



Original Article / 원저

## Ob/Ob 비만마우스 모델에서 降脂丸의 체중감량 효과

백송영<sup>1</sup>, 이혜림<sup>1</sup>, 박주혜<sup>1</sup>, 윤미정<sup>2</sup>, 윤유식<sup>3</sup>, 양희정<sup>4</sup>, 최영현<sup>5</sup>, 신순식<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 한의과대학 방제학교실 및 한방당뇨비만연구소

<sup>2</sup>목원대학교 의생명·보건학부

<sup>3</sup>중앙대학교 의과대학 미생물학교실

<sup>4</sup>강원대학교 약학대학

<sup>5</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실

## Gangjihwan Reduces Body Weight Gain in a ob/ob Female Mice

Song Young Baek<sup>1</sup>, Hye Rim Lee<sup>1</sup>, Ju Hye Park<sup>1</sup>, Michung Yoon<sup>2</sup>, Yoosik Yoon<sup>3</sup>,  
Heejung Yang<sup>4</sup>, Yung Hyun Choi<sup>5</sup>, Soon Shik Shin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Formula Sciences and Research Center of Korean Medicine for Diabetes and Obesity, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

<sup>2</sup>Division of Medical Engineering and Health Management, Mok-Won University

<sup>3</sup>Department of Microbiology, College of Medicine, Chung-Ang University

<sup>4</sup>College of Pharmacy, Kangwon National University

<sup>5</sup>Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

### ABSTRACT

**Objectives** : This study was designed to investigate anti-obesity effects of DF in a ob/ob mouse model.

**Methods** : Fifteen-week-old ob/ob mice were divided into four groups: a normal lean group given a standard diet, an ob/ob control group given a standard diet, and DF(1) and DF(2) groups given a standard diet with DF(1) (300 mg/kg), and DF(2) (600 mg/kg), respectively. After 10 weeks of treatment, body weight gain, feeding efficiency ratio, blood lipid markers, fat weight and histology were examined.

© 2017 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Results** : Body weight gain and fat mass were significantly decreased in DF(1) and DF(2) groups compared with control. The extent of decreases was eminent in DF(2) group. Feeding efficiency ratio were significantly decreased in DF(2) group compared with control. Consistent with their effects on body weight gain and fat mass, circulating concentrations of LDL, total cholesterol, free fatty acid, and insulin were decreased in DF(2) group compared with control. The size of adipocytes were significantly decreased by DF(2) compared with control. Consistent with their effects on body weight gain, hepatic lipid accumulation and liver weights were reduced in DF compared with control.

**Conclusions** : In conclusion, these results suggest that DF not only decrease feeding efficiency ratio, and blood anti-obesity biomarkers, but also reduce fat mass, contributing to the improvement of obesity. DF also inhibits hepatic lipid accumulation.

**Key words** : Gangjihwan, DF, ob/ob mice, obesity, hepatic lipid accumulation

## I. 서론

국민건강보험공단이 발간한 『2016 비만백서』에 의하면, 2015년 기준 비만율은 28.1%, 고도비만율은 4.1%, 초고도비만율은 0.3%로 2006년과 비교해 저체중, 정상, 위험체중의 비율은 감소한 반면, 비만, 고도비만, 초고도비만의 비율은 각각 1.7%p, 1.6%p, 0.2%p 증가한 것으로<sup>1)</sup> 나타나 여전히 비만을 관리하고 방지하여 국민의 건강한 삶을 유지하는 것이 필요한 것으로 생각된다.

降脂丸(De-fatty, DF)는 麻黃, 大黃과 紫草로 조성된 방제로 현재 한방의료기관에서 비만과 비알콜성 지방간질환(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)의 치료에 사용되고 있으며, DF의 원료 한약을 분쇄하여 고지방식이 동물실험모델에서 체중감량효과<sup>2-4)</sup>와 NAFLD의 치료효과<sup>5-8)</sup>를 실험적으로 입증하여 학술논문으로 발표한 바 있다.

비만은 일반적으로 지질대사 장애와 식욕증진을 쉽게 동반한다는 임상적 특성을 고려하여 마황이 가지는 지질대사 개선 및 식욕억제<sup>9-11)</sup>, 대황과 자초가 가지는 지질대사 개선, 식욕억제 및 항염증 개선효과<sup>12,13)</sup>가 추가될 경우의 이점까지도 고려하여 배합한 마황, 대황과 자초의 방제는 비만조절 및 개선제로서 적용 가능성에 의하여 체중 감량에 사용될 수 있을 것으로 생각되고, 현재 임상에서도 사용되고 있는 바 이를 기존 연구와는 다른 형질전환 동물모델인 ob/ob 마

우스 비만모델에서 실험적으로 검증하고자 본 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 강지환의 70% 에탄올 추출물에서 형질전환 동물모델인 ob/ob 마우스 비만모델을 이용하여 강지환의 경구 투여가 체중 감량효과에 미치는 영향을 체중 증가량과 혈중 비만 관련 지표, 지방 조직 및 간 조직의 조직학적 분석 등으로 조사하였다.

## II. 실험재료 및 연구방법

### 1. 실험재료

#### 1) 실험동물

(주)중앙실험동물(중앙실험동물, Republic of Korea)에서 공급한 7주령의 ob/ob 암컷 마우스를 구입하여 1주 간 실험실 환경에 적응하도록 한 후 사용하였다. 8주간의 비만을 유도하였고, 무작위 군분리를 한 뒤에 약물투여를 시작하였다. 실험 기간 동안 온도 21±2 ℃, 습도 55±5 %, 환기 횟수 15~17 회/hour, 조도 150~300 lux, 그리고 12시간의 명암(점등: 06:00, 소등: 18:00) 주기가 있는 실험실 환경에서 고품사료(Harlan, USA)와 물을 자유롭게 공급 받았다. 본 실험은 동의대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (승인번호: R2015-013)을 받아 동물윤리 준칙에 의거하여 실험을 진행하였다.

#### 2) 실험물질

실험물질인 DF의 조성약물은 화림제약(Busan, South

\* Corresponding author : Soon Shik Shin, Department of Formula Sciences and Research Center of Korean Medicine for Diabetes and Obesity, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

Tel : +82-51-850-7414, Fax : +82-51-853-4036, E-mail : ssshin@deu.ac.kr

• Received : May 22, 2017 / Revised : May 26, 2017 / Accepted : May 26, 2017

Korea)에서 구입한 후 동의대학교 한의과대학 방제학교실에서 정선하였고, 정선한 DF를 5배수의 70% 에탄올로 85℃에서 180분간 2회 추출하였으며, 추출물을 60℃에서 농축한 뒤에 동결건조하여 28.07%의 수율을 얻었다. 강원대학교 양희정교수로부터 DF를 받아 냉장보관하고 실험에 사용하였다. 조성약물은 마황, 대황과 자초의 3종이다(Table 1).

**Table 1.** The composition of DF.

韓藥名	Ingredient	%
Mahwang(麻黃)	<i>Ephedra intermedia</i> Schrenk et C. A. Meyer	40
Daehwang(大黃)	<i>Rheum palmatum</i> L.	20
Jacho(紫草)	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold et Zuccarini	40
Total amounts		100

### 3) 실험군 및 투여방법

각 군당 7마리를 체중에 따라 무작위로 분류하였다. 10주 동안 10Kcal% fat의 일반 식이를 공급하였고, 약물투여 전 8주 동안 비만을 유발하였다. 그 후 DF(1)는 300mg/kg의 농도로, DF(2)는 600mg/kg의 농도로 10주간 경구 투여하였다(Table 2).

**Table 2.** Experimental groups.

Group	Diet	Treatment	Number	Sex
Normal		water	7	Female
Control	10Kcal% fat	water	7	Female
DF(1)		300mg/kg	7	Female
DF(2)		600mg/kg	7	Female

## 2. 연구방법

### 1) 체중 증가량 측정

DF가 체중 증가량에 미치는 영향을 알아보기 위해 약물을 투여하는 10주 동안 매주 2회씩 체중을 측정하고 체중 증가량을 계산하였다.

### 2) 식이효율 측정

DF가 식욕과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 체중은 매주 2회, 사료섭취량은 매주 1회 10주 동안 측정하였고, 이를 근거로 하여 식이효율을 계산하였다.

### 3) 혈액생화학 분석

혈액 채취는 경구 투여 시작 10주 후 12시간 절식한 뒤 diethyl ether로 마취한 다음 심장에서 혈액 1 ml을 채취하였다. Blood clotting을 위해 30분 이상 실온에서 방치한 후 고속원심분리기(Micro12, Hanil,

Korea)를 이용하여 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 분리된 혈장은 냉동고(-20℃)에 보관하고 혈액생화학분석기(Modular analytics, Roche, Germany)를 사용하여 high density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol), low density lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol), total cholesterol, triglyceride와 glucose의 혈중 농도를 각각 측정하였다. 혈중 free fatty acid의 농도는 혈액생화학분석기(Modular analytics, Hitachi, Japan)를, 혈중 insulin 농도는 혈액생화학분석기(Microplate reader, Molecular device, USA)를 사용하여 각각 측정하였다.

### 4) 동물부검

채혈한 뒤에 부검하여 장간막 백색지방조직(mesenteric adipose tissue, MAT), 생식기 주변 백색지방조직(epididymal adipose tissue, EAT), 후복벽 주변 백색지방조직(retroperitoneal adipose tissue, RAT), 사타구니 주변 피하지방조직(inguinal adipose tissue, IAT)과 갈색지방조직(brown adipose tissue, BAT)을 수집하고 이들의 무게를 측정하였다.

### 5) 조직의 형태학적 분석

검체에서 분리한 조직은 10% formaldehyde에서 하루 이상 고정된 후 12시간 이상 흐르는 물에서 formalin을 세척한다. 50% ethanol에서 2시간, 70% ethanol에서 2시간, 80% ethanol에서 2시간, 90% ethanol에서 2시간, 95% ethanol에서 2시간, 100% ethanol에서 2시간씩 3번 단계적으로 탈수시킨다. Xylen에서 1시간씩 2번의 투명과정 후 Xylene + paraffin (1:1) 1시간 1번, paraffin 1시간씩 2번 침투를 실시한다. 이상의 포매과정(embedding)을 거쳐 제작된 paraffin block 조직을 4 μm의 두께로 박절(paraffin-section)하여 slide에 조직을 얹고 건조시킨다. Hematoxylin-eosin (H&E) staining 할 조직의 slide를 xylene에서 10분씩 3번, 100% ethanol에서 5분씩 2번, 95% ethanol에서 5분, 80% ethanol에서 5분, 70% ethanol에서 5분, 유수 5~10분을 한다. Harris hematoxyline (Sigma-aldrich, USA)에서 1~1.5 분 염색 후, 유수 3~5분 한다. 1% acid alcohol (HCl/100% ethanol)에서 dip 2~3번 한 후, 유수 1분 한다. 0.3% ammonia water에서 dip 3번 한 후, 유수 1분 한다. Eosin (Sigma-aldrich, USA)에서 1~1.5분 염색 후, 유수

0.5~1분 한다. 80% ethanol에서 dip 3번, 95% ethanol에서 dip 3번씩 2번, 100% ethanol에서 5분씩 2번, alcohol+ xylene (1:1)에서 5분, xylene에서 10분씩 3번 한다. 염색된 조직은 mounting medium (Poly-mount®, Polyscience, USA)을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 분석하였다. 전자 현미경 (Axioskop, Zessi, Germany)으로 조직을 관찰 후, 조직의 사진 촬영과 지방세포의 크기 분석은 image analysis system (Infinity analyze, Lumenera Corp., Canada)을 이용하였다.

### 3. 통계분석

모든 값은 mean ± standard deviation(SD)으로 표시하며, OriginLab Version 9.1(OriginLab Corporation, MA, USA)의 one way ANOVA를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

## III. 實驗 結果

### 1. 체중 증가량과 지방무게

체중 증가량: 정상군에 비하여 대조군은 체중 증가량이 8일째부터 유의하게 증가하기 시작하였고(P<0.01),

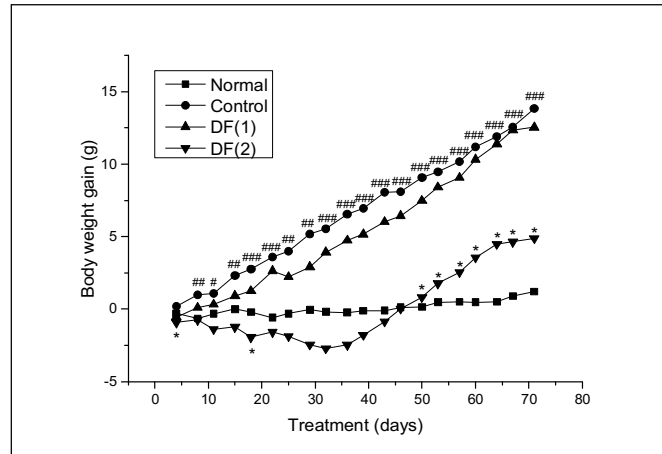
11일째에 증가폭이 조금 둔화하였다(P<0.05) 15일째부터 다시 증가폭이 커지고(P<0.01) 18일째부터 증가폭이 더욱 커져 유지되다(P<0.001)가 다시 25일째에 감소폭이 조금 둔화하여 유지되었으며(P<0.01), 32일째부터 다시 감소폭이 증가하여(P<0.001) 실험 종료 시까지 증가폭을 유지하였다. 대조군에 비하여 DF(1)은 투여 후 4일째부터 체중 증가량이 감소하였고, 그 이후 감소폭을 실험 종료 시까지 유지하였으나 통계적인 유의성은 없었다. DF(2)는 투여 후 4일째부터 유의하게 체중 증가량이 감소하였고(P<0.05) 8일째부터 17일째까지 감소폭을 유지하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 18일째에 감소폭이 더욱 증가하였다(P<0.05)가 다시 22일째부터 49일째까지 감소폭을 유지하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 다시 50일째부터 감소폭이 더욱 증가하여(P<0.05) 실험 종료 시까지 감소폭을 유지하였다 (Table 3, Fig. 1).

이를 백분율로 환산할 경우, 정상군에 비하여 대조군은 83.88%의 체중증가량이 증가하였으며, 대조군에 비해 DF(1)은 4.96%, DF(2)는 47.96%의 체중증가량이 감소하였으며, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다.

Table 3. Changes in body weight gain of DF against female ob/ob mice

	Normal	Control	DF(1)	DF(2)
4	-0.3±0.455	0.198±0.369	-0.542±1.308	-0.928±0.84*
8	-0.657±0.447	0.968±0.468 <sup>#</sup>	0.098±1.347	-0.747±2.194
11	-0.328±0.44	1.09±0.733 <sup>#</sup>	0.325±1.359	-1.4±2.523
15	0±0.248	2.323±0.99 <sup>#</sup>	0.91±1.467	-1.24±3.015
18	-0.202±0.274	2.77±0.938 <sup>##</sup>	1.258±1.549	-1.943±3.695*
22	-0.58±0.188	3.595±1.344 <sup>###</sup>	2.635±1.385	-1.583±5.274
25	-0.315±0.43	3.983±1.513 <sup>#</sup>	2.215±1.901	-1.87±6.15
29	-0.043±0.579	5.16±1.84 <sup>#</sup>	2.898±1.469	-2.443±7.423
32	-0.195±0.274	5.548±1.716 <sup>###</sup>	3.915±1.099	-2.718±8.443
36	-0.237±0.288	6.528±1.773 <sup>###</sup>	4.73±1.316	-2.473±10.008
39	-0.115±0.296	6.95±1.865 <sup>###</sup>	5.158±1.48	-1.785±9.243
43	-0.097±0.307	8.06±1.808 <sup>###</sup>	6.02±1.435	-0.87±8.003
46	0.125±0.235	8.085±1.636 <sup>###</sup>	6.43±1.534	0.015±7.328
50	0.148±0.351	9.085±1.959 <sup>###</sup>	7.483±1.646	0.825±6.453*
53	0.478±0.451	9.463±2.042 <sup>###</sup>	8.405±1.576	1.765±5.576*
57	0.493±0.149	10.16±2.129 <sup>###</sup>	9.07±1.897	2.533±5.775*
60	0.475±0.513	11.183±2.039 <sup>###</sup>	10.32±1.541	3.55±5.582*
64	0.493±0.347	11.905±1.938 <sup>###</sup>	11.38±1.763	4.48±5.734*
67	0.893±0.102	12.53±1.644 <sup>###</sup>	12.333±2.16	4.635±5.82*
71	1.213±0.213	13.838±1.608 <sup>###</sup>	12.53±1.858	4.868±5.956*

Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001. \* Value significantly different from control, \* p<0.05.



**Fig. 1.** Changes of body weight gain in female ob/ob mice. Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, ##p<0.01, ###p<0.001. \* Value significantly different from control, \* p<0.05. NC, normal; DF, De-fatty, 70% grain alcohol extract.

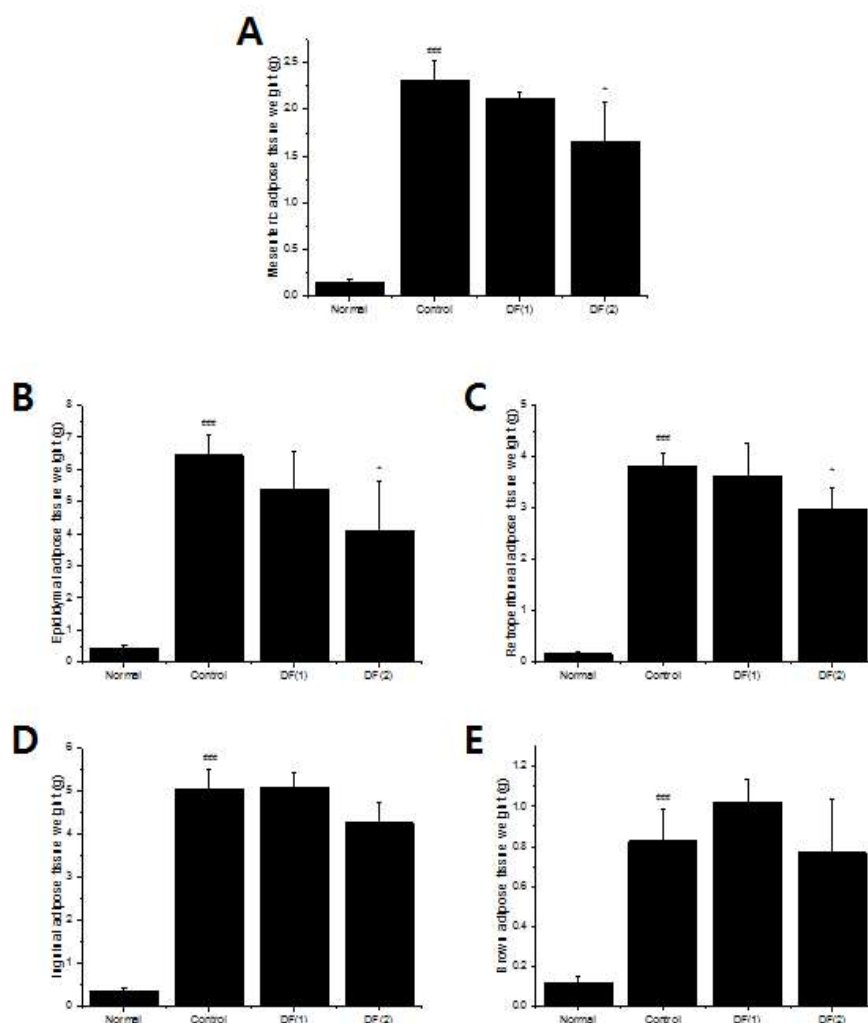
**지방무게:** 10주간 약물 투여 후 부검하여 장관막 지방조직 (mesenteric adipose tissue, MAT), 생식기 주변 백색지방조직 (epididymal adipose tissue, EAT), 후복벽 주변 백색지방조직 (retroperitoneal adipose tissue, RAT), 사타구니 주변 피하지방조직 (inguinal adipose tissue, IAT)과 갈색지방조직 (brown adipose tissue, BAT)의 무게를 측정하였다. 정상군에 비하여 대조군은 모든 지방조직의 무게가 통계적으로 유의하게 높은 것으로 나타났다 (P<0.001). MAT의 경우, 대조군에 비하여 약물 투여군 모두는 지방무게가 감소하였으며, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다. EAT의 경우, 대조군에 비하여 약물 투여군 모두는 지방무게가 감소하였으며 DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다. RAT의 경우, 대조군에 비하여 약물 투여군 모두는 지방무게가 감소하였으며, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다. IAT의 경우, 대조군에 비하여 DF(1)은 지방무게가 증가하였으며, 반면에 DF(2)는 지방무게가 감소하였으나 모두에서 통계적인 유의성은 없었다. BAT의 경우, 대조군에 비하여 DF(1)는 지방무게가 증가하였으며, 반면에 DF(2)는 지방무게가 감소하였으나 모두에서 통계적인 유의성은 없었다 (Table 4, Fig. 2).

이를 백분율로 환산하면, MAT의 경우, 정상군에 비하여 대조군은 88.64%의 지방무게가 증가하였고, 대조군에 비하여 DF(1)은 4.38%, DF(2)는 16.66%의 지방무게가 감소하였으며, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다. EAT의 경우, 정상군에 비하여 대조군은 87.80%의 지방무게가 증가하였고, 대조군에 비하여 DF(1)은 9.04%, DF(2)는 22.12%의 지방무게가 감소하였으며, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다. RAT의 경우, 정상군에 비하여 대조군은 92.06%의 지방무게가 증가하였고, 대조군에 비하여 DF(1)은 2.58%, DF(2)는 12.50%의 지방무게가 감소하였으며, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다. IAT의 경우, 정상군에 비하여 대조군은 87.44%의 지방무게가 증가하였고, 대조군에 비하여 DF(1)은 0.48%의 지방무게가 증가하였으며, 반면에 DF(2)는 8.32%의 지방무게가 감소하였으나 모두에서 통계적인 유의성은 없었다. BAT의 경우, 정상군에 비하여 대조군은 74.82%의 지방무게가 증가하였고, 대조군에 비하여 DF(1)은 10.56%의 지방무게가 증가하였으며, 반면에 DF(2)는 3.64%의 지방무게가 감소하였으며 모두에서 통계적인 유의성은 없었다.

**Table 4.** Effect of DF extracts on adipose tissue weights in female ob/ob mice.

	Adipose tissue weight (g)			
	Normal	Control	DF(1)	DF(2)
MAT	0.139±0.051	2.31±0.212###	2.116±0.075	1.65±0.429*
EAT	0.418±0.09	6.433±0.633###	5.367±1.174	4.102±1.509*
RAT	0.158±0.049	3.818±0.257###	3.626±0.638	2.969±0.413*
IAT	0.338±0.072	5.041±0.469###	5.09±0.33	4.266±0.481
BAT	0.119±0.027	0.826±0.164###	1.021±0.116	0.768±0.267

Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, ###p<0.001. \* Value significantly different from control, \* p<0.05. MAT, mesenteric adipose tissue; EAT, epididymal adipose tissue; RAT, retroperitoneal adipose tissue; IAT, inguinal adipose tissue; BAT, brown adipose tissue.



**Fig. 2.** MAT(A), EAT(B), RAT(C), IAT(D) and BAT(E) weights in female ob/ob mice. Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, ###p<0.001. \* Value significantly different from control, \* p<0.05. MAT, mesenteric adipose tissue; EAT, epididymal adipose tissue; RAT, retroperitoneal adipose tissue; IAT, inguinal adipose tissue; BAT, brown adipose tissue.

## 2. 식이효율

식이효율은 아래의 공식에 대입시켜 최종 체중 증가량을 총 사료섭취량으로 나누어 산출하고 통계분석하였다.

식이효율(feeding efficiency ratio: FER%) = 체중 증가량(g)/사료섭취량(g)×100<sup>14,15)</sup>

정상군에 비하여 대조군은 통계적으로 유의하게 높은 식이효율을 나타냈다(P<0.001). 대조군에 비하여 약

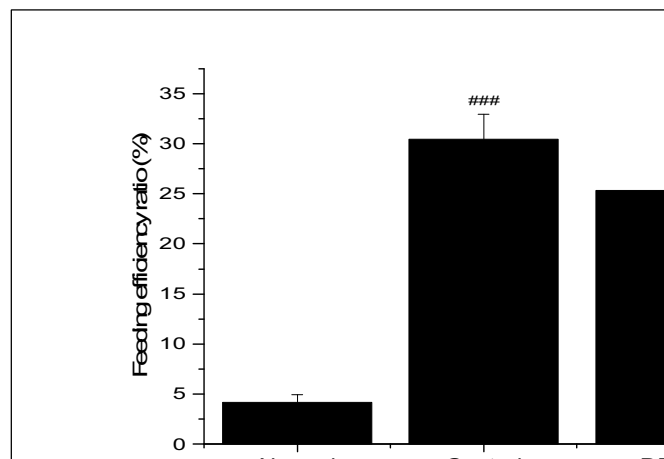
물투여군 모두는 식이효율이 낮은 것으로 나타났으나, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다 (Table 5, Fig. 3).

이를 백분율로 환산할 경우, 정상군에 비하여 대조군은 75.86%의 식이효율이 증가하였으며, 대조군에 비하여 DF(1)은 9.20%, DF(2)는 53.82%의 식이효율이 감소하는 것으로 나타났으며, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다.

**Table 5.** Feeding efficiency ratio in female ob/ob mice.

	Normal	Control	DF(1)	DF(2)
Total feed intake	29.088±1.228	45.425±2.223 <sup>###</sup>	49.875±5.36	51.013±9.455
Feeding efficiency ratio	4.174±0.745	30.418±2.522 <sup>###</sup>	25.293±4.495	9.133±12.146*

Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, ###p<0.001. \* Value significantly different from control, \* p<0.05.



**Fig. 3.** Feeding efficiency ratio in female ob/ob mice. Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, ###p<0.001. \* Value significantly different from control, \* p<0.05.

## 3. 혈중 HDL, LDL 및 total cholesterol 농도

**HDL cholesterol:** 약물 투여 시작 10주 후 혈장 내 HDL-cholesterol의 농도를 측정된 결과, 정상군에 비하여 대조군은 통계적으로 유의하게 높은 농도를 보였으며(P<0.001), 대조군에 비하여 모든 약물 투여군은 낮은 농도를 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다 (Table 6, Fig. 4-A).

**LDL cholesterol:** 약물 투여 시작 10주 후 혈장 내 LDL-cholesterol의 농도를 측정된 결과, 정상군에 비하여 대조군은 통계적으로 유의하게 높은 농도

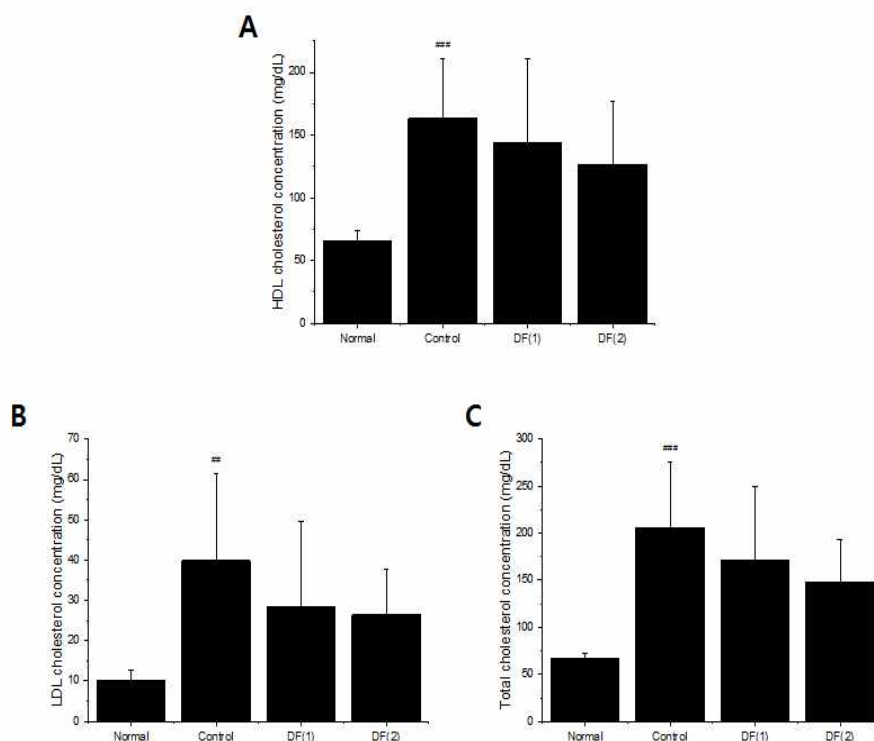
를 보였으며(P<0.01), 대조군에 비하여 모든 약물 투여군은 낮은 농도를 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다 (Table 6, Fig. 4-B).

**Total cholesterol:** 약물 투여 시작 10주 후 혈장 내 total-cholesterol의 농도를 측정된 결과, 정상군에 비하여 대조군은 통계적으로 유의하게 높은 농도를 보였으며(P<0.001), 대조군에 비하여 모든 약물 투여군은 낮은 농도를 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다 (Table 6, Fig. 4-C).

**Table 6.** Fasting plasma HDL, LDL, and total cholesterol levels in female ob/ob mice.

	unit	Normal	Control	DF(1)	DF(2)
HDL	mg/dL	66±7.329	163.429±47.258 <sup>###</sup>	144.286±66.319	126.714±50.645
LDL	mg/dL	10±2.828	39.857±21.559 <sup>##</sup>	28.429±21.062	26.5±11.327
TC	mg/dL	67.25±5.574	206.143±68.987 <sup>###</sup>	171.429±77.623	148.143±45.194

Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, ##p<0.01, ###p<0.001.



**Fig. 4.** Fasting plasma HDL(A), LDL(B) and total(C) cholesterol levels in female ob/ob mice. Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, ##p<0.01, ###p<0.001.

#### 4. 혈중 triglyceride와 free fatty acid 농도

**Triglyceride:** 약물 투여 시작 10주 후 혈장 내 triglyceride의 농도를 측정된 결과, 정상군에 비하여 대조군은 통계적으로 유의하게 높은 농도를 보였으며 (P<0.05), 대조군에 비하여 모든 약물 투여군은 높은 농도를 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다 (Table 7, Fig. 5-A).

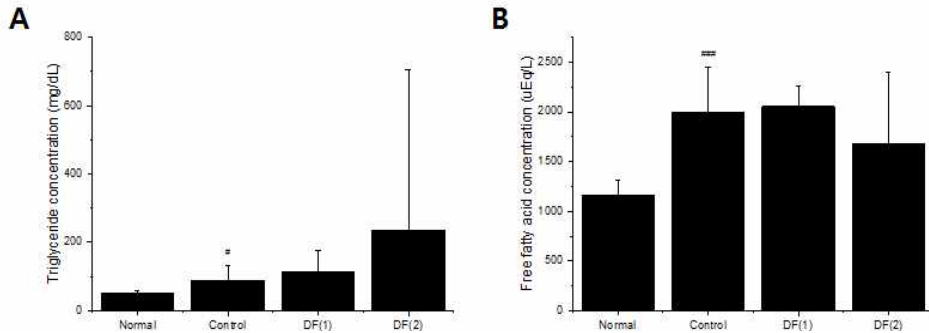
**Free fatty acid:** 약물 투여 시작 10주 후 혈장 내 free fatty acid의 농도를 측정된 결과, 정상군에 비하여 대조군은 통계적으로 유의하게 높은 농도를 보였으며 (P<0.001), 대조군에 비하여 DF(1)은 높은 농도를 나타냈으며, 반면에 DF(2)는 낮은 농도를 나타냈으나 모두에서 통계적인 유의성은 없었다 (Table 7, Fig. 5-B).



**Table 7.** Fasting plasma triglyceride and free fatty acid levels in female ob/ob mice.

	unit	Normal	Control	DF(1)	DF(2)
Triglyceride	mg/dl	50.875±7.882	88±43.355 <sup>#</sup>	114.429±60.794	234.714±470.735
Free fatty acid	mg/dl	1156.5±155.454	1991.571±459.718 <sup>###</sup>	2054.429±209.803	1677.714±723.061

Data are expressed as the mean±SD. <sup>#</sup> Value significantly different from normal, <sup>#</sup>p<0.05, <sup>###</sup>p<0.001.



**Fig. 5.** Fasting plasma triglyceride(A) and free fatty acid(B) levels in female ob/ob mice. Data are expressed as the mean±SD. <sup>#</sup> Value significantly different from normal, <sup>#</sup>p<0.05, <sup>###</sup>p<0.001.

**5. 혈중 glucose와 insulin 농도**

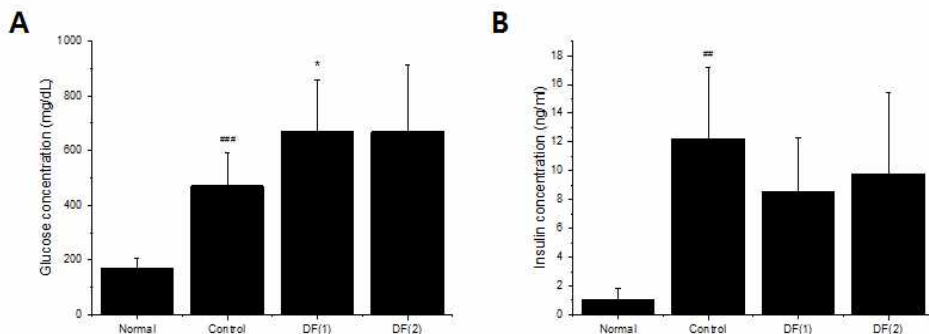
**Glucose:** 약물 투여 시작 10주 후 혈장 내 glucose의 농도를 측정한 결과, 정상군에 비하여 대조군은 통계적으로 유의하게 높은 농도를 보였으며(P<0.001), 대조군에 비하여 모든 약물 투여군은 높은 농도를 나타냈으나, DF(1)에서 통계적인 유의성이 있었다(P<0.05) (Table 8, Fig. 6-A).

**Insulin:** 약물 투여 시작 10주 후 혈장 내 insulin의 농도를 측정한 결과, 정상군에 비하여 대조군은 통계적으로 유의하게 높은 농도를 보였으며(P<0.01), 대조군에 비하여 모든 약물 투여군은 낮은 농도를 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다 (Table 8, Fig. 6-B).

**Table 8.** Fasting plasma glucose and insulin levels in female ob/ob mice.

	unit	Normal	Control	DF(1)	DF(2)
Glucose	μEq/L	169.75±36.574	470.857±123.316 <sup>###</sup>	670.286±190.328 <sup>*</sup>	668.714±245.653
Insulin	mg/dl	1.053±0.809	12.226±4.978 <sup>##</sup>	8.58±3.704	9.779±5.651

Data are expressed as the mean±SD. <sup>#</sup> Value significantly different from normal, <sup>##</sup>p<0.01, <sup>###</sup>p<0.001. <sup>\*</sup> Value significantly different from control, <sup>\*</sup> p<0.05.



**Fig. 6.** Fasting plasma glucose(A) and insulin(B) levels in female ob/ob mice. Data are expressed as the mean±SD. <sup>#</sup> Value significantly different from normal, <sup>##</sup>p<0.01, <sup>###</sup>p<0.001. <sup>\*</sup> Value significantly different from control, <sup>\*</sup> p<0.05.

## 6. 지방세포의 크기

DF가 ob/ob 형질전환 마우스 지방세포의 조직학적, 형태학적 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 생식기 주변 백색지방조직 (epididymal adipose tissue, EAT)을 hematoxylin-eosin 염색법으로 염색한 후 현미경 및 image analysis system으로 관찰하였다. 정상군에 비하여 대조군은 통계적으로 유의하게 지방세포의 크기가 증가하였으며( $P<0.01$ ), 대조군에 비하

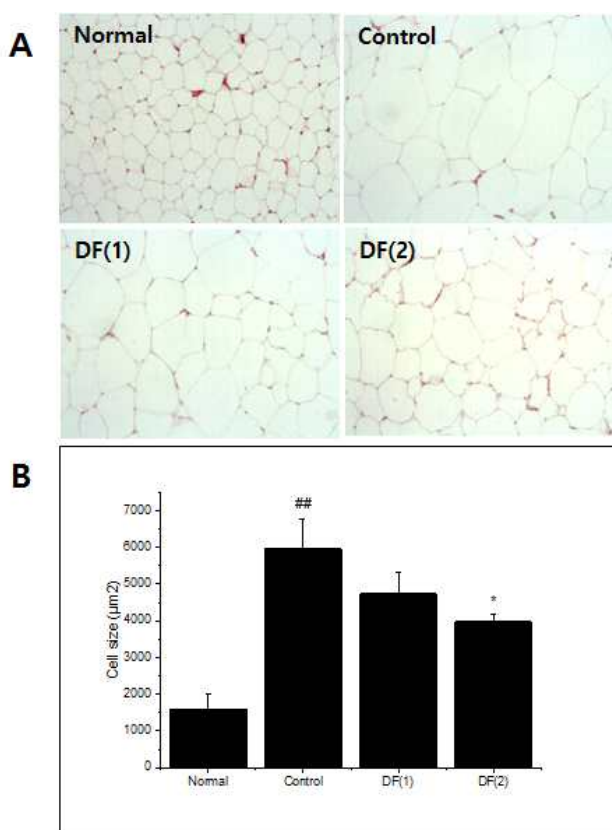
여 모든 약물 투여군은 지방세포의 크기가 감소하였으나 DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다( $P<0.05$ ) (Table 9, Fig. 7).

이를 백분율로 환산할 경우, 정상군에 비하여 대조군은 57.64%로 지방세포의 크기가 증가하였으며, 대조군에 비하여 DF(1)은 11.52%, DF(2)는 19.98%로 지방세포의 크기가 감소하였으나 DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다( $P<0.05$ ).

**Table 9.** Histological analysis of epididymal adipose tissue in female ob/ob mice

	Normal	Control	DF(1)	DF(2)
Cell size( $\mu\text{m}^2$ )	1601.982 $\pm$ 400.8	5963 $\pm$ 808.701 <sup>##</sup>	4731.674 $\pm$ 605.764	3977 $\pm$ 191.049 <sup>*</sup>

Data are expressed as the mean $\pm$ SD. # Value significantly different from normal, ## $p<0.01$ . \* Value significantly different from control, \*  $p<0.05$ .



**Fig. 7.** Histology of epididymal adipose tissue. (A) Representative hematoxylin and eosin sections of epididymal adipose tissue (original magnification X100). (B) Size of epididymal adipocytes. The size and number of adipocytes in a fixed area ( $270,000\mu\text{m}^2$ ). Data are expressed as the mean $\pm$ SD. # Value significantly different from normal, ## $p<0.01$ . \* Value significantly different from control, \*  $p<0.05$ .

### 7. 간 무게

실험종료 후 부검 시 간장의 무게를 측정된 결과, 정상군에 비하여 대조군은 통계적으로 유의하게 간장 무게의 증가를 보였으며(P<0.001), 대조군에 비하여 DF(1)은 간장무게가 증가하였으며, 반면에 DF(2)는 간장무게가 감소하였으나 모두에서 통계적인 유의성

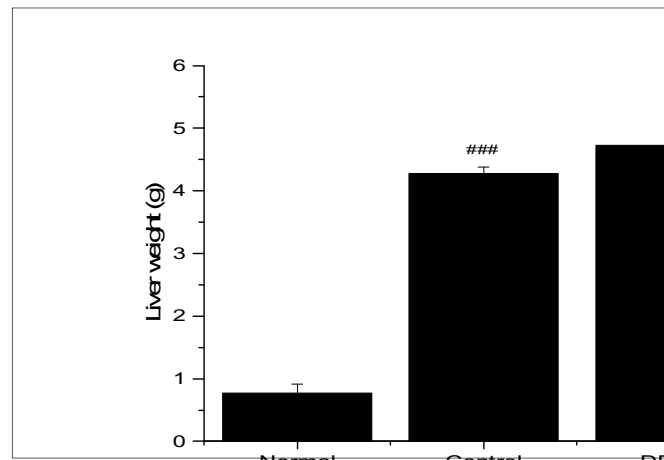
은 없었다 (Table 10, Fig. 8).

이를 백분율로 환산할 경우, 정상군에 비하여 대조군은 69.44%의 간장무게가 증가하였으며, 대조군에 비하여 DF(1)은 5.02%로 간장무게가 증가하였으며, 반면에 DF(2)는 10.20%로 간장무게가 감소하였으나 모두에서 통계적인 유의성은 없었다.

**Table 10.** Liver weights in female ob/ob mice

	Normal	Control	DF(1)	DF(2)
Liver weights(g)	0.772±0.138	4.279±0.103 <sup>###</sup>	4.732±0.645	3.487±1.306

Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, ###p<0.001.



**Fig. 8.** Liver weights in female ob/ob mice. Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, ###p<0.001.

### 8. 간내 지방축적 변화

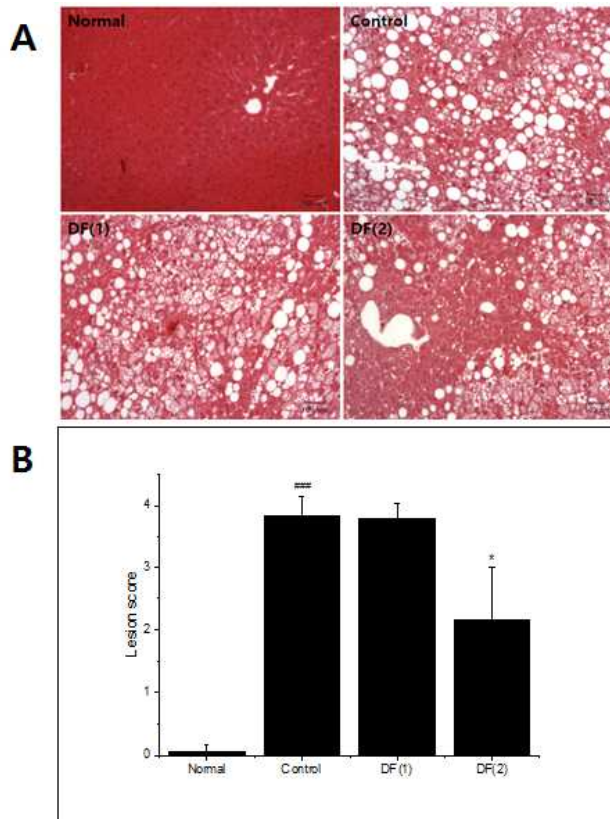
정상군에 비하여 대조군은 통계적으로 유의하게 상당량의 지방이 축적된 소견을 보였으며(P<0.001), 대조군에 비하여 모든 약물 투여군은 간의 지방축적이 감소하였으나 DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다 (P<0.05) (Table 11, Fig. 9).

이를 백분율로 환산할 경우, 정상군에 비하여 대조군은 97.12%의 간의 지방축적이 증가하였으며, 대조군에 비하여 DF(1)은 0.72%, DF(2)는 27.76%로 간의 지방축적이 감소하였으나 DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다(P<0.05).

**Table 11.** Histological analysis of hepatic lipid accumulation in female ob/ob mice

	Normal	Control	DF(1)	DF(2)
Lesion score	0.056±0.096	3.833±0.289 <sup>###</sup>	3.778±0.255	2.167±0.833 <sup>*</sup>

Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, ###p<0.001. \* Value significantly different from control, \* p<0.05.



**Fig. 9.** Inhibition of hepatic lipid accumulation by DF in female ob/ob mice. (A) Representative hematoxylin and eosin stained sections of livers are shown (original magnification X 100). (B) Pathological scores of hepatic accumulation are as follows: 0, no lesion; 1, mild; 2, moderate; 3, severe; 4, very severe. Data are expressed as the mean±SD. # Value significantly different from normal, ###p<0.001. \* Value significantly different from control, \* p<0.05.

#### IV. 考察

DF의 원료 한약을 분쇄하여 고지방식이 마우스 비만 모델에서 체중감량<sup>2-4)</sup>과 비알코올지방간질환<sup>5-8)</sup>의 개선효과를 검증하였다. DF의 에탄올 추출물이 형질전환 모델인 ob/ob 마우스 비만모델에서 체중감량 효과가 있는지를 알아보려고 하였으며, ob/ob 마우스 비만모델의 체중변화, 식이효율, 혈중 지질대사의 농도, 간세포의 지방축적과 지방조직의 형태학적 조직학적 변화를 조사하였다.

먼저 ob/ob 마우스 비만모델을 이용하여 DF의 투여가 체중 증가량의 변화와 지방무게에 어떤 영향을 미치는 지에 대해서 알아보았다.

체중 증가량의 경우, 대조군에 비해 DF(1)은 4.96%, DF(2)는 47.96%의 체중 증가량이 감소하였으며, DF(2)

에서 통계적인 유의성이 있었다(Fig. 1).

MAT의 경우, 대조군에 비하여 DF(1)은 4.38%, DF(2)는 16.66%의 지방무게가 감소하였으며, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다. EAT의 경우, 대조군에 비하여 DF(1)은 9.04%, DF(2)는 22.12%의 지방무게가 감소하였으며, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다. RAT의 경우, 대조군에 비하여 DF(1)은 2.58%, DF(2)는 12.50%의 지방무게가 감소하였으며, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다. IAT의 경우, 대조군에 비하여 DF(1)은 0.48%의 지방무게가 증가하였으며, 반면에 DF(2)는 8.32%의 지방무게가 감소하였으나 모두에서 통계적인 유의성은 없었다. BAT의 경우, 대조군에 비하여 DF(1)은 10.56%의 지방무게가 증가하였으며, 반면에 DF(2)는 3.64%의 지방무게가 감소하였으며 모두에서 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 2). 따라서 DF는 체중감량효과와 일치하게 지방량을 전반적으로

개선시키고 그 감량의 정도가 DF(2)에서 더 크다는 것을 시사한다.

DF의 투여가 식이효율에는 어떤 변화를 주는 지에 대해서도 조사하였다. 대조군에 비하여 DF(1)은 9.20%, DF(2)는 53.82%의 식이효율이 감소하는 것으로 나타났으며, DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다. 식이효율의 공식에서 의미하는 바와 같이 사료를 섭취하는 양이 많음에도 불구하고 체중의 증가가 적다는 것은 비만조절효과가 있는 것으로 볼 수 있다. 식이효율은 비만을 나타내는 하나의 척도로 사용할 수 있고, 식이효율의 값이 적을수록 비만조절효과가 있다고 할 수 있다.

DF의 투여가 체중조절 및 지질대사와 관련된 지표인 HDL, LDL, total cholesterol, triglyceride, free fatty acid, glucose와 insulin의 농도에 미치는 영향을 조사하였다. HDL-cholesterol의 농도는 대조군에 비하여 모든 약물 투여군에서 낮은 농도를 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다 (Fig. 4-A). LDL cholesterol의 농도는 대조군에 비하여 모든 약물 투여군에서 낮은 농도를 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다 (Fig. 4-B). Total cholesterol의 농도는 대조군에 비하여 모든 약물 투여군에서 낮은 농도를 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다 (Fig. 4-C). Triglyceride의 농도는 대조군에 비하여 모든 약물 투여군에서 높은 농도를 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다 (Fig. 5-A). Free fatty acid의 농도는 대조군에 비하여 DF(1)은 높은 농도를 나타냈으며, 반면에 DF(2)는 낮은 농도를 나타냈으나 모두에서 통계적인 유의성은 없었다 (Fig. 5-B). Glucose의 농도는 대조군에 비하여 모든 약물 투여군에서 높은 농도를 나타냈으나, DF(1)에서 통계적인 유의성이 있었다( $P < 0.05$ ) (Fig. 6-A). Insulin의 농도는 대조군에 비하여 모든 약물 투여군에서 낮은 농도를 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다 (Fig. 6-B). 따라서 DF는 체중감량과 지방량의 감소효과와 일치하게 LDL, total cholesterol, free fatty acid와 insulin의 농도값이 감소하는 것을 보여주고 있어 DF 투여에 의한 실질적인 체중 증가량 감소효과와 지방량 감소효과가 혈중 체중감량지표와 지질대사에 전반적으로 영향을 미친다는 것을 시사한다.

DF에 의한 체중감량효과가 ob/ob 마우스 비만모델의 지방세포(EAT)와 간세포의 조직학적, 형태학적 변

화에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 대조군에 비하여 DF(1)은 11.52%, DF(2)는 19.98%로 지방세포의 크기가 감소하였으나 DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다( $P < 0.05$ ) (Fig. 7). 대조군에 비하여 DF(1)은 5.02%로 간장무게가 증가하였으며, 반면에 DF(2)는 10.20%로 간장무게가 감소하였으나 모두에서 통계적인 유의성은 없었다 (Fig. 8). 대조군에 비하여 DF(1)은 0.72%, DF(2)는 27.76%로 간의 지방축적이 감소하였으나 DF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 9). 따라서 체중감량효과와 일치하게 DF에 의하여 지방세포의 크기는 감소하였으며, 간내 지방축적이 줄어들어 간장의 무게도 함께 감소하는 것을 알 수 있다.

그러므로 DF는 식이효율을 낮추고 혈중 비만지표들을 개선시키며 지방량을 줄여 체중감량효과를 나타내며, 간내 지방축적을 억제하는데도 기여할 수 있음을 보여준다.

본 연구의 제한점으로는 DF의 생리적인 데이터를 뒷받침하는 분자생물학적인 데이터가 추가로 보완되어야 한다. 향후 실험설계에서는 분자생물학적인 데이터를 보완하여 보다 더 과학적인 근거를 반영할 것이다.

## V. 結論

Ob/Ob 마우스 비만모델을 이용하여 降脂丸(DF)의 투여에 따른 체중증가량, 혈중 지질대사 관련 지표와 간조직의 변화를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DF는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 체중증가량을 감소시켰으며, 체중증가량의 변화와 일치하게 지방량도 감소하였고, 그 감소폭은 DF(2)에서 더욱 현저하였다.
2. DF는 대조군에 비하여 체중증가량의 변화와 일치하게 식이효율을 낮추는 것으로 나타났다.
3. DF는 대조군에 비하여 체중감량 및 지방량의 감소와 일치하게 혈중 LDL, total cholesterol, free fatty acid와 insulin의 농도값을 감소시키는 것으로 나타났다.
4. DF는 대조군에 비하여 체중감량효과와 일치하게 지방세포의 크기를 감소시키는 것으로 나타났다.
5. DF는 대조군에 비하여 체중감량효과와 일치하게 간장의 무게와 간내 지방축적을 억제하는 것으로

나타났다.

결론적으로 DF는 식이효율을 낮추고 혈중 비만지표들을 개선시키며 지방량을 줄여 체중감량효과를 나타내고, 간내 지방축적을 줄여 간장의 무게도 줄어드는 것으로 생각된다.

## Acknowledgement

This study was supported by the Convergence of Conventional Medicine and Traditional Korean Medicine R&D program funded by the Ministry of Health & Welfare through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI) (HI15C0075).

This study was supported by the Traditional Korean Medicine R&D program funded by the Ministry of Health & Welfare through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI) (HI16C0753).

## References

1. A Countermeasure Committee of Obesity, National Health Insurance Service. 2016 Obesity White Paper. Wonju: National Health Insurance Service, 2016:22.
2. Byeong Chul Kim, Hoa Jun Seok, Jae Sang Yoo, Ja Ryong Ku, Ki Hyeon Yoon, Ju Heum Jo, Du Hyon Jang, Yang Sam Jung, Jong Hoon Kim, Ye Ji Ahn, Sangee Woo, Miso Yoon, Soon Shik Shin. Comparison of Pakistani Ephedra Herba and Chinese Ephedra Herba Containing *Gangjihwan* in the Improvement Effects of Weight Loss in a High Fat Diet-Fed Obese Mice. Herbal Formula Science (HFS) 2014; 22(2):63-76.
3. Hoa Jun Seok, Jae Sang Yoo, Ja Ryong Ku, Ki Hyeon Yoon, Ju Heum Jo, Du Hyon Jang, Yang Sam Jung, Jong Hoon Kim, Byeong Chul Kim, Jong Seong Roh, Hye Rim Lee, Hyunghae Lee, Michung Yoon, Soon Shik Shin. Comparison of *Gangjihwan* and Combination of *Gangjihwan* and *Gamisochehwan* in the Improvement Effects of Weight Loss in a High Fat Diet-Fed Obese Mice. Herbal Formula Science (HFS) 2014;22(2):105-20.
4. Jae Sang Yoo, Ja Ryong Ku, Ki Hyeon Yoon, Ju Heum Jo, Du Hyon Jang, Yang Sam Jung, Jong Hoon Kim, Byeong Chul Kim, Hoa Jun Seok, Michung Yoon, and Jong Seong Roh, Soon Shik Shin. Comparison of *Gangjihwan*-1,2,3,4 and Combination of *Gangjihwan*-1 and *Gamisochehwan* in the Reducing Effects of Body Weight in a High Fat Diet-Fed Obese Mice. Journal of Korean Medicine for Obesity Research. 2015;15(1):9-23.
5. Ye Ji Ahn, Ki Hyeon Yoon, Ju Heum Jo, Du Hyon Jang, Yang Sam Jung, Jong Hoon Kim, Byeong Chul Kim, Hoa Jun Seok, Jae Sang Yoo, Ja Ryong Ku, Michung Yoon, Soon Shik Shin. *Gangjihwan* Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease in High Fat Diet-Fed C57BL/6N Mice. Kor. J. Herbology 2014;29(2):47-54.
6. Ju Heum Jo, Du Hyon Jang, Yang Sam Jung, Jong Hoon Kim, Byeong Chul Kim, Hoa Jun Seok, Jae Sang Yoo, Ja Ryong Ku, Ki Hyeon Yoon, Jong Seong Roh, Ye Ji Ahn, Won Kyung Lee, Michung Yoon, Soon Shik Shin. Comparison of Pakistani and Chinese Ephedra Herba-Containing *Gangjihwan* in the Improvement Effects of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a High Fat Diet-Fed NAFLD Mouse Model. Herbal Formula Science (HFS) 2014; 22(1):113-22.
7. Du Hyon Jang, Yang Sam Jung, Jong Hoon Kim, Byeong Chul Kim, Hoa Jun Seok, Jae Sang Yoo, Ja Ryong Ku, Ki Hyeon Yoon, Ju Heum Jo, Hye Rim Lee, Jong Seong Roh, Ho Young Yun, Michung Yoon, Soon Shik Shin. Comparison of *Gangjihwan* and Combination of *Gangjihwan* and *Gamisochehwan* in the Improvement Effects of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a High Fat Diet-Fed NAFLD Mouse Model. Herbal Formula Science (HFS) 2014;22(1):167-76.
8. Yang Sam Jung, Jong Hoon Kim, Byeong Chul Kim, Hoa Jun Seok, Jae Sang Yoo, Ja Ryong Ku, Ki Hyeon Yoon, Ju Heum Jo, Du Hyon Jang, Ho Young Yun, Michung Yoon, Soon Shik Shin. Comparison of *Gangjihwan*-1,2,3,4 and Combination of *Gangjihwan*-1



- and Gamisochehwan in the Improvement Effects of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a High Fat Diet-Fed Obese Mouse Model. *Kor. J. Herbology* 2014;29(6):149-56.
9. Compiled by Wang Yu Sheng, Deng Wen Long, Xue Chun Sheng. The application and pharmacology of traditional Chinese Medicine. Second edition. Beijing:People's Medical Publishing House. 2000:1105-19.
  10. Shekelle PG, Hardy ML, Morton SC, Maglione M, Mojica WA, Suttrop MJ, Rhodes SL, Jungvig L, Gagné J. Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. *JAMA* 2003;289(12):1537-45.
  11. Vukovich MD, Schoorman R, Heilman C, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Caffeine-herbal ephedra combination increases resting energy expenditure, heart rate and blood pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(1-2):47-53.
  12. Compiled by Shen Ying Jun. Pharmacology of traditional Chinese Medicine. First edition. Beijing: People's Medical Publishing House. 2000:111-5.
  13. Tian JY, Chen L, Zhang XL, Li J, Han J, Fu JY, Yang XM, Zhang PC, Ye F. Investigation of a compound, compatibility of *Rhodiola crenulata*, *Cordyceps militaris*, and *Rheum palmatum*, on metabolic syndrome treatment II - improving obesity. *Chin j of Chin materia medica*. 2013; 38(9):1415-19.
  14. Oh JS, Lee SR, Hwang KT, Ji GE. The Anti-Obesity Effects of the Dietary Combination of Fermented Red Ginseng with Levan in High Fat Diet Mouse Model. *Phytother Res*. 2013;19:1-6.
  15. Garrido-Polonio C, Garcia-Linares MC, Garcia-Arias MT, Lopez-Varela S, Garcia-Fernandez MC, Terpstra AH, Sanchez-Muniz FJ.. Thermally oxidised sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. *Br J Nutr*. 2004;92(2): 257-65