

AMPK/Sirt1/PGC-1 α 신호 전달 경로의 조절을 통한 오미자 추출물의 비만 개선 효과

이세희^{1#}, 박해진^{2#}, 신미래¹, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 대구한의대학교 DHU바이오융복합시험센터

Anti-Obesity Effect of Schizandrae Fructus Water Extract through Regulation of AMPK/Sirt1/PGC-1 α signaling pathway

Se Hui Lee^{1#}, Hae-Jin Park^{2#}, Mi-Rae Shin¹, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea
2 : DHU Bio Convergence Testing Center

ABSTRACT

Objectives : Although the anti-obesity effect of Schizandrae Fructus water extract has been demonstrated, its underlying mechanism is still unclear. Therefore, we aimed to evaluate the anti-obesity effect of Schizandrae Fructus water extract through the p-AMP-activated protein kinase (p-AMPK), sirtuin1 (Sirt1), and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) signaling in 60% high-fat diet (HFD)-induced obese mouse model.

Methods : Male C57BL/6 mice were divided into four groups. The Normal group was fed a normal diet and the obese groups were fed 60% HFD. Except for the Control group, the GG group was supplemented with 0.5% *Garcinia gummi-gutta* and the SCW group was supplemented with 0.5% Schizandrae Fructus water extract. After 6 weeks, obesity-related biomarkers in serum were measured and the expressions of protein for lipid-related factors in liver tissue were analyzed by western blot.

Results : Treatment with SCW significantly down-regulated body weight compared to the Control group. SCW down-regulated levels of triglyceride and total cholesterol in serum and significantly increased p-AMPK, Sirt1, and PGC-1 α in liver tissue. In addition, the expressions of fatty acid oxidation-related proteins such as peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT-1A), uncoupling protein 1 (UCP1), and uncoupling protein 3 (UCP3) were significantly up-regulated. However, fatty acid synthesis-related proteins including sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1), phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (p-ACC), and fatty acid synthase (FAS) were significantly down-regulated.

Conclusions : Taken together, SCW treatment showed anti-obesity effect by regulating both fatty acid oxidation-related and fatty acid synthesis-related proteins through AMPK/Sirt1/PGC-1 α signaling in 60% HFD-induced obese mice.

Key words : Schizandrae Fructus, anti-obesity, High-fat diet, AMPK/Sirt1/PGC-1 α

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea,

· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Se Hui Lee, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea,

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : k18dw@naver.com

Hae-Jin Park, DHU Bio Convergence Testing Center, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 38610, Republic of Korea,

· Tel : +82-53-819-7876 · Fax : +82-819-1496 · E-mail : hjpark@dhu.ac.kr

· Received : 16 February 2022 · Revised : 07 March 2022 · Accepted : 25 March 2022

I. 서론

비만 (Obesity)은 비정상적 또는 과도한 지방이 축적되어 나타나는 상태로 선진국과 개발도상국을 비롯하여 전 세계적으로 발병하고 있다¹⁾. 이러한 비만은 심혈관 질환, 골관절염, 당뇨병, 고혈압 및 암을 포함한 만성 질환의 중요한 위험 인자로서 간주되며²⁾, 비만으로 인한 만성 질환들은 사망률 증가와 밀접한 관련이 있다. 세계 보건 기구에 따르면 2016년도 성인 인구의 13%와 340만 명의 청소년이 비만을 겪는 것으로 나타났다³⁾. 비만 치료를 위해 현재 사용되는 치료제는 phentermine, xenical, mazindol 등이 있으나⁴⁾ 이러한 약물들은 비만 개선 효과가 탁월한 반면에 불면증, 신경과민 및 위장장애 등의 다양한 부작용을 일으킨다고 알려져 있다^{5,6)}. 이에 부작용이 없는 새로운 천연 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

Adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK)는 세포 에너지 균형을 유지하고 간, 지방 및 근육에서 이루어지는 에너지 대사 및 체내 지질과 콜레스테롤의 항상성을 조절하는데 관여한다⁷⁾. 또한, 간의 지방 생성 및 지방산 산화와 밀접한 관련이 있는데, 비만 시 간 조직에서 AMPK는 acetyl-CoA carboxylase (ACC), sterol regulatory element binding protein (SREBP-1) 및 fatty acid synthase (FAS)와 같은 지방 생성에 관여하는 효소의 활성을 조절하여 지방산 합성을 유발하게 된다⁸⁾. 또한, 지방산 산화 및 칼로리 섭취를 증가시키면서 지방산, 콜레스테롤, 이소프레노이드 및 간의 포도당 생합성을 억제하는 연구도 보고되어 있다⁹⁾. 따라서 AMPK를 조절하는 것이 비만을 비롯한 여러 대사 질환 치료에 중요한 표적이 되고 있다.

오미자 (五味子, *Schizandrae Fructus*)는 *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill의 완전한 과실을 건조한 것으로 껍질, 과육 및 과실에서 총 5가지의 맛을 가진다고 하여 오미자라 하며, 껍질과 과육은 달고 시며, 과실은 쓰고 맵고, 전체적으로 짠맛으로 이루어져 있다^{10,11)}. 오미자의 약리효능으로는 치매 예방¹²⁾, 항산화¹³⁾, 항암¹⁴⁾, 항염증¹⁵⁾ 및 항균활성¹⁶⁾ 등의 효과가 다양하게 발표되어 있으며, 오미자에서 분리된 성분으로 schizandrin A, B, C, schizandrol, epigomisin, deoxyschizandrin 등이 있으며¹⁷⁾, 주요 성분인 lignan에서 분리된 gomisin에 대한 연구가 활발히 진행 중이다^{18,19)}.

이에 본 연구에서는 60% 고지방식이로 유도된 비만 마우스에서 오미자 열수 추출물의 항비만 효과 및 작용 기전을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료 추출

본 실험에 사용된 오미자 (*Schizandrae Fructus*)는 옹기 한약국 (Daegu, Korea)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 관능검사 하였으며, 약전규격에 적합한 것을 사용하였다. 오

미자 200 g을 분쇄하여 증류수 2,000 mL를 가한 다음, 열탕 추출기 (DWT-1800T, Daewoong Pharmaceutical Co., Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 100℃에서 2시간 가열 추출 하였다. 그 다음, 50℃의 감압농축장치 (Buchi B-480; Buchi AG, Flawil, Switzerland)로 감압 농축한 후, 동결 건조기 (FD5508; Ilshin Biobase Co., Ltd., Yangju, Korea)를 이용하여 오미자 파우더 (수율 30.2%)를 얻었다. 시료는 -80℃에서 냉동 보관하였다가 *in vitro* 분석 시 증류수에 녹여 사용 하였다.

2) 시약

본 연구에 사용된 L-ascorbic acid는 Thermo Fisher Scientific (Ward Hill, MA, USA)에서 구입하였으며, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), potassium phosphate monobasic, dithiothreitol (DTT), potassium phosphate dibasic, and 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6 4-sulfonic acid) (ABTS)은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Western blot에 사용된 1차 항체 AMP-activated protein kinase (AMPK), sirtuin 1 (Sirt1), peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 α), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT-1A), uncoupling protein 1 (UCP1), uncoupling protein 3 (UCP3), sterol regulatory element-binding protein-1 α (SREBP-1 α), phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (p-ACC), Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), Histone, β -actin은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)로부터 구입하여 사용하였다. phospho-AMP-activated protein kinase (p-AMPK)는 Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 2차 항체는 GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Protease inhibitor mixture, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였으며, ECL western blotting detection reagents와 Nitrocellulose membranes은 GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)로부터 구입하여 사용하였다.

3) 실험 동물

4 주령의 웅성 C57BL/6 mice (DBL, Chungbuk, Korea)를 구입하여 conventional system (온도 22 \pm 2℃, 습도 50 \pm 5%, 명암주기 12시간)으로 조절되는 동물 사육실에서 일반 사료 (조지방 5.0% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조단백질 18% 이상, 조회분 8.0% 이하, 인 0.85% 이상, 칼륨 0.55% 이상, 나트륨 0.25% 이상, 칼슘 1.0% 이상, 마그네슘 0.15% 이상, NIH-41, Zeigler Bros, Inc., Gardners, PA, USA)와 물을 충분히 공급하여 1주일 동안 적응시킨 후 실험을 진행하였다. 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회 (Institutional

Animal Care and Use Committee: IACUC)의 승인 (승인 번호: DHU2021-100)을 받았다.

2. 방법

1) DPPH 및 ABTS radical 소거 활성 측정

시료의 항산화능 분석을 위해 DPPH 자유 라디칼 소거법을 활용하였다²⁰⁾. 농도별로 희석한 오미자 열수 추출물 100 μ L와 60 μ M DPPH 용액 100 μ L를 각각 plate에 분주하여 혼합시킨 후 실온의 암실에 30분간 반응시켰으며 Microplate reader (540 nm)로 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid는 양성 대조군으로 사용되었으며, 아래의 식에 흡광도를 대입하여 산출된 라디칼 소거 활성이 50% 저해된 농도의 값을 IC₅₀로 표기하였다.

오미자 열수 추출물의 항산화능 분석을 위해 ABTS 라디칼 소거법을 활용하였다²¹⁾. 2.4 mM potassium persulfate와 7 mM ABTS를 혼합하여 약 16시간 동안 실온의 암실에서 반응시켜 ABTS⁺을 형성시켜주었다. 이를 흡광도 415 nm에서 측정하여 0.70 \pm 0.02의 값이 되도록 에탄올을 사용하여 희석하였다. 시료 5 μ L와 희석한 ABTS 용액 95 μ L를 혼합한 후 15분간 반응시킨 다음 Microplate reader (415 nm)로 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid는 양성대조군으로 사용되었으며, 아래의 식에 흡광도를 대입하여 산출된 라디칼 소거 활성이 50% 저해된 농도의 값을 IC₅₀로 표기하였다.

DPPH and ABTS radical scavenging activity(%)

$$= \left[1 - \left(\frac{OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{control}}} \right) \right] \times 100$$

Absorbance value of sample; OD_{sample}

Absorbance value without sample; OD_{control}

2) 비만 동물 유발 및 식이 섭취

본 실험은 6주 동안 진행되었으며, 실험군은 4군으로 다음과 같다. 일반사료를 섭취한 정상군 (Normal), 60% 고지방식이 (60% High-fat Diet)를 공급받은 대조군 (Control), 0.5% 가르시니아 캄보지아가 첨가된 60% 고지방식이를 섭취한 양성대조군 (GG), 0.5% 오미자 열수 추출물이 첨가된 60% 고지방식이를 섭취한 군 (SCW). 오미자의 용량은 오미자에 대한 기존 연구를 참고하여 실험을 진행하였다²²⁾. 매일 일정한 시간과 조건에서 체중과 식이량을 측정하였으며, 부검 전날 15시간 절식을 마친 후, isoflurane으로 흡입마취하여 심장에서 혈액을 채취하였고, 간 조직을 적출하였다. 채취한 혈액을 4,000rpm, 4 $^{\circ}$ C 및 10분 조건으로 원심분리하여 혈청을 분리하였으며, 혈청과 간 조직은 -80 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관하였다. 식이효율 (Food efficiency ratio, FER)은 아래 식에 대입하여 산출하였다.

식이효율 (Food efficiency ratio, FER)

$$\text{식이효율 (\%)} = \text{체중 증가량} / \text{사료 섭취량} \times 100$$

3) 체중 증가량

동물의 체중은 1일 1회 일정한 조건에서 전자체중계를 이용하여 측정하였으며, 체중 증가량 (body weight gain)은 실험 마지막 날 측정된 체중 값에서 실험 개시 전의 체중을 제하여 계산하였다.

4) 혈청 내 비만 관련 바이오마커 분석

혈청 내 비만 관련 바이오마커인 TG (triglyceride), TC (total cholesterol)는 assay kit (Asanpharm Co., Ltd, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다.

5) 간 조직 Western blotting

간 조직에 1.5 M sucrose, pH 7.4 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 5 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, protease inhibitor cocktail, 0.1 M DTT를 혼합한 buffer A를 넣어주고 tissue grinder (BioSpec Product, Bartlesville, OK, USA)를 이용하여 분쇄한 후 아이스 위에서 30분간 정치시켜주었다. 그런 다음, 10% NP-40를 첨가한 후 원심분리 (12,000 rpm, 2분, 4 $^{\circ}$ C)하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 세포질을 분리하고 남은 pellet 에 washing buffer (10% NP-40를 첨가한 buffer A) 200 μ L로 2회 헹구고 50 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF 및 10% glycerol를 혼합한 buffer C 100 μ L를 넣어 10분마다 vortex를 3회 반복하였으며, 원심 분리 (12,000 rpm, 10분, 4 $^{\circ}$ C)하여 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관하였다. 간 조직의 세포질에서 AMPK, p-AMPK, Sirt1, CPT-1A, UCP1, UCP3, p-ACC, ACC, FAS 및 β -actin과 핵에서 PGC-1 α , PPAR α , SREBP-1과 Histone 단백질 발현을 측정하기 위한 방법은 다음과 같다. 12 μ g의 단백질을 8-14% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였으며 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 단백질을 이동시켰다. Membrane에 1차 항체 (1:1,000)를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척해 주었다. 처리된 1차 항체에 적합한 2차 항체 (1:3,000)를 사용하여 상온에서 2시간 반응시킨 후, membrane을 PBS-T로 6분마다 5회 세척해 주었다. Enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에 충분히 노출시킨 후 Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd, Seoul, Korea)으로 membrane의 단백질 발현을 확인하였으며, band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)프로그램을 사용하여 정량해주었다. 그런 다음 각각의 단백질 수준을 정상군의 단백질 수준으로 나누는 후 상대적 비로 나타내었다.

6) 조직병리학적 분석

조직병리학적 분석은 간 조직의 Oil Red O (ORO) 염색과 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 통해 분석되었다. ORO 염색은 간 조직을 Probe-On-Plus Slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 7 μ m로 절단하고 slide에 부착하였으며, 60 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 ORO 완충액과 반응시킨 다음 3분간 85% propylene glycol을 사용

하여 반응시켰다. 그 후, washing하여 harris hematoxylin 염색을 진행하였으며, 광학현미경 (DSCHX50V, Sony, Tokyo, Japan)으로 조직병리학적 변화를 관찰하였다. H&E 염색은 10% neutral buffered formalin에 조직을 24시간 동안 고정시킨 다음, graded alcohol을 사용하여 탈수시켰으며, 파라핀으로 포매한 후 block을 제작하였고, 3 μm 두께의 조직 절편을 제작하였다. 그 다음 hematoxylin과 eosin으로 염색하였으며, xylene clearing을 거쳐 permount로 처리한 후 광학현미경을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

7) 통계분석

실험에서 사용된 값들은 *in vitro*의 수치에서 평균과 표준오차 (mean \pm SEM), *in vivo*의 수치에서 평균과 표준편차 (mean \pm SD)로 표시하였으며, SPSS program for windows version 26 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)로 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하였으며,

각 군의 평균 차이에 대한 유의수준을 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 에서 검증하였다.

III. 결 과

1. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성 측정

오미자 열수 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정하였다. DPPH 자유 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, L-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 $1.11 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 오미자 열수 추출물의 IC_{50} 값은 $194.42 \pm 0.71 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, L-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 $2.91 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 오미자 열수 추출물의 IC_{50} 값은 $289.45 \pm 4.99 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다 (Fig. 1).

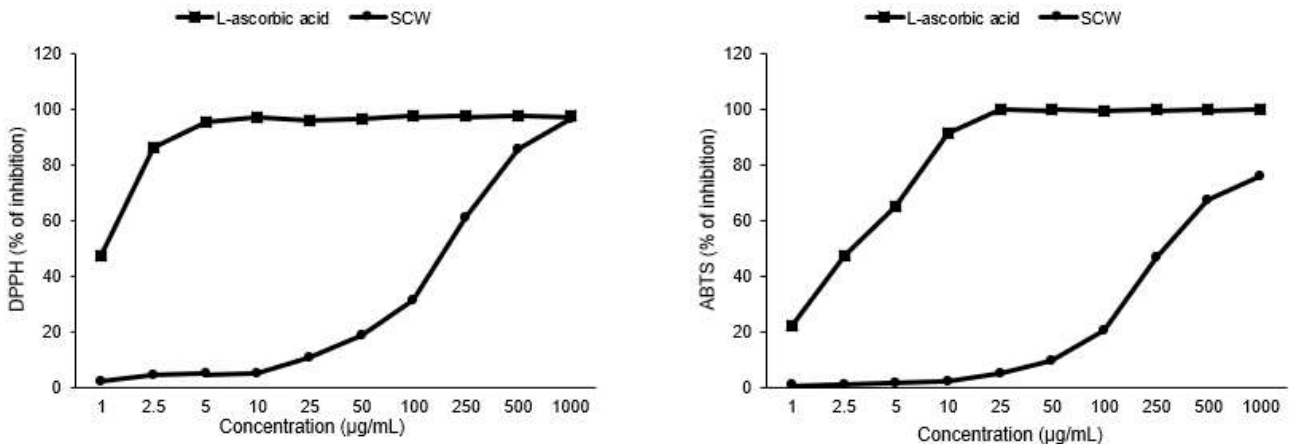


Fig. 1. Scavenging activity of Schizandrae Fructus water extract on DPPH and ABTS radical. All values are expressed as mean \pm SEM of 3 replications.

2. 체중 증가량 및 식이효율

실험 기간 동안의 체중 증가량을 분석한 결과는 다음과 같다. 정상군과 비교하여 대조군의 체중 증가량은 약 2배 정도 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.001$). 반면에 대조군과 비교하여 GG군과 SCW군의 체중 증가량은 약 19% 정도 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$).

실험 기간 동안 섭취한 식이를 측정하여 식이효율을 나타낸 결과는 다음과 같다. 정상군과 비교하여 대조군에서 3배 정도 유의성 있게 증가하였으나 ($p < 0.001$), 대조군과 비교하여 GG군과 SCW군에서는 각각 7%, 12% 유의성 있게 감소하였다 (GG, $p < 0.05$; SCW, $p < 0.01$)(Fig. 2).

3. 혈청 내 비만 관련 바이오마커 분석

혈청 내 TG와 TC (mg/dL)를 측정된 결과는 다음과 같다. TG는 정상군과 비교하여 대조군에서 71% 정도 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.001$). 반면에, 대조군과 비교하여 GG군은 19% ($p < 0.001$), SCW군은 22% ($p < 0.001$) 유의성 있게 감소하였다. TC는 정상군과 비교하여 대조군에서 77% 정도 유의성 있게 증가하였으나 ($p < 0.001$), 대조군과 비교하여 GG군과 SCW군은 각각 15%, 13% 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.001$) (Fig. 3).

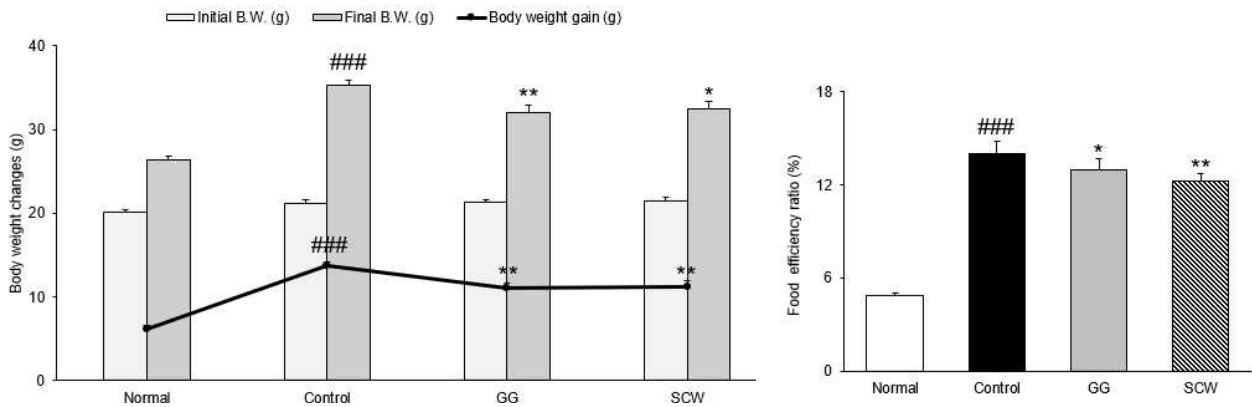


Fig. 2. Body weight change, and food efficiency ratio in 60% HFD-fed Obese mice. All data are expressed mean \pm SD (n=8 per group). Mice were divided into 4 groups: Normal, normal mice; Control, 60% HFD-fed mice; GG, the mice fed HFD supplemented with 0.5% *Garcinia gummi-gutta*; SCW, the mice fed HFD supplemented with 0.5% Schizandrae Fructus water extract. Significance: ### $p < 0.001$ versus Normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus Control group.

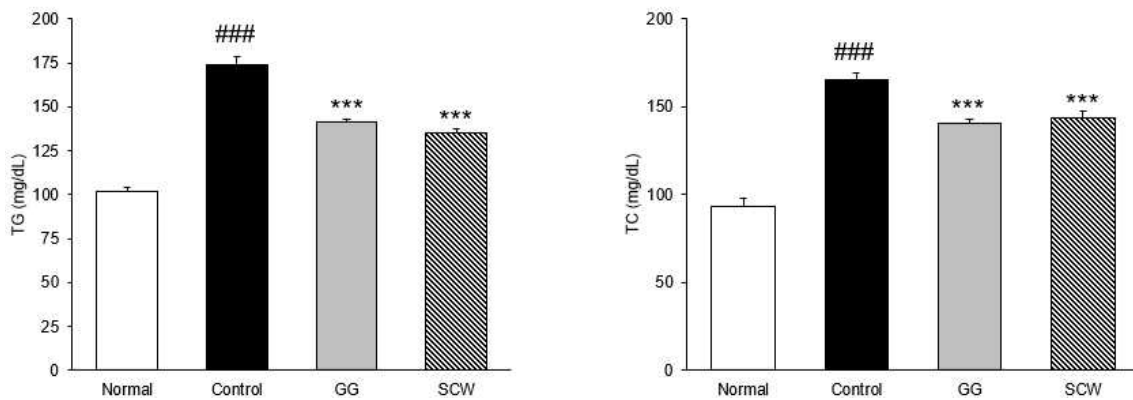


Fig. 3. Effects of Schizandrae Fructus water extract on serum TG and TC levels in 60% HFD-fed obese mice. All data are expressed mean \pm SD (n=8 per group). Mice were divided into 4 groups: Normal, normal mice; Control, 60% HFD-fed mice; GG, the mice fed HFD supplemented with 0.5% *Garcinia gummi-gutta*; SCW, the mice fed HFD supplemented with 0.5% Schizandrae Fructus water extract. Significance: ### $p < 0.001$ versus Normal group and *** $p < 0.001$ versus Control group.

4. AMPK/Sirt1/PGC-1 α 단백질 분석

간 조직 내 p-AMPK, Sirt1 및 PGC-1 α 단백질 분석 결과는 다음과 같다. p-AMPK, Sirt1 및 PGC-1 α 는 정상군과 비교하여 대조군에서 각각 20%, 22% 및 34% 정도 유의성 있게 감소하였다 (p-AMPK, $p < 0.05$; Sirt1, $p < 0.01$; PGC-1 α , $p < 0.01$). 반면에, GG군과 SCW군은 p-AMPK, Sirt1 및 PGC-1 α 단백질 발현이 정상군의 수준으로 증가하였다 (p-AMPK, $p < 0.05$; Sirt1 and PGC-1 α , $p < 0.01$) (Fig. 4).

5. 지방산 산화 관련 단백질 분석

간 조직 내 PPAR α , CPT-1A, UCP1 및 UCP3와 같은 지방산 산화 관련 단백질 분석 결과는 다음과 같다. 정상군과 비교하여 대조군에서 각각 24%, 26%, 17% 및 16% 정도 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$). 반면에, 대조군과 비교하여 GG군과 SCW군은 PPAR α 의 발현이 24% 가량 증가하였으며 (GG, $p < 0.05$; SCW, $p < 0.01$), CPT-1A의 발현은 각각 30%, 27% 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.05$). 또한, UCP1 ($p < 0.05$)와 UCP3 (GG, $p < 0.05$; SCW, $p < 0.01$)의 발현은 정상군의 수준까지 증가하였다 (Fig. 5).

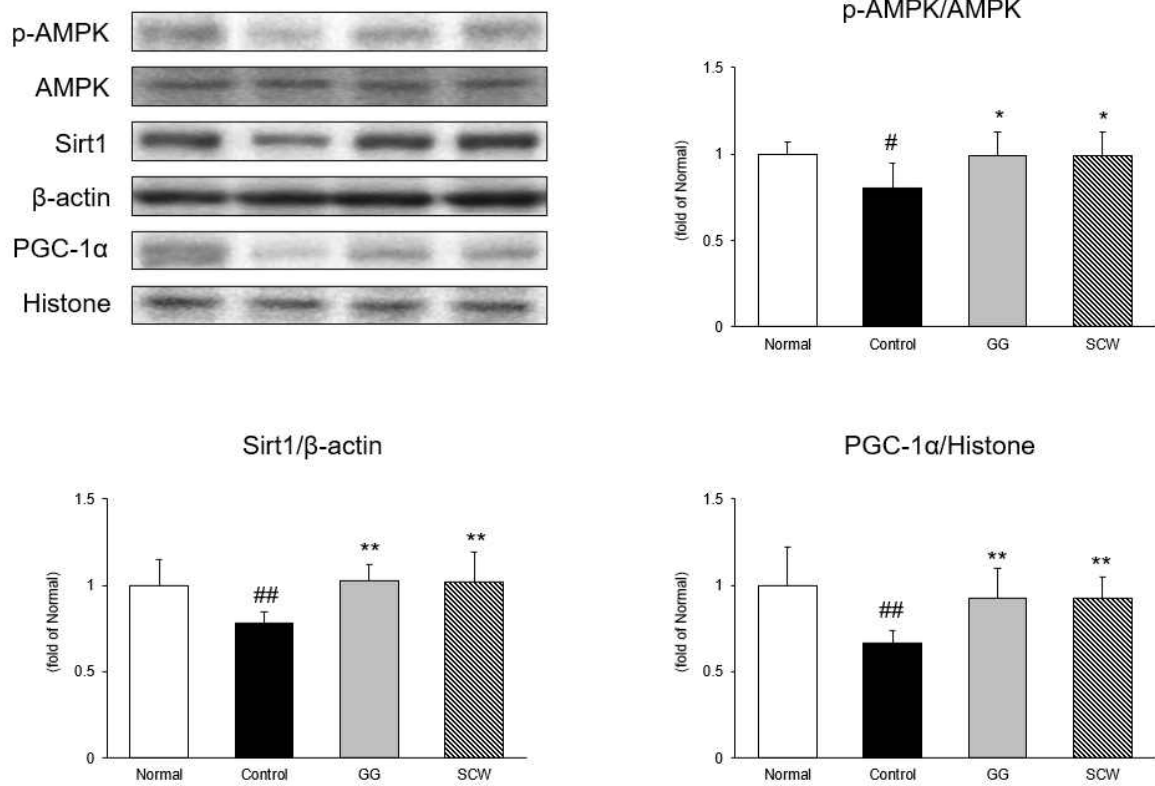


Fig. 4. Effects of Schizandreae Fructus water extract on AMPK/Sirt1/PGC-1 α proteins in liver tissue.

All data are expressed mean \pm SD (n=8 per group). Mice were divided into 4 groups: Normal, normal mice; Control, 60% HFD-fed mice; GG, the mice fed HFD supplemented with 0.5% *Garcinia gummi-gutta*; SCW, the mice fed HFD supplemented with 0.5% Schizandreae Fructus water extract. Significance: # p < 0.05 and ## p < 0.01 versus Normal group and * p < 0.05, ** p < 0.01 versus Control group.

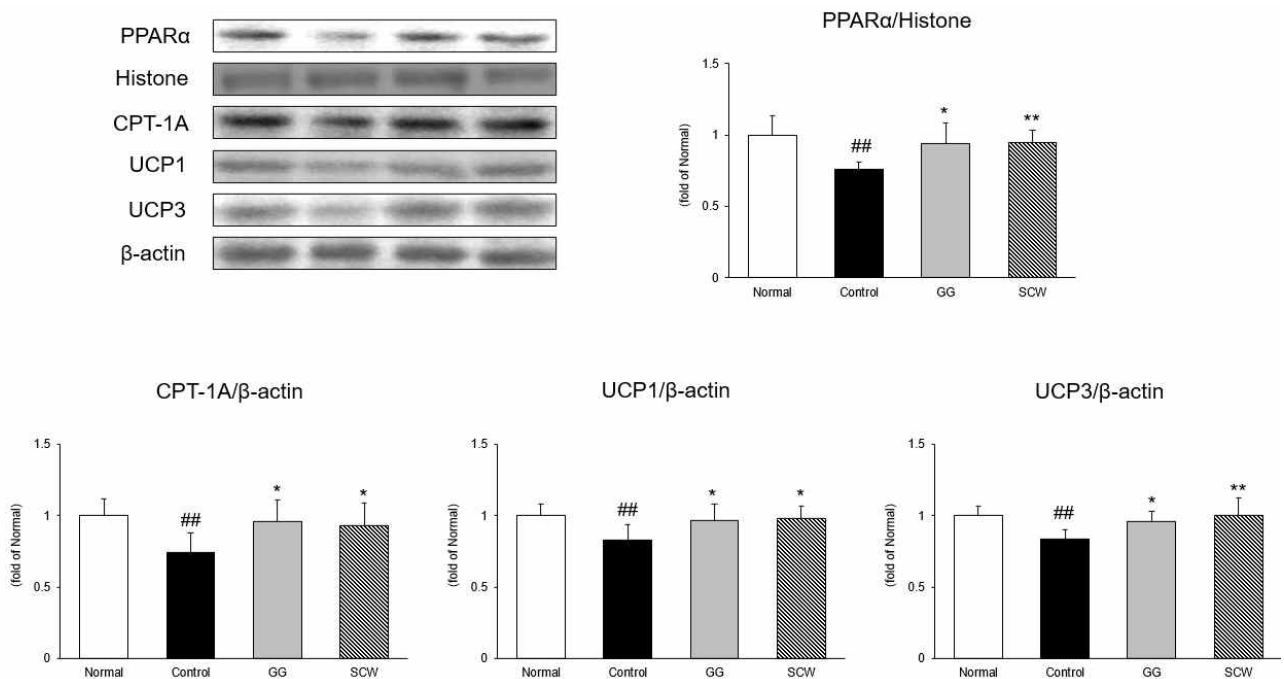


Fig. 5. Effects of Schizandreae Fructus water extract on fatty acid oxidation related proteins in liver tissue.

All data are expressed mean \pm SD (n=8 per group). Mice were divided into 4 groups: Normal, normal mice; Control, 60% HFD-fed mice; GG, the mice fed HFD supplemented with 0.5% *Garcinia gummi-gutta*; SCW, the mice fed HFD supplemented with 0.5% Schizandreae Fructus water extract. Significance: ## p < 0.01 versus Normal group and * p < 0.05, ** p < 0.01 versus Control group.

6. 지방산 합성 전사인자 및 단백질 분석

간 조직 내 지방산 합성 전사 인자인 SREBP-1과 관련 단백질인 p-ACC와 FAS의 단백질 분석 결과는 다음과 같다. SREBP-1은 정상군과 비교하여 대조군은 29% 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.01$). 반면에, 대조군 대비 GG군과 SCW군은 각각 17%, 19% 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$).

p-ACC는 정상군과 비교하여 대조군에서 27% 정도 유의성 있게 감소하였으나 ($p < 0.01$), 대조군 대비 GG군과 SCW군에서 약 29% 정도 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.05$). FAS의 발현은 정상군과 비교하여 대조군에서 59% 정도 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.001$). 반면에, 대조군과 비교하여 GG군과 SCW군에서 각각 21%, 17% 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$) (Fig. 6).

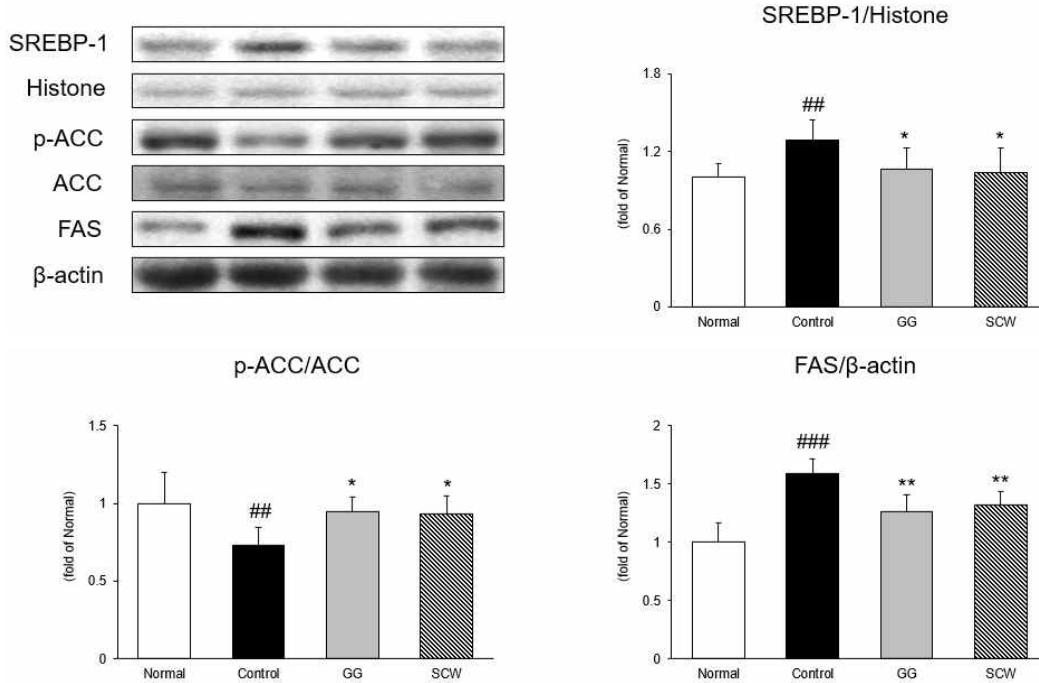


Fig. 6. Effects of Schizandrae Fructus water extract on fatty acid synthesis related proteins in liver tissue. All data are expressed mean \pm SD (n=8 per group). Mice were divided into 4 groups: Normal, normal mice; Control, 60% HFD-fed mice; GG, the mice fed HFD supplemented with 0.5% *Garcinia gummi-gutta*; SCW, the mice fed HFD supplemented with 0.5% Schizandrae Fructus water extract. Significance: ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ versus Normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus Control group.

7. 조직병리학적 분석

간 조직을 이용한 ORO 염색과 H&E 염색을 시행한 결과는 다음과 같다. ORO 염색에서 정상군 대비 대조군은 고지방식이 섭취로 인한 지방 축적이 현저히 나타난 것을 확인할 수 있었으나, 대조군과 비교하여 GG군과 SCW군의 경우, 약물이 첨

가된 식이 섭취로 인해 지방 축적이 억제된 것으로 나타났다. 또한, H&E 염색에서 정상군과 비교하여 대조군에서 고지방식이 섭취로 인해 간 조직 내 다량의 지질 방울이 나타난 반면에, GG군과 SCW군은 약물이 첨가된 식이 섭취로 인해 간 조직 내 지질 방울의 생성이 억제된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

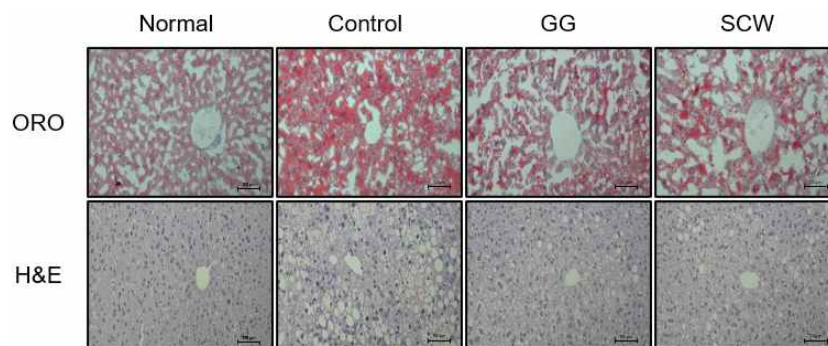


Fig. 7. Effect of Schizandrae Fructus water extract on histopathological analysis in liver tissue. (Original magnification \times 200, magnification bar = 100 μ m). Mice were divided into 4 groups: Normal, normal mice; Control, 60% HFD-fed mice; GG, the mice fed HFD supplemented with 0.5% *Garcinia gummi-gutta*; SCW, the mice fed HFD supplemented with 0.5% Schizandrae Fructus water extract.

IV. 고 찰

비만은 유전 및 환경적 요인에 의해 유발되는 영양 및 대사 장애로 체내에 과도하게 지방이 축적되며 체내 에너지 소비량과 섭취량의 불균형으로 인하여 발생한다. 1975년부터 2015년까지의 1,920만 인구를 대상으로 한 연구에 따르면, 전 세계적으로 BMI 지수가 남성의 경우 21.7에서 24.2 kg/m², 여성의 경우 22.1에서 24.4 kg/m²로 증가하였다고 밝혔다²³. 비만은 높은 발병률을 나타내며 간지방증, 심혈관 질환, 이상지질혈증, 고혈압, 당뇨병, 골관절염, 뇌졸중 및 특정 유형의 암과 같은 질병을 초래하여 최근 심각한 공중 보건 문제로 언급되고 있다²⁴.

오미자 (五味子, *Schizandrae Fructus*)는 한의학적으로 약성이 따뜻하지만燥하지 않아서 肺·心·腎에 작용하여 상부로는 肺氣를 거두고 하부로는 腎陰을 滋하며, 澀精止瀉, 止汗 및 生津와 같은 효능을 나타낸다고 알려져 있다²⁵. 또한, 東醫寶鑑에서는 몸이 여윈 것을 보하며 눈을 밝게 하고, 消渴, 煩熱 및 숨이 찬 것을 치료한다고 기록되어 있다²⁶. 오미자에 대한 중추신경계의 흥분 및 억제 조절, 혈액순환 개선, 위액 분비 조절 작용 및 간 해독 작용과 비롯한 다양한 약리 효능이 보고되어 있다²⁷. 이 외에도 FXR/Fgf15 신호 전달의 약리학적 활성화를 통한 고지방식이 유발 대사 장애 개선²⁸, histone acetyltransferase (HAT) 활성 억제를 통한 고지방식이 유발 대사 장애 개선²⁹ 등과 같이 항비만과 관련하여 여러 연구가 진행 중에 있지만, 여러 대사 질환의 주요 표적 인자인 AMPK를 조절을 통한 항비만 효과에 대한 연구는 밝혀지지 않았다. 이에 본 연구에서는 고지방 식이로 유발한 비만 마우스 모델에서 오미자 열수 추출물의 AMPK/Sirt1/PGC-1 α 신호 전달 경로를 통한 항비만 효과에 대한 연구를 진행하였다.

우선 이번 연구는 오미자 열수 추출물의 *in vitro* 항산화능을 측정 한 후 진행하였으며, *in vivo* 동물 실험을 통해 고지방 식이 유발 비만 마우스 모델에서 오미자 열수 추출물의 AMPK/Sirt1/PGC-1 α 신호 전달 경로를 통한 비만 개선 효과를 알아보았다. 6주간 60% 고지방 식이를 섭취한 비만 마우스에서 혈청 내 비만 바이오마커를 측정하였으며, western blot을 통한 간 조직 내 AMPK/Sirt1/PGC-1 α 단백질, 지방산 산화 관련 단백질 및 지방산 합성 단백질의 발현을 분석하였다.

6주간의 체중 변화는 정상군과 비교하여 고지방 식이를 섭취한 대조군에서 체중 증가가 현저히 나타났으며, 대조군과 비교하여 GG군과 SCW군은 체중 증가가 억제됨을 확인할 수 있었다. 비만에서는 지방 축적을 위해 지방 세포의 수와 크기가 증가하며, 지방세포는 중성 지방과 콜레스테롤의 주요 저장 장소이다³⁰. 본 연구에서는 비만의 지표로서 중성 지방의 하나인 triglyceride (TG)와 total cholesterol (TC)의 수치를 측정하였으며, 고지방 식이만을 섭취한 대조군과 비교하여 GG군과 SCW군에서 TG 및 TC 수치가 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 오미자 열수 추출물이 지방 축적과 관련된 비만 지표인 TG와 TC를 억제함으로써 비만을 개선시킬 것으로 판단된다.

AMP-activated protein kinase (AMPK)는 에너지 대사를 조절하는 중요한 역할을 하며, 활성화된 AMPK 효소는 지방 생성 및 억제의 균형을 조절함으로써 최근 비만 연구에서 중요한 표적이 되고 있다^{31,32}. Sirtuin 1 (Sirt1)은 지방 조직,

간 및 췌장을 비롯한 여러 조직에서 포도당과 지방 대사에 중요한 역할을 하며, 이러한 Sirt1이 비만 및 대사 기능 장애를 약화시킬 수 있다고 보고되어 있다³³. AMPK는 Sirt1 활성을 향상시켜 전사 인자인 peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α)의 활성을 조절한다³⁴⁻³⁶. 본 연구에서는 비만의 주요 표적 인자인 p-AMPK, Sirt1 및 PGC-1 α 의 단백질 발현을 분석하였으며, 고지방 식이를 섭취한 대조군 대비 GG군과 SCW군에서 유의한 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 오미자 열수 추출물이 지질 대사에 필수적인 인자로 알려진 p-AMPK, Sirt1 및 PGC-1 α 의 발현을 조절함으로써 항비만 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)는 α -, β -, γ 와 같은 다른 동형 단백질을 가지고 있으며³⁷, 이 중 PPAR α 의 전사가 AMPK에 의해 활성화되는 것으로 보고되어 있다. PPAR α 는 CPT-1A, UCP1 및 UCP3를 비롯한 미토콘드리아 지방산 산화 경로와 관련된 단백질 발현에 있어 중요한 역할을 하며 지방산 이화 작용에 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다³⁸. 따라서, 이러한 PPAR α 와 지방산 산화에 필수적인 효소인 CPT-1A, UCP1 및 UCP3의 발현을 분석한 결과, 고지방 식이를 섭취한 대조군과 비교하여 GG군과 SCW군에서 유의한 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 오미자 열수 추출물이 지방산 산화 단백질을 조절함으로써 비만을 개선시킬 것으로 판단된다.

Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs)은 TG, cholesterol, 지방산 및 인지질 합성에 필요한 여러 효소의 발현을 조절함으로써 지질 생합성과 지방 생성에 밀접한 관련이 있다³⁹. 지방산 합성 과정의 주요 조절자인 SREBP-1 및 fatty acid synthase (FAS)는 지방산 및 TG 합성과 관련된 전사 인자를 활성화하여 간의 TG 침착을 증가시킨다⁴⁰. 최근 FAS의 억제는 암을 비롯한 질병과 비만 치료를 위한 표적으로 연구되고 있으며, 오미자로부터 분리된 성분인 dibenzocyclooctadiene lignans이 FAS의 억제를 통하여 항비만 효과를 나타낸다는 보고되고 있다⁴¹. 따라서 본 연구에서 지방 생합성과 관련된 전사 인자인 SREBP-1, p-ACC 및 FAS 단백질 발현을 분석한 결과 유의한 결과를 얻었다.

이러한 결과를 미루어 볼 때, 오미자 열수 추출물은 고지방 식이로 유도한 마우스에서 TG와 TC를 개선시킬 뿐만 아니라, AMPK/Sirt1/PGC-1 α 신호 전달 경로의 활성화를 통해 지방산 산화 단백질의 발현을 증가시키고 지방 생합성 관련 단백질을 조절함으로써 비만을 개선시키는 것으로 판단된다.

V. 결 론

본 연구에서는 고지방 식이로 유발한 비만 동물 모델에 오미자 열수 추출물을 6주간 급여한 후 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 오미자 열수 추출물은 고지방 식이로 유발한 비만 동물에서 체중 증가를 유의하게 억제하였다.

2. 오미자 열수 추출물은 고지방 식이로 유발한 비만 동물의 혈청 내 비만 관련 바이오마커인 TG와 TC의 수준을 유의성 있게 감소시켰다.
3. 오미자 열수 추출물은 고지방 식이로 유발한 비만 동물의 간 조직 내 AMPK/Sirt1/PGC-1 α 단백질의 발현을 유의성 있게 증가시켰다.
4. 오미자 열수 추출물은 고지방 식이로 유발한 비만 동물의 간 조직 내 지방산 산화 관련 단백질인 PPAR α , CPT-1A, UCP1 및 UCP3 단백질의 발현을 유의성 있게 증가시켰다.
5. 오미자 열수 추출물은 고지방 식이로 유발한 비만 동물의 간 조직 내 지방산 합성 관련 단백질인 SREBP-1과 FAS 단백질의 발현을 유의성 있게 감소시켰으며, p-ACC 단백질의 발현을 유의성 있게 증가시켰다.
6. 간 조직의 ORO와 H&E 염색을 통해 오미자 열수 추출물의 급여가 과다하게 생성된 지방 축적과 지질 방울의 생성을 현저히 감소시켰다.

종합적으로 오미자 열수 추출물이 고지방 식이로 유발한 비만 마우스에서 AMPK/Sirt1/PGC-1 α 신호 전달 경로의 조절을 통해 지방산 합성을 억제하고, 지방산 산화를 촉진함으로써 비만을 억제하여 항비만 효과를 나타낸 것으로 판단되며, 비만의 새로운 치료제 개발에 후보 소재로서 사용될 가능성을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업 (과제번호: PJ014251022 021)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Tang R, Liu H, Yuan Y, Xie K, Xu P, Liu X, Wen J. Genetic factors associated with risk of metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8:35403-35411.
2. Solomon CG, Manson JE. Obesity and mortality: a review of the epidemiologic data. *Am J Clin Nutr*. 1997;66(4):1044S-1050S.
3. Lee JH, Park SK, Oh NE, Park JH, Kwon MJ, Seo JM, Roh SH. Oral intake of *Lactobacillus plantarum* L-14 extract alleviates TLR2 and AMPK-mediated obesity associated disorders in high-fat-diet-induced obese C57BL/6J mice. *Cell Prolif*. 2021;54(6):e13039.
4. Lee DS, Lee MH, Kim HS, Jeong TR, Hyun HS, Lee JM. Anti-Obesity Effect of Pine Cone (*Pinus koraiensis*) Supercritical Extract in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *In Vivo*. 2016;45(12):1701-1707.
5. Reddy P, Chow MSS. Focus on orlistat: A nonsystemic inhibitor of gastrointestinal lipase for weight reduction in the management of obesity. *Formulary*. 1998;33(10):943-959.
6. Kang JG, Park CY. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes Metab. J*. 2012;36:13-25.
7. Woods A, Williams JR, Muckett PJ, et al. Liver-specific activation of AMPK prevents steatosis on a high-fructose diet. *Cell Rep*. 2017;18(13):3043-3051.
8. Goldstein JL, Brown MS. From fatty streak to fatty liver: 33 years of joint publications in the *JCI*. *J. Clin. Investig*. 2008;118(4):1220-1222.
9. Bijland S, Mancini SJ, Salt IP. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clin. Sci*. 2013;124:491-507.
10. Mok C. Quality characteristics of Instant Tea prepared from spray-dried Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts/grape juice mixture. *Food Eng. Prog*. 2005;9(3):226-230.
11. Hong YH, Yuhp PC, Shuenn JS, Chau SH, Chien CC, Sien CC. *Oriental Materia Medica*, Oriental Healing Arts Institute, California, UKroemer G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med*. 1986;3:614-620.
12. Hung TM, Na MK, Min BS, Ngoc TM, Lee IS, Zhang XF, Bae KH. Acetylcholinesterase inhibitory effect of lignans isolated from *Schizandra chinensis*. *Arch Pharm Res*. 2007;30:685-690.
13. Choi YH, Takamatsu S, Khan SI, Srinivas PV, Ferreira D, Zhao J, Khan IA. Schisandrene, a dibenzocyclooctadiene lignan from *Schizandra chinensis*: structure-antioxidant activity relationships of dibenzocyclooctadiene lignans. *J Nat Prod*. 2006; 69:356-359.
14. Yim SY, Lee YJ, Lee YK, Jung SE, Kim JH, Kim JE, Kim HJ, Son BG, Park YH, Lee YG, Choi YW, Hwang DY. Gomisins N isolated from *Schizandra chinensis* significantly induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects in hepatic carcinoma. *Mol Med Report*. 2009;2(5):725-732.
15. Chen N, Chiu PY, Ko KM. Schisandrin B enhances cerebral mitochondrial antioxidant status and structural integrity, and protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Biol Pharm Bull*. 2008;31:1387-1391.

16. Chang HS, Choi II. Antimicrobial activities of medicinal herb extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012;41261–41269.
17. Bao TT, Xu GF, Liu GT, Sun RH, Song ZY. Comparison of the pharmacological actions of 7 constituents isolated from fructus schizandrae. *J. Chin. Med*. 1979;14(1): 1–7.
18. Kim NK, Lee SY, Kang JJ, Kwon TK, Khang DW, Kim SH, Gomisin M2 alleviates psoriasis-like skin inflammation by inhibiting inflammatory signaling pathways. *Mol. Med. Rep*. 2021;24(6):859.
19. Ko YH, Jeong MR, Jang DS, Choi JH, Gomisin L1, a Lignan Isolated from Schisandra Berries, Induces Apoptosis by Regulating NADPH Oxidase in Human Ovarian Cancer Cells. *Life (Basel)*. 2021;11(8):858.
20. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181(4617): 1199–1200.
21. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice–Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 1999; 26(9–10): 1231–1237.
22. Choi EO, Kwon DH, Kim MY, Hwang BH, Kim HJ, Ahn KI, Jeong JW, Lee KW, Kim KY, Kim SG, Choi YH, Hong SH, Park C, Choi YH. Single Dose Oral Toxicity Test of Ethanol Extracts of Schisandrae fructus and Mori folium, and their Mixture in ICR Mice. *Journal of Life Science*. 2016;26(10):1207–1213.
23. NCD Risk Factor Collaboration (NCD–RisC) Trends in adult body–mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population–based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*. 2016;387:1377–1396.
24. Mayoral LP, Andrade GM, Mayoral EP, Huerta TH, Canseco SP, Rodal Canales FJ, Cabrera–Fuentes HA, Cruz MM, Pérez Santiago AD, Alpuche JJ, Zenteno E, Ruíz HM, Cruz RM, Jeronimo JH, Perez–Campos E. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian J. Med. Res*. 2020;151:11–21.
25. Chang J, Xie J. Total synthesis of schizandrin, the main active ingredient isolated from the Chinese herbal medicine fructus schizandrae. *Yao Xue Xue Bao*. 1998;33(6):424–428.
26. Go BS, Park SK, Choi SB, Jeon DH, Choi MK, Park SM. A Study on Hypoglycemic Effects of Crude Extracts of Schizandrae Fructus. *Appl Biol Chem*. 2004;47(2):258–264.
27. Ju EJ. Effects of Fructus Schisandrae Water Extract on Cultured Mouse Myocardial Cells Induced by Xanthine Oxidase/Hypoxanthine. *The Korean journal of nutrition*. 2000;33(7):739–744.
28. Gu M, Song H, Li Y, Jiang Y, Zhang Y, Tang Z, Ji G, Huang C. Extract of Schisandra chinensis fruit protects against metabolic dysfunction in high–fat diet induced obese mice via FXR activation. *Phytotherapy Research*. 2020;34(11):3063–3077.
29. Chung MY, Shin EJ, Choi HK, Kim SH, Sung MJ, Park JH, Hwang JT. Schisandra chinensis berry extract protects against steatosis by inhibiting histone acetylation in oleic acid–treated HepG2 cells and in the livers of diet–induced obese mice. *Nutr Res*. 2017;46:1–10.
30. Eisinger K, Rein–Fischboeck L, Neumeier M, Schmidhofer S, Pohl R, Haberl EM, Liebisch G, Kopp A, Schmid A, Krautbauer S, Buechler C. Alpha–synthropin deficient mice are protected from adipocyte hypertrophy and ectopic triglyceride deposition in obesity. *Experimental and Molecular Pathology*. 2018;104(3):212–221.
31. Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab*. 2009;9:407–416.
32. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hébrard S, Lantier L, Mounier R, Andreelli F, Foretz M. AMP–activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 2010;196: 81–98.
33. Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, Horvath TL, Sinclair DA, Pfluger PT, Tschop MH, Sirtuin 1 and sirtuin 3: Physiological modulators of metabolism. *Physiol. Rev*. 2012;92:1479–1514.
34. Canto C, Gerhart–Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458:1056–1060.
35. Gurd BJ. Deacetylation of PGC-1 α by SIRT1: importance for skeletal muscle function and exercise-induced mitochondrial biogenesis. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2011;36:589–597.
36. Guo A, Li K, Tian HC, Fan Zm Chen QN, Yang YF, Yu J, Wu YX, Xiao Q. FGF19 protects skeletal muscle against obesity-induced muscle atrophy, metabolic derangement and abnormal irisin levels via the AMPK/SIRT-1/PGC- α pathway. *J Cell Mol Med*. 2021;25(1):3585–3600.
37. Ha SK, Kim J, Chae C. Role of AMP–activated protein kinase and adiponectin during development of hepatic steatosis in high–fat diet–induced obesity in rats. *Journal of Comparative Pathology*. 2011;

- 145(1):88-94.
38. Bronner M, Hertz R, Bar-Tana J. Kinase-independent transcriptional co-activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by AMP-activated protein kinase. *The Biochemical Journal*. 2004;384(2):295-305.
 39. Bertolio R, Napoletano F, Mano M, Maurer-Stroh S, Fantuz M, Zannini A, Biciato S, Sorrentino G, Del Sal G. Sterol regulatory element binding protein 1 couples mechanical cues and lipid metabolism. *Nat. Commun*. 2019;10:1326.
 40. Smith BK, Marcinko K, Desjardins EM, Lally JS, Ford RJ, Steinberg GR. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK. *American journal of physiology. Endocrinol. Metabol*. 2016;311(4):E730-E740.
 41. Na MK, Hung TM, Oh WK, Min BS, Lee SH, Bae KH. Fatty acid synthase inhibitory activity of dibenzocyclooctadiene lignans isolated from *Schisandra chinensis*. *Phytotherapy Research*. 2010;24(S2):S225-228.