT 두 군 모두에서 유의하게 감소하였으나, FODT의 투여만이 부고환 백색지방조직의 무게를 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다.

간조직과 부고환 백색지방조직의 병리조직학적 분석을 시행해 본 결과, HFD + ODT군과 HFD + FODT군은 대조군과 비교하여 지방증과 공포변성이 개선되었으며, 부고환 백색지방조직에서는 약물 투여군이 대조군에 비해 지방세포 크기가 감소했음을 관찰할 수 있었다. 이는 FODT의 체중증가 억제가 지방세포 크기에도 영향을 미치는 것으로 해석할 수 있으며, 비록 ODT가 체중 감소에는 큰 효과가 없었으나 경증 비만 환자에게 사용 시 지방간의 개선을 기대해볼 수 있다.

간과 부고환 백색지방조직에서 ODT와 FODT가 지방세포 분화조절인자 유전자와 단백질 발현에 미치는 영향을 살펴보았을 때, 간의 PPAR γ mRNA 발현은 HFD + FODT군에서 유의하게 감소하였고, HFD + ODT, HFD + FODT군에서 C/EBP α mRNA 발현이 유의하게 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다. Western blot analysis를 통해 측정된 결과 단백질 수준에서도 간과 부고환 백색지방조직의 PPAR γ 와 C/EBP α 발현 억

제 효과를 확인할 수 있었다. 이를 종합해 볼 때, ODT와 FODT가 지방분화조절인자 발현 억제를 통해 지방 축적 억제, 지방세포의 크기 감소, 체중 증가 억제에 관련되어 있는 것으로 사료된다.

중성지방은 지방산이 에스테르화된 물질로 고에너지의 대사연료이며 에너지 저장의 가장 유용한 형태이다. 콜레스테롤은 세포막의 구성성분이며 담즙산, 비타민 D, 스테로이드의 전구체로⁴⁰⁾, 에스테르 형태의 콜레스테롤과 중성지방은 무극성이기 때문에 아포지단백과 결합하여 지단백 형태로 혈장에서 이동한다. 비만 환자에서의 이상지질혈증은 혈중 triglyceride가 높고, HDL cholesterol이 낮은 특징이 나타나는데⁴¹⁾, 비만인 어린이와 청소년에서 평균 혈청콜레스테롤 및 triglyceride와 LDL cholesterol은 증가되는 경향이 있다⁴²⁾.

혈중 지질학적 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위해 Triglyceride, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol 함량을 분석하였을 때 ODT는 혈중 지질 농도 개선에 통계적으로 유의한 결과를 보여주지 못했다. 반면, FODT 투여군에서 대조군에 비해 total cholesterol 양과 LDL cholesterol이 유의하게 감소하였다. 이를 통해 ODT보다 FODT에서 더 높은 항비만 효과가 있음을 확인하였다.

실험결과를 종합해 보면, FODT가 ODT에 비해 효과가 좋은 것으로 나타났는데, 이는 김¹⁶⁾과 장⁴³⁾의 연구에서 비만세포에서의 한약 전탕액과 발효액의 효과를 비교했을 때 전탕액에 비해 한약 발효액에서 항비만 효과가 더 뛰어났던 것과 결과가 일치한다. 섭취하는 음식 중 어떤 유효성분들은 실험실에서 측정하면 활성이 없으나 경구 투여시 장내 미생물들의 전환으로 생리적인 기능을 나타내기도 한다⁴⁴⁾. 이와 같은 원리로 FODT는 ODT의 발효로 인해 유효성분의 흡수율이 높아지고 활성도가 증가되어 항비만 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서 ODT와 FODT는 지방세포 분화인자 억제 효과와 체중 증가 억제 효과가 있었으며, 간 조직에서 지질 축적 및 지방산 대사 유전자들을 조절하여 체중 및 체지방을 억제시켰다. 이러한 결과는 비만에 대한 가미온담당의 활용 가능성을 제시해준다. 다만, 이 연구는 세포 실험과 동물 실험에서 제한적으로 진행된 연구이고, 가미온담탕 전탕액이 혈중 지질 농도 개선에 뚜렷한 효과가 없는 것으로 확인되어 아쉬움이 있다. 또한, 비만으로 유발된 우울증, 스트레스 개선에 대한 실험 설계가 이루어지지 못하였다. 임

상에 활용하기 위해서는 비만의 치료가 세분화됨에 따라 성별, 연령에 따른 선택적인 심화 연구가 필요하다. 심리적인 스트레스를 동반한 비만에 활용하기 위해선 우울증 유발 쥐 모델 실험을 포함한 동물 실험 설계가 추가로 이루어져야 한다. 그리고, 개별 약물의 유효 성분과 작용기전에 대한 후속 연구와 함께 이를 바탕으로 한 임상적 연구가 시행되길 기대한다.

V. Conclusion

가미온담탕 전탕액 (ODT)과 발효액 (FODT)의 고지방 식이 비만쥐에 대한 항비만효과를 입증하기 위하여 지방세포 분화억제 정도와 지방세포 분화조절인자 관련 유전자 및 단백질의 발현, 체중변화, 혈중지질 농도의 변화에 대해 비교 분석하고, ODT와 FODT의 간기능, 신기능에 대한 영향을 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 3T3-L1 지방전구세포와 hAMSCs를 이용하여 분석한 결과 ODT와 FODT는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 3T3-L1 지방전구세포와 hAMSCs에 각각 ODT와 FODT를 처리하여 분화억제 정도를 측정된 결과, FODT 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의하게 지방세포 분화억제 효과를 나타냈다.
3. 지방세포 분화조절인자 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보았을 때 FODT 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 PPAR γ 억제 효과가 있었으며, ODT 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FODT 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 C/EBP α 에 대해 유의하게 발현 억제 효과를 나타냈으며, 단백질 level에서도 억제 효과를 나타냈다.
4. HFD + FODT군은 HFD군에 비해 유의하게 체중 증가 억제 효과가 있었다.
5. FODT 투여군에서 간 무게와 부고환 지방 조직의 무게 역시 대조군에 비해 유의하게 감소되었고, ODT 투여군에서 간 무게가 감소했다.

6. ODT와 FODT 투여군의 병리조직학적 분석 결과, 간 조직과 부고환 지방조직에서 지방축적이 개선되었다.
7. ODT와 FODT 모두 간독성, 신독성은 보이지 않았다.
8. FODT 투여군에서 고지방식으로 증가된 실험동물의 혈청 내 total cholesterol, LDL cholesterol 수치를 유의하게 감소시켰다.
9. FODT는 ODT에 비해 더 높은 비만 억제효과를 보였다.

VI. Acknowledgement

본 연구는 2024학년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행됨

VII. References

1. Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's principles of internal medicine. 19th ed. vol 2. New York: McGraw Hill education. 2015:2392.
2. Korean Statistical Information Service [Internet]. Daejeon: Statistics Korea (KR); 2021 [updated 2020 Feb 11; cited 2021 May 28]. Available from: http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=117&tblId=DT_11702_N101&conn_path=I2
3. Korean Statistical Information Service [Internet]. Daejeon: Statistics Korea (KR); 2021 [updated 2020 Feb 12; cited 2021 May 28]. Available from: http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=117&tblId=DT_117_12_Y027&conn_path=I2
4. An HS. Hong Chang Eui Pediatrics. 10th ed. Seoul: Daehan textbook Co. Ltd. 2014. 97-103 p.
5. Jeong SJ, Recommendations of pharmacological treatment in childhood and adolescents obesity. Pediatr

- Gastroenterol Hepatol Nutr. 2009;12(1):118-126.
6. Hwang MJ, Shin HD, Song MY. Literature review of herbal medicines on treatment of obesity Since 2000 - mainly about Ephedra Herba. J Korean Med Obes Res. 2007;7(1):39-54.
 7. Song YK, Lim HH. Clinical application of Ma Huang in the obesity treatment. J Korean Med Obes Res. 2007; 7(1):1-7.
 8. Department of Pediatrics, Nationwide Korean Medicine College. Pediatrics of Korean medicine. Seoul: Ui Sung Dang Publishing Co. 2020:973-96.
 9. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean rehabilitation medicine. 4th ed. Paju: Koonja Publishing. 2015:299, 303-6, 310-1.
 10. Chen Y, Sanyinjiyibingzhengfanglun. Beijing:People's Medical Publishing House. 2007:197.
 11. Yoon YG. Donguibangjewacheobanghaeseol. Seoul: Ui Sung Dang Publishing Co. 2007:385-6.
 12. Baek IS, park CG, Park CS, Lee SY, Yoon HD, Shin WC. An experimental study of effect on ECV 304 cells, platelet rich plasma and rats treated with L-NAME by Ondamtang extract. J Herb Formula Sci. 2004;12(2): 175-202.
 13. Kim KS, Jeun SY, Ann JJ, Hong S, Jeung SM. Study on hyperlipidemic effect of kamiondamtang. J Herb Formula Sci. 2005;13(1):85-101.
 14. Lee SY, Ryu HY. Effects of Ondamtang, Samulansintang and Shihosogansan water extract on the obesity and stress. J Orient Neuropsychiatry. 1992;3(1):25-45.
 15. Jung YJ, Han DO, Choi BH, Park C, Lee HJ, Kim SH, Hahm DH. Effect of fermented herbal extracts, HP-1 on enzyme activities and gene expressions related to alcohol metabolism in ethanol-loaded rats. J Physiol Pathol Korean Med. 2007;21(2):387-391.
 16. Kim JH, Park EJ. The antiobese effects of Gamikwakhyangjungkisan and fermented GamiKwakhyangjungkisan in preadipocytes and mice fed high fat diet. J Pediatr Korean Med. 2015;29(2):37-48.
 17. Park JH, Kim HJ, Lee MJ. The role of gut microbiota in obesity and utilization of fermented herbal extracts. J Korean Med Obes Res. 2009;9(1):1-14.
 18. Ley RE, Backhed F, Tumbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(31):11070-5.
 19. Yon JK, Jo EJ, Hyu JH, Hyun C, Dai JK. Impact of obesity on health-related quality of life among children. Korean J Biol Psychiatry. 2015;22(3):128-34.
 20. Sin MG. Clinical Traditional Herbalogy. Seoul: Young Lim Sa Publishing Co.; 2006. 172, 194-7, 260-1, 470, 482, 582-3, 587-8, 650, 654-7, 758, 820 p.
 21. Park HW. Study on interaction between scutellariae radix and bupleuri radix in 3T3-L1 adipocytes [master's thesis]. [Seoul]:Kyunghee University; 2016. 22p.
 22. Kim SO, Yun SJ, Lee EH. The water extract of Adlay Seed (*Coix lachrymajobi* var. *mayuen*) exhibits anti-obesity effect through neuroendocrine modulation. Am J Chin Med. 2007;35(2):297-308.
 23. Song MY, Jung HW, Park YK. Antiobesity effect of water extract of *Coix lachrymajobi* var. *mayuen* in high fat fed C5BL/6 Mice. J Korean Med Obes Res. 2016; 16(1):27-35.
 24. Hwang MJ, Shin HD, Song MY. Review of literature on herbal medicines for the treatment of obesity in Korea-mainly papers since 2000. J Oriental Rehab Med. 2006;16(3):65-81.
 25. Ma YH, Kim HJ, Han YH. The Effects of Mori folium on insulin resistance and adipose tissue inflammation in an experimental mouse model of obesity. J Intern Korean Med. 2016;37(4):609-623.
 26. Kim OK. Antidiabetic and antioxidative effects of Corni fructus In Streptozotocin-Induced diabetic rats. J Korean Appl Sci Technol. 2005;22(2):157-67.
 27. Cho SI, Son MW, Hong KE. Glycemic control effects of Sanyak (*Dioscoreae rhizoma*) extract in prediabetic stage patients. J Korean Med. 2010;31(5):146-66.
 28. Park JI, Kang KH, Park EJ. The study on anti-obesity effects of Mulberry Leaves contained herbal mixture. J Pediatr Korean Med. 2013;27(4):17-30.
 29. MacDouglaod OA, Hwang C, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(20):9034-7.
 30. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. Cell. 1975;5(1):19-27.
 31. Park JR, Jung JW, Seo MS, Kang SK, Lee YS, Kang

- KS. DNER modulates adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via regulation of cell proliferation. *Cell Prolif.* 2010;43:19-28.
32. Lee H, Bae S, Kim YS, Yoon Y. WNT/b-catenin pathway mediates the anti-adipogenic effect of platycodin D, a natural compound found in *Platycodon grandiflorum*. *Life Sci.* 2011;89(11-12):388-94.
33. Kim HL, Sim JE, Choi HM, Choi IY, Jeong MY, Park J, Jung Y, Youn DH, Cho JH, Kim JH, Hwang MW, Jin JS, Hong SH, Cho HW, Um JY. The AMPK pathway mediates an anti-adipogenic effect of fruits of *Hovenia dulcis* Thunb. *Food Funct.* 2014;5(11):2961-8.
34. Hwang JT, Lee MS, Kim HJ, Sung MJ, Kim HY, Kim MS, Kwon DY. Antiobesity effect of Ginsenoside RG3 involves the AMPK and PPAR- γ signal pathways. *Phytother Res.* 2009;23(2):262-6.
35. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 1998;273(46):30057-60.
36. Tzeng TF, Chang CJ, Liu IM. 6-Gingerol inhibits rosiglitazone-induced adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res.* 2014;28(2):187-92.
37. Lowell BB. An essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function: PPAR γ . *Cell.* 1999;99(3):239-42.
38. Kang SW, Kang SI, Shin HS, Yoon SA, Kim JH, Ko HC, Kim SJ. Sasa quelpaertensis Nakai extract and its constituent p-coumaric acid inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells through activation of the AMPK pathway. *Food Chem Toxicol.* 2013;59:380-5.
39. Lee JS, Kim KJ, Kim YH, Kim DB, Shin GH, Cho JH, Kim BK, Lee BY, Lee OH. *Codonopsis lanceolata* extract prevents diet-induced obesity in C57BL/6 Mice. *Nutrients.* 2014;6(11):4663-77.
40. Korean society for laboratory medicine. *Laboratory Medicine.* Seoul: Epublic Publishing Co. 2011:307.
41. Kim JW, Lee SY. Obesity and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C): The recent related research trend including new generation drugs for HDL-C. *Korean J Obes.* 2013;22(2):67-72.
42. Friedland O, Nemet D, Gorodnitsky N, Wolach B, Eliakim A. Obesity and lipid profiles in children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002;15(7):1011-6.
43. Chang SJ, Min DL, Park EJ. The study on anti-obesity effects of Gamiygin-tang extract and ferment. *J Pediatr Korean Med.* 2013;27(4):108-21.
44. Park JH, Kim HJ, Lee MJ. The role of microbiota in obesity and utilization of fermented herbal extracts. *J Korean Med Obes Res.* 2009;9(1):1-14.