

赤小豆 外皮(Phaseolus angularis shell)의 고지방식이로 유도된 비만 동물모델에서 항비만, 항고지혈증 효과

곽진영¹ · 박정환¹ · 고영미¹ · 박정미² · 안택원^{1*}

¹대전대학교 한의과대학 사상체질의학교실, ²대전대학교 천안한방병원 웰니스임상센터

Abstract

The Effect of Phaseolus Angularis Shell on Soyang-in Metabolic Syndrome with Obesity

Jin-young Kwak¹ · Jung-Hwan Park¹ · Young-mee Koh¹ · Jung-mi Park² · Taek-Won Ahn^{1*}

¹Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University,

²Cheonan Hospital Wellness Clinical Center of Daejeon University

Objectives

This experimental study was designed to investigate the effect of Phaseolus angularis shell on metabolic syndrome.

Methods

Each 5 C57BL/6J mice were randomly assigned to normal diet group, high-fat diet(HFD) control group, high-fat diet plus 15.6 mg/kg/day of Orlistat(HFD-Orlistat) group, high-fat diet plus 100mg/kg/day of Phaseolus angularis shell extract(HFD-PAS_E) group. Weight, the blood chemical and hematologic parameter was med. The mRNA expression was assayed through Reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR).

Results

In HFD-PAS_E group, the body weight gain, weight of liver, and the level of LDL-Cholesterol were significantly decreased and the level of HDL-Cholesterol were significantly increased. The size of adipocyte in HFD-PAS_E group was smaller than HFD group's. In HFD-PAS_E group, the expression of leptin, PPAR- γ , AP2/FABP4 mRNA in liver adipocyte tissue was decreased, the expression of Adiponectin, UCP-2 mRNA in liver adipocyte tissue was increased and the expression of Leptin, C/EBP-a, AP2/FABP4 mRNA in epididymal adipocyte tissue was decreased.

Conclusion

These results suggest that Phaseolus angularis shell has inhibitory effects on metabolic syndrome by reducing the body weight and the levels of lipid contents in high-fat-diet induced obese mice.

Key Words: Phaseolus angularis shell, Metabolic syndrome, Anti-obesity, anti-diabetic, Soyang-in

Received May 29, 2017 Revised June 05, 2017 Accepted June 16, 2017

Corresponding author Taek-Won Ahn

Doojeong-dong 621, Seobuk-gu, Cheonan city, Chungcheongnamdo, 331-958, Korea
wellness clinical center, Cheonan oriental hospital of Daejeon University
Tel: +82-41-521-7535 Fax: +82-41-521-7007 E-mail: twahn@dju.kr

© The Society of Sasang Constitutional 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/>)

I. 緒論

비만은 체지방이 과도하게 축적된 상태로 여성은 30% 이상, 남성은 체지방량이 체중의 25% 이상인 경우로 정의한다. 대사증후군은 비만, 내당능장애(공복 혈당이 100mg/dL보다 높은 상태), 고지혈증, 고혈압 등 동맥경화의 위험인자들을 총괄하는 질환명으로 그 중에서 비만이 대사증후군의 중심적 요소로 작용한다^{1,2}.

최근 서구화된 생활과 운동부족으로 대사증후군을 가진 사람들이 늘어나고 있다. 2014년 국민건강통계에 따르면 만19세 이상 성인의 비만유병률은 2005년 31.4%로 급격하게 증가한 후 2014년 30.9%로 계속 높은 비만 유병률을 유지하고 있다. 고혈압은 25.5%, 당뇨병은 10.2%, 고콜레스테롤혈증은 14.6%의 유병율을 보이고 만 30세 이상 성인 2명 중 1명은 비만, 고혈압, 당뇨, 고콜레스테롤혈증 중 한가지 이상을 앓고 있다고 보고되었다³.

서양의학에서는 비만치료를 식욕억제, 운동요법, 약물요법과 위절제술, 위밴드 삽입술과 같은 수술요법을 사용하고 있다. 그러나 수술은 통증, 감염, 폐쇄 합병증, 소화장애와 같은 부작용을 동반하고^{4,5} 약물요법에 주로 사용되는 Orlistat은 소화기관련 증상과 불안, 우울감같은 신경학적 증상을 유발한다는 보고가 있어 이를 대체할 수 있는 한방치료의 필요성이 높아지고 있다⁶.

한의학에서는 비만을 肥, 肥人, 肥貴人, 肥胖이라고 부르며⁷ 비만의 원인을 내적요인과 외적요인으로 분류하였다. 외적요인으로는 활동 감소, 外感濕邪, 기름진 음식의 과잉섭취, 先天稟賦 등이 있다. 내적요인으로는 脾虛濕阻, 胃熱濕阻, 肝鬱痰滯, 氣滯血瘀, 脾腎陽虛, 肝腎陰虛 등이 있어 建脾利濕, 清熱利濕, 疏肝利氣, 除痰利濕, 行氣活血, 溫陽利水, 滋養肝腎 등의 치법을 사용한다⁸.

이제마의 동의수세보원⁹에서는 사람을 성질재간, 용모사기, 체형기상, 소증에 따라 태양인, 소양인, 소음인, 태음인으로 분류하여 모든 질병의 원인과 치법

이 체질별로 다르다고 설명하고 있다. 사상체질에서의 비만 치료는 체질별 장부대소와 성정의 태과를 줄이기 위해 이루어지는데 개인별 맞춤 의학이 각광을 받으면서 문¹⁰, 류¹¹ 등의 연구처럼 체질별 비만과의 상관관계와 치료법에 대해 활발한 연구가 이루어지고 있다. 최근의 연구에 따르면 태양인은 大頭足小한 체형으로 머리가 크고 하체가 빈약하여 상체 비만이 생기기 쉽고 태음인은 頭足俱小, 脇肋厚大하고 체격이 크며 비대한 사람이 많고 肝大肺小하여 呼散之氣가 吸聚之氣보다 약하여 비만이 발생한다고 보고된다. 소양인은 흥부는 발달하고 하체는 약한 체형으로 脾大腎小하여 흡수보다 배설기능이 약해져 비만해지기 쉽고 소음인은 어깨가 좁고 골반이 발달하며 腎大脾小하여서 국소적 하체비만이 자주 발생¹¹하여 태음인은 解鬱補陰除風濕, 소양인은 解鬱解表利水消腫, 소음인은 通氣行滯 위주의 치료법을 사용하는 것이 좋다고 보고되었다¹². 그러나 체질별 비만연구는 송¹³ 등의 논문처럼 주로 태음인에게 초점이 맞춰 이루어졌고 다른 체질에게 맞는 한방 비만치료제에 대해서는 체계적으로 연구된 적이 없었다. 동의수세보원에 따르면 태음인을 제외한 다른 체질 중 소양인은 전체인구의 30%로 2번째로 많은 비중을 차지한다⁹. 김¹⁴ 등의 논문처럼 소양인은 脾大腎小하여 위장의 소화, 흡수 기능은 뛰어나지만 신장의 생식, 배설 기능이 약하고 식욕이 항진되어 있으며 식사 속도가 빨라 비만해지기 쉬운 체질로 보고되고 있어 소양인에 대한 체계적 비만치료 연구가 필요한 상황이다.

본 연구에서는 그 동안 간과되고 있던 소양인에게 맞는 한방 비만 및 대사증후군 치료제 개발을 위해 비만의 주요 치법인 利水消腫 효과가 있으면서 赤小豆보다 anthocyanin, saponin 및 식물성 섬유가 많이 함유되어 장운동과 배변활동을 촉진시키는 소양인에 좋은 赤小豆 外皮¹⁵가 비만과 대사증후군에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

II. 研究對象 및 方法

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 팥껍질(*Phaseolus angularis* shell extract, 이하 PAS_E)은 대표적 한약공급업체인 옴니허브(<http://www.omniherb.com>, Korea)에서 구입하였으며, 200g 정량 후 1.5 l의 80%에탄올에 30분 동안 sonication 하였다. 3mm 여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과한 후, 여과된 에탄올 추출물은 감압농축기(Eyela, Japan)를 이용하여 농축한 후, 동결 건조(Freeze-dryer, Matsushita, Japan)하여 얻은 분말을 70°C 초저온냉동고에 보관 사용하였다.

2. 연구방법

1) 비만 유발 동물 모델

C57bl/6 마우스 수컷을 대한바이오링크(Eumseong, Korea)로부터 분양하여 사용하였다. 분양 받은 6주령 실험동물은 2주동안 물과 기본사료(AIN-76A diet)를 자유롭게 공급하여 실험실 환경에 적응시킨 후, 약 23.0±1.0 g의 8주령 마우스를 1주간 항습(50±5%), 항온(25±2°C) 및 07:00~19:00에 불을 켜서 12시간 간격 광주기로 명암이 조절되는 SPF 환경에서 유지하며 약 1주동안 고지방사료(HFD)를 공급하여 체중이 약 28.0±1.0 g에 도달하도록 한 뒤 실험을 진행하였다.

실험동물은 6마리씩 분리하여 사육하였으며, 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 그리고 효율적인 관리와 동물실험의 윤리성, 과학적 타당성 검토를 위하여 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee), 대전대학교의 동물실험윤리위원회에서 승인(승인번호:DJUAR2016-015)을 받았다.

2) 실험군 구성 및 실험 설계

C57bl/6 마우스를 9주령부터 기본식이섭취군(Normal diet, ND군), 비만대조군인 Diet Induced Obesity Diet Formulas (D12451 & D12492) 60kcal% HFD식이섭취군(High-fat diet, HFD군), 실험군인 Diet Induced Obesity Diet Formulas(D12451 & D12492) 60kcal% HFD식이와 赤小豆 外皮 추출물 100mg/kg 투여군(High-fat diet plus 100mg/kg/day of Phaseolus angularis shell extract, HFD-PAS_E군), 양성대조군인 Diet Induced Obesity Diet Formulas(D12451 & D12492) 60kcal% HFD식이와 Orlistat 15.6mg/kg 투여군(High-fat diet plus 15.6 mg/kg/day of Orlistat, HFD-Orlistat군)으로 나누어 7주간 식이를 투여하였다(Table 1). ND군을 제외한 나머지 군은 7주간 60kcal% HFD식이를 투여하여 비만을 유발시켰다. 군은 PAS-E 추출물을 생리식염수에 현탁시켜 매일 오전 10시~11시와 16시~17시에 각각 0.2ml씩 나누어 경구투여 하였다(Figure 1).

Table 1. Diet Induced Obesity Diet Formulas (D12492) 60 kcal% fat.

	gm	Kcal
Protein	26.2	20
Carbohydrate	26.3	20
Fat	34.9	60
Total	5.24	100
	gm	Kcal
Casein, 80 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	0	0
Maltodextrin 10	125	500
Sucrose	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard	245	2205
Mineral Mix, S10026	10	0
Dicalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0
Vitamine Mix, V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Blue Dye#1	0.05	0
Total	773.85	4057

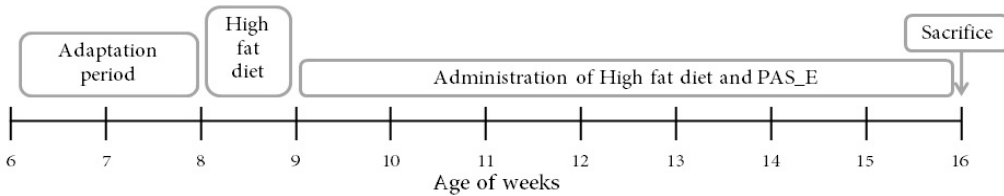


Figure 1. Experimental plan of obesity animal model induced by high fat diet.

3. 관찰 및 검사

1) 체중, 식이섭취량과 식이효율

7주간 매주 수요일 9시 일정한 시간에 식이섭취량, 체중을 측정하고 기록하였다. 식이효율은 $FER = [\text{Total weight gain} / \text{Total food intake}] \times 100$ 의 공식에 따라 산출하였다.

2) 지방조직 중량 측정

PAS_E를 7주간 투여 후 각 실험동물을 복부 피하지방 (abdominal subcutaneous fat), 부고환주변 지방조직 (epididymal adipose tissue), 그리고 신장주변 지방조직 (perirenal adipose tissue), 창자주변 지방조직 (intestinal adipose tissue)로 구분하여 적출 후 지방조직의 중량을 산출하였다.

3) 혈액생화학 검사

PAS_E를 7주간 투여 후 16시간 동안 절식시킨 뒤 심장천자법으로 채혈하여 30분 이내에 3,000rpm, 4°C에서 15분동안 원심분리하여 혈청 (serum)을 분리한 뒤 -70°C에 보관하였다가 혈액생화학적 검사를 실시하여 분석하였다.

(1) 혈중 지질생화학적 분석

ALT(Alanine aminotransferase), AST(Aspartate aminotransferase), ALP(Alkaline phosphatase), LDH(Lactate dehydrogenase), 총콜레스테롤, LDL(Low-density lipoprotein)-콜레스테롤, HDL(High-density lipoprotein)-콜레스테롤, FFA, 혈당의 함량을 생화학 자동 분석기

(Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 사용하여 측정하였다.

(2) 혈중 Adiponectin 분석

각 항체를 코팅 완충용액에 희석하여 마이크로웰에 코팅한 후 4°C에서 밤새 방치했다. 각 웰을 3회 세척 완충용액으로 세척한 후, 혈청 (10배 희석)을 100 μl씩 분주하고, 60분간 실온에서 방치한 후 세척 완충용액으로 2회 세척했다. 그 후, 항체 아비딘-HRP 접합체 100 μl를 처리한 후 60분간 실온에서 방치하고 다시 세척했다. TMB 기질을 100 μl씩 분주하여 암소에서 30분간 방치한 후 50 μl의 스톱 용액을 처리하고, ELISA 판독기로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정했다.

4) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통한 유전자 발현 측정

PAS_E를 7주간 투여 한 후 각 실험동물에서 적출한 간과 부고환주변 지방조직의 유전자 발현 양상을 real-time PCR 증폭법을 이용하여 알아보았다. 간(liver)과 부고환주변 지방조직(epididymal adipose tissue)은 RNAsolB(Tel-Test) 용액을 이용하여 조직에서 RNA를 추출한 후 One-step SYBR Green PCR kit(AB science)를 이용하여 cDNA와 real-time PCR 분석 하였다.

간과 부고환주변 지방조직에 RNAsolB 500 μl를 넣고 조직을 homogenizer로 분쇄하고 chloroform (CHCl3) 50 μl를 첨가하여 15초간 다시 혼합하였다. 이후 얼음에 15 분간 방치하고서 13,000 rpm에서 원심 분리한 뒤 상층액(약 200 μl)을 회수하여 200 μl의

2-propanol와 동량 혼합 후에 천천히 흔들고서 얼음에 15 분간 방치하였다. 이것을 다시 13,000rpm에서 원심 분리하여 80% EtOH로 수세하고서 3분동안 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다.

추출한 RNA를 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리한 증류수(20 μ l)에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시키고 first strand cDNA를 합성하는데 사용하였다. 역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 DNase I (10U/ μ l) 2U/tube를 37°C heating block에서 30동안 반응시키고 난 뒤에 75°C에서 10분 동안 변성시켰다. 여기에 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor(20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT를 가한 후에, 1 μ l의 M-MLV RT(200 U/ μ l)를 다시 가하고서 DEPC 처리된 증류수로 최종부피가 20 μ l가 되도록 했다. 이 20 μ l의 반응혼합액을 섞은 후 2,000 rpm에서 5동안 원심침강하여 37°C heating block에서 45분간 반응시켜서 first-strand cDNA를 합성한 후, 95°C에서 5분간 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시켜 합성이 완료된

cDNA를 PCR(polymerase chain reaction)에 사용하였다. Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 Real time quantitative PCR을 수행하였다.

Internal standard를 Mouse GAPDH probe set; Endogenous Control(VIC/MGB Probe, Probe limited) from Applied Biosystems (4352339E)를 사용하였다. 유전자 발현에는 TaqMan probe(FAM dye-labeled, ABI, USA)를 이용하였고, primer의 최종 농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR은 pre-denaturation을 50 °C에서 2 min, 94 °C에서 10 min, 그리고 40 cycles을 95 °C에서 0.15 min, 45 °C에서 1 min의 조건으로 수행하였다. 대조군과 실험군은 internal standard로 G3PDH를 이용하여 target group의 Quantitative PCR

$$y = x(1+e)^n$$

$$x = \text{starting quantity}$$

$$y = \text{yield}$$

$$n = \text{number of cycles}$$

$$e = \text{efficiency}$$

로 계산하여 relative quantitative(RQ)를 측정하였다 (Table 2.).

Table 2. Primer Sequence of Mouse Probe & Oligonucleotide

Gene	Primer	Sequence
PPAR- γ^*	FAM	5'-TCGGAATCAGCTCTGTGGACCTCTCC-3'
C/EBP- α^{\dagger}	Forward	5'-TGGACAAGAACGACCAACGAGTAC-3'
	Reverse	5'-CGGTCATTGTCACTGGTCAACT-3'
aP2/FABP4 ‡	Forward	5'-TGGGAACCTGGAAGCTTGTCTC-3'
	Reverse	5'-GAATTCCACGCCAGTTTGA-3'
Leptin	Forward	5'-AACCCCTTACTGAACCTCAGATTGTTAG-3'
	Reverse	5'-TAAGTCAGTTTAAATGCITAGGG-3'
UCP-2 §	Forward	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAAT-3'
	Reverse	5'-ACCGATACAGTACAGTACAGTA-3'
Adiponectin	Forward	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAAT-3'
	Reverse	5'-ACCGATACAGTACAGTACAGTA-3'
AMPK ** - $\alpha 1$	Forward	5'-AAGCCGACCCAATGACATCA-3'
	Reverse	5'-CTTCCTTCGTACACGCAAAT-3'
AMPK- $\alpha 2$	Forward	5'-GAT GAT GAG GTG GTG GA-3'
	Reverse	5'-GCC GAG GAC AAA GTG C-3'

* peroxisome proliferator-activated receptor gamma, † CCAAT-enhancer-binding protein α , ‡ adipocyte Protein 2/fatty acid binding protein 4, § uncoupling protein 2, ** AMP-activated protein kinase

Table 3. Effects of PAS_E^{†*} materials on Body Weight Gain, Food Efficiency Ratio, Food Intake in Mice Consuming High Fat Diet.

	ND	HFD-CTL	HFD-orlistat (15.6 mg/kg)	HFD-PAS_E (100 mg/kg)
Food intake (g/day)	2.85	2.53	2.85	2.08
Body weight gain (g/day)	0.122±0.01	0.433±0.02	0.156±0.02	0.286±0.02
Food efficacy ratio (FER, %)	4.28±0.47	17.10±0.79	5.49±0.72	13.76±0.76

^{†*} High-fat diet plus 100mg/kg/day of *Phascolus angularis* shell extract

5) 병리조직 분석

PAS_E를 7주간 투여한 후 주요 장기들에 대해 조직 병리학적 관찰을 하기 위해 간과 부고환주변 지방조직을 절취하여 24시간 동안 10% neutral buffered formalin에 고정시키고 graded alcohol로 탈수시킨 후 파라핀으로 포매하여 block을 제작하고 microtome으로 4 μm 두께의 조직절편을 제작하였다. hematoxylin & eosin(H&E) 및 Oil red O 염색을 시행하고 xylene clearing을 거쳐 permount로 처리한 뒤 광학현미경위에서 조직과 장기별 특이 병변의 유무를 관찰하였다.

4. 통계처리

모든 실험결과는 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며 그 결과는 평균 ± 표준오차 (mean±SE)로 표시하였다. 정상군과 대조군간의 유의성은 정상군 (ND)과 비교하였고, 그리고 각 실험군간의 통계적 유의성을 대조군(HFD-CTL)과 비교하여 Student t-test를 통해 P < 0.05 수준으로 검증하였다.

첨가한 고지방식이군(이하 HFD-PAS_E은 대조군인 고지방식이군(이하HFD)보다 유의하게 체중증가량이 낮았다(P<0.001).

2) 식이섭취량, 식이효율

정상군(ND군)의 식이섭취량은 하루 평균 2.85g이었고, 비만대조군 (HFD-CTL)은 2.53g, 양성대조군 (HFD- orlistat)은 2.85g, 실험군 (HFD-ZJL_E)은 20.8g이었다. 식이효율은 비만대조군(HFD군)이 정상군 (ND군)보다 유의적으로 증가하였다 (p<0.001). 실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)보다 유의적으로 낮게 타났다(p<0.01).

2. 지방조직 중량 측정

1) 지방조직의 중량

실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)보다 복부 피하지방의 무게, 창자주변 지방조직의 무게가 유의적으로 적었고(P<0.01) 부고환주변 지방조직의 무게. 신장주변 지방조직의 무게는 각각 3.43%, 13% 적게 나타났으나 유의성이 없었다(Figure 2).

III. 結果

1. 체중 및 식이섭취량, 식이효율

1) 체 중

6주 동안의 체중 증가량에서 유의한 차이를 나타내었다. 대조군인 고지방식이군(이하HFD)이 정상군인 정상식이군(이하 ND군)보다 체중이 유의적으로 증가하였다(P<0.001). 실험군인 赤小豆 外皮 추출물을

3. 혈액생화학 검사

1) 혈중 지질 농도

실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)에 비해 혈장 LDL 콜레스테롤, 혈중 유리 지방산(Free fatty acid)의 농도가 유의적으로 낮고(P<0.01) 혈장 HDL 콜레스테롤의 농도가 유의적으로 높았다(P<0.01). 총콜레스테롤 함량에서 실험군의 유의한 변화는 없었다(Table 4).

2) 혈중 AST, ALT, ALP, LDH

비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)의 혈장 내 AST 수치가 증가하였으나 유의성이 없었다. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)에서 혈장 내 ALT, LDH 수치가 34%, 22% 감소하였으나 유의성이 없었다. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)이 혈장 내 ALP 수치가 유의하게 감소하였다($P < 0.01$)(Table 4).

3) 혈중 uric acid, creatinine

비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)이 혈중 Creatinine 수치가 15.6% 증가하였으나 유의성이 없었고 혈중 Creatinine 수치가 10% 감소하였으나 유의성이 없었다(Table 4).

4) 혈중 Adiponectin 분석

실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)에

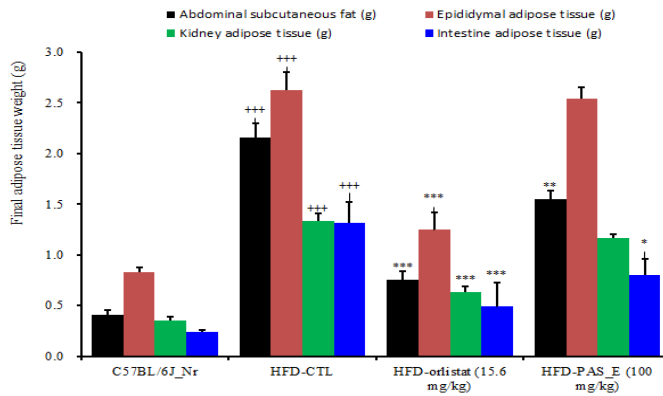


Figure 2. Effects of PAS_E* materials on fat deposit in mice consuming high fat diet.

Normal group: normal diet, HFD: high fat diet control, Orlistat (15.6 mg/kg): 60%high fat diet with 15.6 mg/kg/day of Xenical , PAS_E: 60%high fat diet plus 100mg/kg/day of *Phaseolus angularis* shell extract. Values are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (compared with Normal group) and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ (compared with HFD-control) express significant differences and they are determined by Duncan's multiple-range test.

* High-fat diet plus 100mg/kg/day of *Phaseolus angularis* shell extract

Table 4. The Effect of PAS_E† on Blood Biochemistry Prameters in HFD* - fed Obese Mice.

	Normal	HFD-CTL	HFD-orlistat	HFD-PAS_E (100 mg/kg)
Total cholesterol (mg/dL)	145.8 \pm 4.77	245 \pm 6.76	200 \pm 6.98***	243.6 \pm 5.57
LDL* - cholesterol (mg/dL)	11.5 \pm 0.58	19.1 \pm 1.45	12.1 \pm 0.7***	14.8 \pm 0.44**
HDL§ - cholesterol (mg/dL)	70.6 \pm 2.21	94 \pm 1.79	77.2 \pm 2.96***	86.6 \pm 1.29**
Free fatty acid (mg/dL)	2.5 \pm 0.07	2.9 \pm 0.03	2.6 \pm 0.16***	3.4 \pm 0.14**
ALT(U/L)	22.6 \pm 1.33	71.8 \pm 17.63	24.4 \pm 2.36**	47.4 \pm 15.36
AST(U/L)	75.38 \pm 4.59	105.8 \pm 10.69	116.6 \pm 19.52	151.2 \pm 24.03
ALP(U/L)	73 \pm 6.22	58 \pm 2.08	70.2 \pm 3.81	45.8 \pm 2.3
LDH(U/L)	309.4 \pm 40.08	766.4 \pm 224.63	448.6 \pm 53.52	597.8 \pm 53.52
Uric acid (mg/dL)	2.7 \pm 0.17	3.2 \pm 0.39	4 \pm 0.16	3.7 \pm 0.55
Creatine (mg/dL)	0.34 \pm 0.025	0.4 \pm 0.0	0.36 \pm 0.025	0.36 \pm 0.025
Adiponectin (mg/ml)	217493.9 \pm 34357.9	126262.5 \pm 19473.3	180095.9 \pm 29798.1	235797.9 \pm 30560.9

* low density lipoprotein, § High density lipoprotein, † High-fat diet plus 100mg/kg/day of *Phaseolus angularis* shell extract, ‡ High-fat diet ALT(Alanine aminotransferase), AST(Aspartate aminotransferase), ALP(Alkaline phosphatase), LDH(Low-density lipoprotein)

비해 혈중 Adiponectin 수치가 유의성 있게 높게 나왔다($P < 0.01$). 실험군(HFD-PAS_E군)이 양성대조군(HFD-Orlistat군)보다 혈중 Adiponectin 수치가 30.9% 높게 나타났다(Table 4).

4. RT-PCR을 통한 mRNA 발현 측정

1) Leptin mRNA

실험군(HFD-PAS_E군)의 간조직 내 Leptin mRNA 발현이 비만대조군(HFD군), 양성대조군(HFD-Orlistat군)에 비해 73.7%, 42% 감소하였으나 유의성이 없었

다(Figure 3A)

실험군(HFD-PAS_E군)의 부고환주변 지방조직 내 Leptin mRNA 발현이 비만대조군(HFD군)에 비해 유의하게 감소하였다($P < 0.05$)(Figure 3B).

2) PPAR- γ mRNA

간조직내 혈중 PPAR- γ mRNA 발현은 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)에서 유의하게 감소하였다($P < 0.05$) (Figure 4A).

실험군(HFD-PAS_E군)의 부고환주변 지방조직 내 PPAR- γ mRNA 발현이 30% 감소하였으나 통계적 유

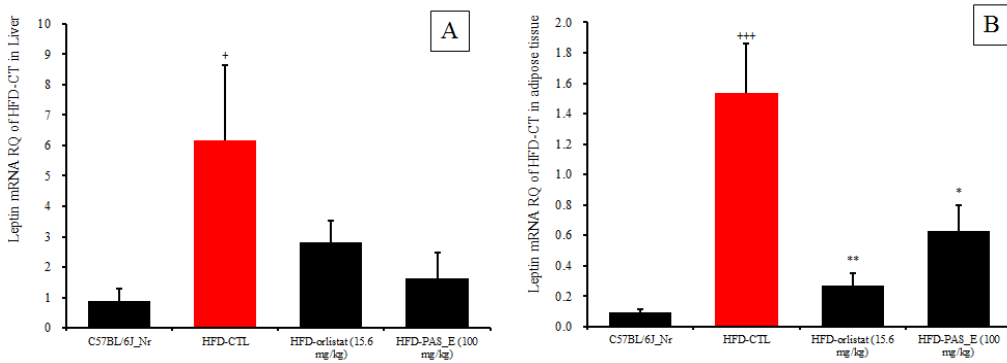


Figure 3. Effects of PAS_E⁺ materials on mRNA expression of leptin in liver/epididymal adipose tissue in mice consuming high fat diet.

* High-fat diet plus 100mg/kg/day of Phaseolus angularis shell extract

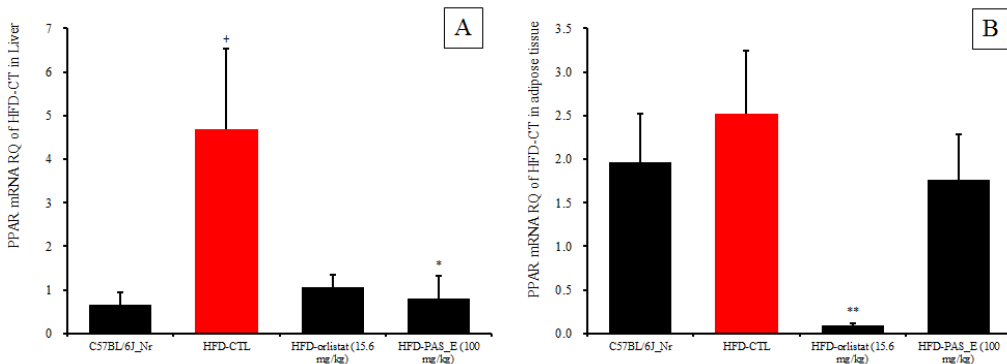


Figure 4. Effects of PAS_E⁺ materials on mRNA expression of PPAR- γ [†] in liver/epididymal adipose tissue in mice consuming high fat diet.

* High-fat diet plus 100mg/kg/day of Phaseolus angularis shell extract, [†] proliferator-activated receptor gamma

의성은 없었다 (Figure 4B).

3) C/EBP- α mRNA

실험군(HFD-PAS_E군)의 간조직 내 C/EBP- α mRNA 발현이 비만대조군(HFD군), 양성대조군(HFD-Orlistat군)과 비교하여 61%, 46.5% 감소하였으나 유의성은 없었다(Figure 5A).

실험군(HFD-PAS_E군), 양성대조군(HFD-Orlistat군)의 부고환주변 지방조직 내 C/EBP- α mRNA 발현이 비만대조군(HFD군)과 비교하여 유의하게 감소하였다($P < 0.05$)(Figure 5B).

4) AP2/FABP4 mRNA

실험군(HFD-PAS_E군)의 간조직 내 AP2/FABP4

mRNA 발현이 비만대조군(HFD군)에 비해 유의하게 감소하였으며 ($P < 0.01$), 양성대조군(HFD-Orlistat군)보다 70.6% 낮게 나타났다(Figure 6A).

실험군(HFD-PAS_E군)의 부고환주변 지방조직 내 AP2/FABP4 mRNA 발현이 비만대조군(HFD군)에 비해 59.25% 감소하였으나 유의성이 없었다(Figure 6B).

5) UCP2 mRNA

비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)과 양성대조군(HFD-Orlistat군)의 간조직 내 UCP-2 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$). 실험군(HFD-PAS_E군)의 간조직 내 UCP2 mRNA 발현이

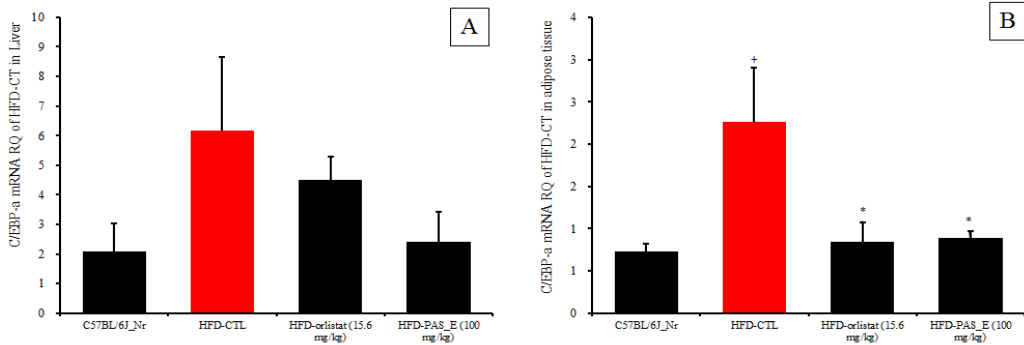


Figure 5. Effects of PAS_E[†] materials on mRNA expression of C/EBP- α ^{*} in Liver/ epididymal adipose tissue in mice consuming high fat diet.

* High-fat diet plus 100mg/kg/day of Phaseolus angularis shell extract, [†] CCAAT-enhancer-binding protein α

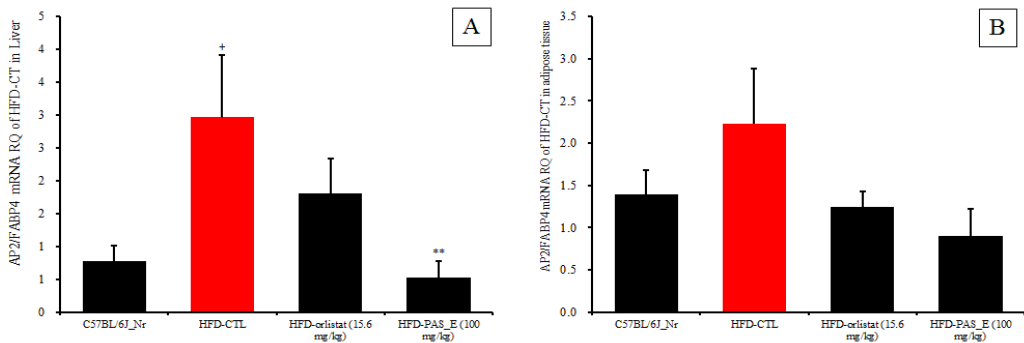


Figure 6. Effects of PAS_E[†] materials on mRNA expression of AP2/FABP4[§] in Liver/ epididymal adipose tissue in mice consuming high fat diet.

* High-fat diet plus 100mg/kg/day of Phaseolus angularis shell extract, [§] adipocyte Protein 2/ fatty acid binding protein 4

정상군(ND군), 양성대조군(HFD-Orlistat군)보다 높게 나타났다(Figure 7A).

실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)과 양성대조군(HFD-Orlistat군)보다 부고환주변 지방조직 내 UCP-2 mRNA 발현이 70.80%, 27.36% 증가하였으나 유의성이 없었다(Figure 7B).

6) AMPK-α2 mRNA

실험군(HFD-PAS_E군)의 간조직 내 AMPK-α1 mRNA 유전자 발현이 비만대조군(HFD군), 양성대조군(HFD-Orlistat군)보다 증가하였으나 유의성이 없었

다(Figure 8A).

비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)의 간 조직 내 AMPK-α2 mRNA 발현이 유의하게 감소하였다($P < 0.001$) (Figure 8B).

5. 병리조직 분석

1) 간조직 분석

정상군(ND군)과 비교하여, 비만대조군(HFD-CTL군)은 회색지방축적세포들이 전반적으로 존재하고, 거대소포성(macrovesicular) 지방증도 많이 존재하는

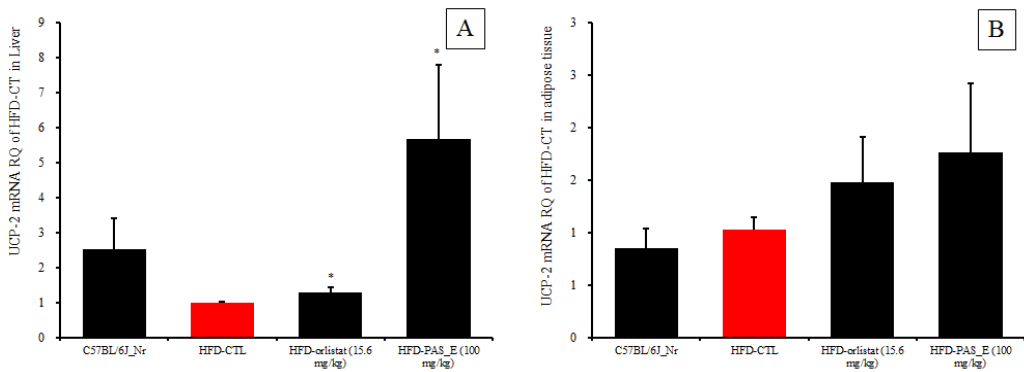


Figure 7. Effects of PAS_E* materials on mRNA expression of UCP-2† in liver/epididymal adipose tissue in mice consuming high fat diet.

* High-fat diet plus 100mg/kg/day of Phaseolus angularis shell extract, † uncoupling protein 2

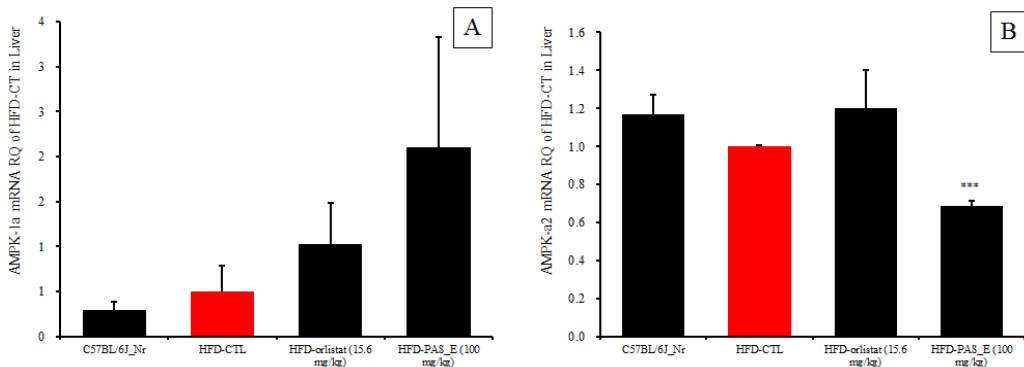


Figure 8. Effects of PAS_E* materials on mRNA expression of AMPK-1 and AMPK-α2§ in liver in mice consuming high fat diet.

* High-fat diet plus 100mg/kg/day of Phaseolus angularis shell extract, § AMP-activated protein kinase

것으로 나타났다. 비만대조군(HFD-CIL군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)에서 회색지방축적세포들과 거대세포성(macrovesicular) 지방증이 현저하게 개선되었다(Figure 9).

2) 부고환주변 지방조직 분석

비만대조군(HFD-CIL군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)에서 부고환주변 지방조직 내 지방세포 크기 증가가 억제되었다. 비만대조군(HFD-CIL군)의 지

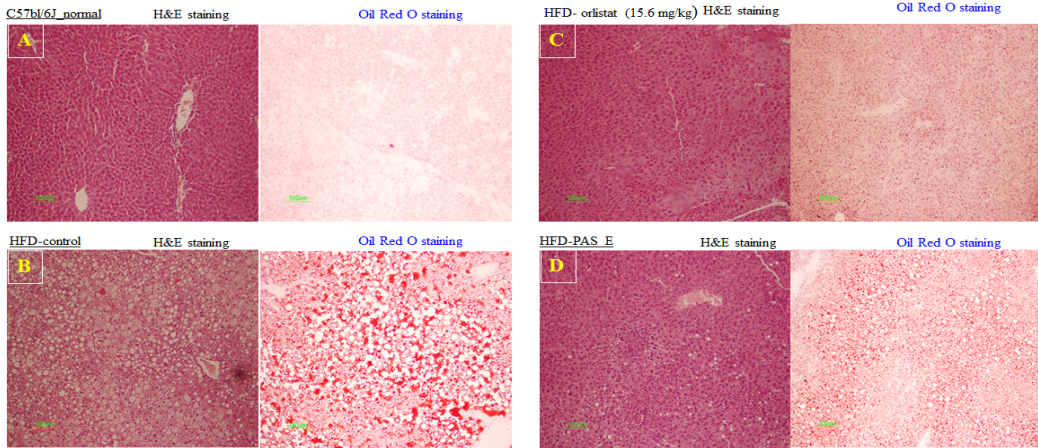


Figure 9. Effect of PAS_E^{*} (100 mg/kg) extracts on histological profiles of liver in obesity mice fed with high fat diet.

* High-fat diet plus 100mg/kg/day of Phaseolus angularis shell extract

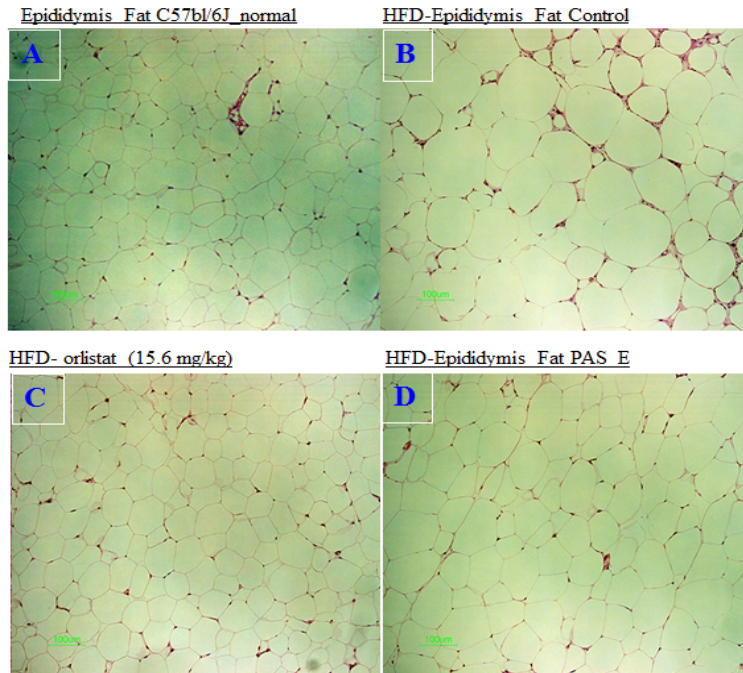


Figure 10. Effect of PAS_E[†] (100 mg/kg) extracts on histological profiles of epididymal adipose tissue in obese mice fed high fat diet.

† High-fat diet plus 100mg/kg/day of Phaseolus angularis shell extract

방세포 크기는 $136.8 \pm 1.49 \mu\text{m}$ 로 정상군(ND군) $52.5 \pm 1.04 \mu\text{m}$ 에 비하여 지방세포 크기가 2.61배 유의하게 증가였다($p < 0.001$). 실험군(HFD-PAS_E군)은 $104.5 \pm 1.85 \mu\text{m}$ 로 비만대조군(HFD-CTL군)에 비해 25.2% ($p < 0.001$) 유의하게 감소하였다(Figure 10, 11).

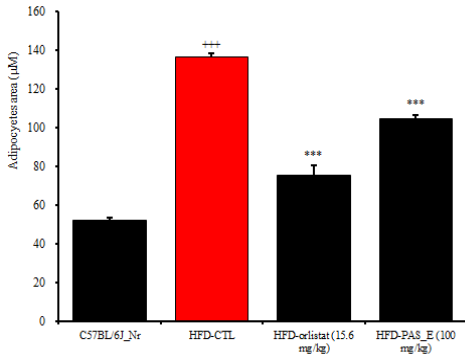


Figure 11. Effects of PAS_E* on adipocyte area size in mice consuming high fat diet.

* High-fat diet plus 100mg/kg/day of Phaseolus angularis shell extract

IV. 考察

최근 생활의 변화로 비만의 유병률이 점점 높아지면서 비만과 그로인한 고지혈증, 당뇨, 고혈압에 대한 치료의 필요성이 높아지고 있다. 서양의학에서는 식사요법과 운동요법 외에 주로 약물요법과 수술요법을 사용하는데 이 치료법은 많은 부작용이 보고되고 있어 부작용을 최소화하면서 안전한 한방비만치료에 대한 활발한 연구가 필요한 실정이다^{4,5}.

사상의학에서는 동의수세보원⁹에서 사람을 태양인, 소양인, 소음인, 태음인으로 분류하여 모든 질병의 원인과 치법이 체질별로 다르다고 설명하며 체질별 양생법과 맞춤 음식이 서술되어 있다. 이를 근거로 체질별 식이조절과 운동요법 처방이 가능하여 최근 사상의학적 비만치료가 각광을 받고 있다. 이에 따라 사상의학적 비만치료에 대한 연구가 많이 이루어지고 있는데 대부분 태음인에 집중되어 있고 다른 체질에 대한 비만 치료 연구는 제대로 이루어지고 있지 않았

다. 다른 체질 중 특히 소양인은 동의수세보원에 따르면 전체인구 중 30%로 태음인 다음으로 많은 비중을 차지하고 있고 류¹¹ 김¹⁴ 등의 연구에서 소양인이 과체중과 비만 환자에서 태음인 다음으로 많은 비율을 차지하는 경향이 보고되어 소양인을 위한 비만 치료 연구가 필요한 실정이다. 이에 대해 본 연구에서는 소양인을 위한 비만 치료 연구를 위해 한의학에서 사용되는 비만치료법인 滲濕利水退腫法을 활용한 利水退腫藥중 소양인에게 적합한 赤小豆 外皮의 비만 및 대사증후군 개선에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

赤小豆는 小腸火를 꺼주고 濕熱을 소변으로 내보내기 때문에 열이 많고 脾大腎小하여 배설 기능이 약한 소양인에게 좋은 약재이다. 赤小豆는 성질이 평(平) 하고 맛이 甘酸하며, 심경(心經)과 소장경(小腸經)으로 들어가, 이수소종(利水消腫), 해독배농(解毒排膿)하여 수종, 소변불리, 황달, 창독 등을 치료한다^{16,17}. 최근에는 적소두의 항염증 효과가 부각되며 김 등¹⁸의 연구처럼 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 Ward 등¹⁹의 연구처럼 항고혈압효과와 Itoh²⁰의 연구와 같은 항당뇨 효과에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 그러나 赤小豆 外皮에 대한 항비만효과와 대사증후군 개선 효과에 관한 전체적인 비교, 고찰은 아직 활발히 이루어지지 않고 있다.

赤小豆의 7-8%를 차지하는 外皮의 붉거나 검은 색은 Anthocyanin이라는 물질에 의해 생긴다. 赤小豆 外皮는 赤小豆보다 이 anthocyanin이 더 많이 함유되어 있으며 saponin과 식물성 섬유가 풍부하여 장운동을 원활하게 하여 배변활동을 촉진하므로¹⁵ 생식, 배설기능이 약한 소양인의 비만치료에 효과적일 것으로 사료된다. 이에 대해 赤小豆 外皮의 비만을 동반한 대사증후군 개선 효과를 검증하여 소양인에게 맞는 한방치료에 사용될 수 있도록 연구를 진행하였다.

赤小豆 外皮 추출물의 항비만 효과와 대사증후군에 대한 영향을 알아보기 위한 실험에서 9주령의 C57BL/6J 마우스를 각 5마리씩 무작위로 정상군인 ND군, 대조군인 HFD군, 양성대조군인 HFD-Orlistat

군, 실험군인 HFD-PAS_E군으로 배정하였다.

체중변화를 관찰한 결과, 실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)보다 체중 증가가 유의하게 낮게 나타났기 때문에 고지방식이를 하더라도 赤小豆 外皮 추출물을 병행 섭취하면 체중의 증가를 억제할 수 있을 것으로 사료된다. 식이효율(feeding efficiency ratio: FER%)의 수치가 적을수록 사료를 섭취하는 양이 많음에도 불구하고 체중의 증가가 적다는 것을 의미하여 비만억제효과가 있는 것으로 생각할 수 있다. 연구결과에서 실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)보다 유의적으로 낮게 나타나($p < 0.01$) 비만억제 효과가 있다고 사료된다.

일반적으로 지방의 과잉섭취는 지질대사에 이상을 유발해 지방이 축적되어 비만, 고지혈증, 지방간 등을 유발하므로 본 실험에서 각 군의 복부 피하지방, 부고환주변 지방조직, 신장주변 지방조직, 창자주변 지방조직의 무게를 측정된 결과, 복부 피하지방, 창자주변 지방조직의 무게가 실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)보다 유의적으로 적었다. 부고환주변, 신장주변 지방조직의 무게는 실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)보다 적게 나타났으나 통계적 유의성은 없었다. 이는 赤小豆 外皮 추출물이 복부 피하 지방, 창자주변 지방조직의 축적을 예방하는데 영향을 미쳤기 때문인 것으로 추정된다.

혈중 지질생화학적 분석 결과, 혈장 내 총 콜레스테롤의 함량에서 실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)보다 낮았으나 통계적 유의성은 없었다. 혈장 LDL 콜레스테롤의 농도는 실험군(HFD-PAS_E군)에서 비만대조군(HFD군)보다 수치가 유의적으로 낮았다. 혈장 HDL 콜레스테롤의 농도는 실험군(HFD-PAS_E군)에서 비만대조군(HFD군)보다 유의적으로 높았다. LDL 콜레스테롤은 혈관 벽에 축적되어 동맥경화증의 유발한다. HDL 콜레스테롤은 혈관벽에 쌓인 유리 콜레스테롤을 제거하여 간으로 운반하고, LDL 콜레스테롤을 억제하여 항동맥경화 작용을 한다. LDL 콜레스테롤과 HDL 콜레스테롤의 비율이 깨지면 동맥경화나 심혈관 질환 발병률이 높아진다²¹. 총 콜레스테롤이

실험군(HFD-PAS_E군)에서 비만대조군(HFD군)보다 낮은 경향을 보이며 유의적으로 혈중 FFA, LDL 콜레스테롤의 상승을 억제시키고 HDL 콜레스테롤은 상승시킨 것으로 보아 赤小豆 外皮 추출물이 혈중 지질 증가를 억제함으로써 항고지혈증의 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

적소두 외피의 신독성을 알아보기 위해 혈중 Uric acid와 함께 신장 기능의 지표가 되는 Creatinine의 농도를 측정하였다. Uric acid는 질소의 최종 대사산물로 신장으로 이동하여 소변으로 배출된다. 신장 기능에 이상이 생기면 소변으로 배설되는 요소질소량이 줄어들어 혈액 중의 요소질소량이 증가하게 된다. Creatinine은 근육 속에 존재하는 에너지원인 Creatine의 대사산물이다. 혈중 Creatinine의 농도는 신장 기능과 근육량에만 의존하기 때문에 이 수치를 통해 신장 기능 상태를 알 수 있다²². 혈중 Creatinine 수치는 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)에서 감소하였으나 유의성이 없었다. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)에서 혈장 내 Uric acid 수치가 증가하였으나 유의성이 없었다. 혈장 내 Uric acid의 정상범위는 15~20.0mg/dL로 4군 모두 정상 범위보다 높지 않았고 혈중 creatinine의 정상범위는 0.7~1.4mg/dL로 4군 모두 정상범위보다 높지 않았다. 비만대조군(HFD군), 실험군(HFD-PAS_E군), 정상군(ND군) 간에 유의한 차이가 없었다. 이 결과를 통해 적소두 외피는 신독성을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

적소두 외피의 간독성을 알아보기 위해 혈중 AST, ALT, ALP, LDH를 측정하였다. AST는 심근, 간, 골격근, 신장에 분포하고, ALT는 간, 신장, 심근, 골격근에 분포하며 혈중에는 미량만 존재한다. 따라서 이 수치가 상승하면 분포하는 장기의 세포변성 및 파괴를 의미한다²¹. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)이 혈장 내 AST 수치가 증가하였으나 유의성이 없었다. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)에서 혈장 내 ALT 수치가 34% 감소하였으나 유의성이 없었다. Alkaline phosphatase(ALP)는 Phosphomonoesterase를 가수분해하는 효소

로 중에서 최적 pH가 알칼리인 것으로 간, 담도계 질환, 골질환 등에서 증가한다²¹. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)이 혈중 ALP 수치가 유의하게 감소하였다. Lactate dehydrogenase(LDH)는 심장, 간, 신장 등에서 악성종양, 백혈병, 악성빈혈과 같은 질환이 있을 때 상승한다²¹. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)에서 혈장 내 LDH 수치가 22% 감소하였으나 유의성이 없었다. ALT, ALP, LDH 수치가 감소하는 경향을 보이면서 비만대조군(HFD군), 실험군(HFD-PAS_E군), 정상군(ND군) 간에 유의한 차이가 없어 적소두 외피가 간, 담도계에 독성을 유발하지 않는다고 추정할 수 있다.

Adiponectin은 분화된 지방세포에서 특이적으로 분비되는 단백질로 근육과 간에서 인슐린 민감도를 높이고 지방지방산 산화를 촉진하고 지방산 합성을 억제하여 체중을 감소시킨다²². 최근 연구에서 혈중 Adiponectin 농도가 비만, 제 2형당뇨병, 인슐린 저항성 환자에서 정상인들보다 감소하는 것으로 보고되고 있다. 지방세포가 비대화되면 아디포넥틴 분비량이 감소하고, 지방세포 크기가 작아지면 분비량이 증가하는 것으로 추정된다²³. 본 실험에서 혈중 Adiponectin 수치가 비만대조군(HFD군)이 정상군(ND군)보다 유의적으로 높았는데 고지방식이 섭취로 지방세포의 크기가 커지면서 수치가 증가한 것으로 보인다. 이를 통해 赤小豆 外皮 추출물이 지방세포 크기 증가를 억제하여 Adiponectin의 혈중 수치가 대조군에 비해 높은 것으로 생각된다.

赤小豆 外皮 추출물이 지방세포 분화과정에 미치는 영향을 알아보기 위해 지방세포 유전자의 발현을 측정하였다. 전지방세포에서 지방세포로 분화하는 과정에는 초기, 중기, 후기 단계가 있고 각 단계마다 조절인자들이 관여한다. 초기에는 c-fos, c-jun, c-myc 등의 유전자 발현과 함께 C/EBP β 와 δ 이 발현된다. 중기와 후기에는 PPAR γ 와 C/EBP α 가 발현되며 상호작용을 통해 지방세포 분화 특이적 유전자 발현을 유도하고 SREBP-1c(sterol regulatory elementbinding proteins-1c) 전사 인자에 의해 조절된다^{24,25}. PPAR- γ 은

중성지방을 축적하는 aP2, lipopro-tein lipase(LPL) 및 acyl-CoA synthase 등의 발현을 촉진시킨다. C/EBP mRNA는 leptin, adiponectin, aP2과 FAS 같은 adipocytokine과 adipogenic protein 발현을 유도한다²⁶.

지방전구세포가 지방세포로 분화하는 것을 촉진하기 때문에 PPAR- γ , C/EBP mRNA 발현량 증가는 지방세포 증가를 의미한다²⁷. 본 실험에서 정상군(ND군)에 비해 비만대조군(HFD군)에서 간조직내 혈중 PPAR- γ mRNA 발현과 부고환주변 지방조직 내 C/EBP-a mRNA 발현이 유의적으로 높게 나타났는데 고지방식이로 인한 지방침착이 지방세포 분화를 촉진했기 때문으로 사료된다. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)의 간조직 내 PPAR- γ mRNA 발현이 유의적으로 감소하였다. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)이 부고환주변 지방조직 내 PPAR- γ mRNA 발현이 감소하였으나 유의성이 없었다. 실험군(HFD-PAS_E군)의 간조직 내 C/EBP-a mRNA 발현이 HFD, 양성대조군(HFD-Olistatol)과 비교하여 감소하였으나 유의성은 없었다. 실험군(HFD-PAS_E군)의 부고환주변 지방조직 내 C/EBP-a mRNA 발현이 비만대조군(HFD군)과 비교하여 유의적으로 감소하였다. 따라서 赤小豆 外皮 추출물은 간과 부고환주변 지방조직에서의 PPAR- γ , C/EBP-a mRNA 발현을 감소시켜 지방세포 분화를 억제하는 것으로 추정할 수 있다.

AP2(Fatty acid binding protein)는 지방조직에서 지방합성에 관여하는 효소이다. PPAR- γ mRNA의 표적 유전자로 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 전사 단계에서 발현되기 때문에 이 유전자의 발현이 억제되면 지방세포의 분화가 억제된다²⁸. 정상군(ND군)에 비해 비만대조군(HFD군)에서 간 조직내 혈중 ADD1/SREBP1c mRNA 발현이 유의적으로 높게 나타났는데 고지방식이로 인한 지방침착이 지방세포 분화를 촉진했기 때문으로 사료된다. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)의 간조직 내 AP2/FABP4 mRNA 발현이 유의적으로 감소하였다. 실험군(HFD-PAS_E군)의 간조직 내 AP2/FABP4 mRNA 발현이 양

성대조군(HFD-Orlistat군)보다 낮게 나타났다. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)의 부고환주변 지방조직 내 AP2/FABP4 mRNA 발현이 59.25% 감소하였으나 유의성이 없었다. 赤小豆 外皮 추출물이 간과 부고환주변 지방조직에서의 AP2/FABP4 mRNA 발현을 감소시켜 지방세포로 분화를 억제하는 것으로 사료된다.

Uncoupling protein(UCP)은 갈색지방조직 속 미토콘드리아 내막에 있는 단백질이다. 갈색지방세포는 ATP를 합성하지 않고 미토콘드리아가 프로톤 경사를 제거하면서 열을 발생시켜 에너지를 소모하는데 여기에 관여하는 단백질이 UCP이다. UCP는 발열 반응에 의해 에너지 소비를 증가시키기 때문에 UCP mRNA 발현이 증가하면 에너지 소비가 촉진되어 체지방 축적을 억제할 수 있다²⁹. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)의 간조직 내 UCP-2 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였다. 실험군(HFD-PAS_E군)의 간조직 내 UCP-2 mRNA 발현이 정상군(ND군), 양성대조군(HFD-Orlistat군)보다도 높게 나타났다. 실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)과 양성대조군(HFD-Orlistat군)보다 부고환주변 지방조직 내 UCP-2 mRNA 발현이 70.80%, 19% 증가하였으나 통계적 유의성이 없었다. 赤小豆 外皮 추출물이 간과 부고환주변 지방조직에서의 UCP-2 mRNA 발현을 증가시켜 에너지 소비를 높이는 것으로 관찰되나 부고환조직에서 UCP-2 mRNA 발현 수치가 본 연구에서는 유의성이 없게 나와 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

AMPK(AMP-activated protein kinase)는 세포 에너지 항상성을 유지시키는 효소이다. 세포는 ATP와 ADP를 소모하고 AMP를 생성하는데 AMPK는 세포내 ATP를 소모하여 AMP/ATP 비율이 증가하는 경우에 활성화된다³⁰. AMPK는 지방산 합성 촉진 효소인 ACC, FAS mRNA와 콜레스테롤 생합성의 제한효소인 HMG-CoA reductase를 억제한다. 즉, 지방산 합성과 콜레스테롤 합성과 같은 ATP를 소비하는 과정을 억제하고 지방산 산화와 같은 ATP를 생산하는 과정을 촉진하여 지방세포 크기를 줄일 수 있다³¹. 포도당신생 과정

을 억제하는 작용을 하며 근육으로 포도당 이동을 증가시킨다³². 본 연구에서는 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)의 간 조직내 AMPK α 1 mRNA 발현이 증가하였으나 유의성이 없고 AMPK- α 2 mRNA 발현은 유의하게 감소하였다. AMPK α 1 mRNA, AMPK α 2 mRNA의 AMPK mRNA 총량에 대한 기여도 분석이 부족하여 AMPK mRNA 총량이 늘었는지에 대해서는 정확히 알 수 없는 상태로 팔겹질 추출물의 AMPK mRNA 발현에 대한 영향은 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Leptin은 에너지를 과도하게 섭취할 경우 식욕억제를 위해 지방세포에서 혈중으로 분비되어 시상하부에 작용하여 음식물 섭취, 교감신경계의 활성정도 및 에너지 소비를 조절한다. 지방세포 내 지방조직의 양과 비례해서 분비되어 체지방량의 지표, 비만의 지표로 사용할 수 있다³³. 비만대조군(HFD군)과 비교하여 실험군(HFD-PAS_E군)에서 부고환주변 지방조직 내 Leptin mRNA 발현이 유의성 있게 감소한 것으로 보아 赤小豆 外皮 추출물의 섭취가 체지방을 감소시키는 경향이 있는 것을 알 수 있다.

赤小豆 外皮 추출물이 전지방세포에서 지방세포로 분화하는 과정에 관여하여 지방세포 크기 증가와 지방구 생성을 억제하는지 관찰하기 위해 간과 부고환주변의 지방조직을 H&E 염색법, Oil red O 염색법을 사용하여 광학현미경으로 관찰하였다. 관찰 결과, 간조직 검사에서 실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)에 비하여 지방세포 크기 증가를 억제하였고, 지방과 지방구 침착을 억제하는 결과를 나타내었다. 부고환조직 검사에서 실험군(HFD-PAS_E군)이 비만대조군(HFD군)에 비하여 지방세포 크기 증가를 억제하는 결과를 나타내었다. 이를 통해 赤小豆 外皮 추출물이 지방세포의 크기 증가, 지방 침착을 억제하는 것으로 사료된다.

본 실험에서 유의성 있는 결과를 종합하여 분석한 결과, 赤小豆 外皮 추출물이 간조직의 중량, 복부 피하지방과 창자주변 지방조직의 무게를 유의적으로 감소시키며 체중감소효과가 있었고 신장과 간에 유해

하지 않은 것으로 생각되며 혈중 Adiponectin 수치를 높이면서 insulin 저항성을 감소시키고, 민감도를 증가시키는 경향성을 나타내었다. 지방분화 과정과 에너지 소비에 관여하는 간조직내 PPAR- γ , AP2/FABP4, AMPK- α 2, UCP2 mRNA 발현과 부고환 조직내 Leptin, C/EBP- α mRNA 발현을 조절하였다. 이를 통해 赤小豆 外皮 추출물이 비만을 동반한 고지혈증에 효과적으로 관찰된다. 그러나 동물 모델을 이용하여 사람의 비만을 동반한 대사증후군에 발생하는 다른 유전적 요인을 고려하지 못했다는 측면에서 사람의 비만을 동반한 대사증후군 치료에 직접적으로 반영하기에는 어려움이 있다. 따라서 실제 한방치료 요법 중 하나로 사용되기 전에 비만을 동반한 대사증후군 환자를 대상으로 추가적인 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結論

1. 체중증가량

체중증가 비만 대조군과 비교하여 赤小豆 外皮 추출물 투여군에서 체중 감소 효과가 나타났다.

2. 장기와 지방조직 중량

1) 간 중량이 비만 대조군과 비교하여 赤小豆 外皮 추출물 투여군에서 유의적으로 감소하였다.

2) 복부 피하지방과 창자주변 지방조직의 무게가 비만 대조군과 비교하여 赤小豆 外皮 추출물 투여군에서 유의적으로 감소하였다.

3. 혈액생화학 검사

1) 항고지혈증 효과

비만 대조군과 비교하여 赤小豆 外皮 추출물 투여군에서 혈장 내 HDL-콜레스테롤, 혈중 유리 지방산

(Free fatty acid)이 유의하게 증가하고 LDL-콜레스테롤 수치가 유의하게 감소하였다.

2) 간독성 신독성

Creatinine, Uric acid 수치가 비만대조군(HFD군), 실험군(HFD-PAS_E군), 정상군(ND군) 간에 유의한 차이가 없었다. 赤小豆 外皮 추출물 투여군에서 ALT, LDH 수치가 감소하는 경향을 보였으나 유의성이 없었고 ALP가 유의적으로 감소하였다.

3) 혈중 Adiponectin 수치

비만 대조군과 비교하여 赤小豆 外皮 추출물 투여군에서 혈중 Adiponectin 수치가 유의하게 증가하였다.

4. 유전자 발현 측정

1) 비만 대조군과 비교하여 赤小豆 外皮 추출물 투여군에서 간조직 혈장 내 PPAR- γ , AP2/FABP4, AMPK- α 2 mRNA 수치가 유의하게 감소하였고 UCP2 mRNA 수치가 유의하게 증가하였다.

2) 비만 대조군과 비교하여 赤小豆 外皮 추출물 투여군에서 부고환조직 내 혈장 내 Leptin, C/EBP- α mRNA 수치가 유의하게 감소하였다.

5. 병리조직학적 분석

비만 대조군과 비교하여 赤小豆 外皮 추출물 투여군에서 간조직 내 지방세포의 크기 증가가 억제되었고, 지방구 및 지방 침착이 억제되었다. 부고환조직 내 지방세포 또한 크기 증가가 억제되었다.

VI. Acknowledgement

본 연구는 웰니스 스프 임상지원센터 구축사업(과제번호: N0001200) 지원비로 수행되었음,

VII. Reference

1. Korean society for the study of obesity. Clinical bariatrics. 3th edition. Seoul: Korea medicine book publish company. 2008:18-20(Korean).
2. Definition, W. H. O. Diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization. 1999.
3. Ministry of Health & Welfare, Korea Centers for Disease Control and Prevention. National Health and Nutrition Survey No.117002, Seoul: Korea Centers for Disease Control and Prevention. 2014(Korean).
4. Kim YK, Park S. Laparoscopic Sleeve Gastrectomy versus Roux-en-Y Gastric Bypass: Recent Trend and the Results. Journal of Metabolic and Bariatric Surgery, 2014;3(1):1-5.
5. Yoo MY. Endoscopically Treated Gastric Bleeding Developed without Band Erosion after Laparoscopic Adjustable Gastric Banding. Journal of Metabolic and Bariatric Surgery J Metab Bariatr Surg, 2014;3(1): 22-24(Korean).
6. Kim KG. Safety of anti-obesity drugs approved for long-term use. The Korean Journal of Obesity. 2015; 24(1):17-27(Korean).
7. Wang KK. A Preliminary Study on the Method of Weight Loss. 3th edition. Zhejiang province : Journal of Zhejiang Traditional Chinese Medicine. 1985;128
8. Ryu JY. New commentary on Sasang Constitutional Medicine. Gyeonggi-do: Fish forest publish company, 2015;690-692(Korean).
9. Lee JM. Dongeuisoosebowonsasangbonchokwon. Seoul: Heanglym Publishing Company. 1986;137-142(Korean).
10. Moon SH, Sin SH, Kim HJ, Kim JY. A Relationship of the Obesity and Body Composition Analysis by Sasang Constitution. Journal of Korean medicine rehabilitation 2002;12(4):51-60(Korean).
11. Ryu SM, Shin SU, Kim KS, Moon JS, Yoon YS. Analysis of Obesity Degree and Comparison of Weight Control Program among Sasang Constitution. Journal of Korean medicine for obesity research 2005;5:21-29(Korean).
12. Choi EJ, Yoo JS, Cha YY. The Suggestion on the Herbal Bathing and the Pinda Manual Therapy with Herbs for Obesity Patients according to Sasang Constitutions. Journal of Korean medicine for obesity research 2010;10:41-49(Korean).
13. Song MY, Lee JS, Kim SS, Shin HD. The clinical study about the effect of Chungpaesagan-Tang(淸肺瀉肝湯) and Tauminjowui-Tang(太陰調胃湯) on the Taumin obesity after fasting therapy. Journal of Korean medicine rehabilitation 1998;8(1):34-56(Korean).
14. Kim DR, Beak TH. Clinical study on correlation between sasang constitution and obesity. Journal of Sasang constitutional medicine 1996;8(1):319-335(Korean).
15. Bridle P, Timberlake CF. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. Food Chemistry. 1997;58(1): 103-109.
16. National Oriental Medicine College Sasang Constitution class, Sasang Constitutions. Seoul: jipmoondang. 2004; 320-321(Korean).
17. National College of Oriental Medicine Collaborative Textbook Compilation Committee, Herbal medicine. Seoul: YeongLimSa. 2010; 323(Korean).
18. Kim MH, Jeong SH, Lee SY, Kim HK, Park CS, Jeon BH. Effect of Vigna angularis on Toll-like Receptor Activation and Pro-inflammatory Cytokine Production. Korean J. Oriental Physiology & Pathology 2012;26(4):511-518(Korean).
19. Ward JR, Francis SE, Marsden L, Suddason T, Lord GM, Dower SK, et al. A central role for monocytes in Toll like receptor mediated activation of the vasculature. Immunology. 2009;128(1):58-68.
20. Itoh T, Kobayashi M, Horio F, Furuichi Y.

- Hypoglycemic effect of hot-water extract of adzuki (*Vigna angularis*) in spontaneously diabetic KK-Ay mice. *Nutrition* 2009;25(2); 134.
21. Lee KN, Hwang YS, Lee SH, Neo KH, Yan DH, Jeong SK, et al. *Handbook of Laboratory & Diagnostic tests*. Seoul: Sungjee D & J Co. Ltd.2015;23-28.
 22. Kim JC, *SIM internal medicine 5(kidney)*. Seoul: Jeongdam publish company. 2013;72-75.
 23. Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *European Journal of Endocrinology* 2002;147(2):173-180.
 24. Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 2000;130:3122S-3126S.
 25. Ervois P, Torra IP, Fruchart JC, Staels B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38:3-11.
 26. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev*. 1995;5(5):571-6.
 27. Ntambi JM, & Kim YC, Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130, 2000; 3122S-3126S.
 28. Rousseau V, Becker DJ, Ongemba LN, Rahier J, Henquin JC, Brichard SM. Developmental and nutritional changes of ob and PPAR gamma 2 gene expression in rat white adipose tissue. *Biochem J* 1997;321:451-456.
 29. Rippe C, Berger K, Böiers C, Ricquier D, Erlanson-Albertsson C. Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*.2000;279(2):E293-E300.
 30. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 2005;144(12):5179-51 83.
 31. Hardie DG, AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:774-785.
 32. Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, Saintillan Y, Grondin P, Kahn A, et al. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes*. 2005;54(5):1331-1339.
 33. Javor ED, Ghany MG, Oral EA, Cochran EK, DePaoli AM, Premkumar A, et al. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology*. 2005;41:753-760.