고지방식이 비만모델에서 防己黃芪湯 합 苓桂朮甘湯의 항비만 효과

김태령 · 김영준 · 우창훈

대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Anti-obesity Effects of *Banggihwnggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* in High Fat Diet Induced Obese Mice Model

Tae-Ryeong Kim, K.M.D., Young-Jun Kim, K.M.D., Chang-Hoon Woo, K.M.D.

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

RECEIVED September 15, 2019

REVISED October 3, 2019

ACCEPTED October 6, 2019

CORRESPONDING TO

Chang-Hoon Woo, Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Daegu Haany University Pohang Korean Medicine Hospital, 411, Saecheonbyeon-daero, Nam-gu, Pohang 37685, Korea

TEL (054) 281-7901

FAX (054) 281-7463

E-mail jungwsungw@hanmail.net

Copyright © 2019 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Objectives This study is to investigate anti-obesity effects of *Banggihwnggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* (BY), an herbal formula, in high fat diet induced obese mice model.

Methods Fourty five male C57Bl/6J mice were randomly assigned to normal group fed with normal research diet (Nor, n=9), high fat diet control group treated with water (Veh, n=9), high fat diet group treated with orlistat (Oris; n=9, Orlistat 40 mg/kg), high fat diet group treated with low concentraion BY (BYL; n=6, BY 0.87 g/kg) and high fat diet group treated with high concentration BY (BYH; n=6, BY 1.74 g/kg).

Results Seven weeks later, antioxidative capacity, body weight, epididymal fat pad and liver weight, reactive oxygen species (ROS), peroxynitrite (ONOO⁻), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (Gpx), heme oxygenase (HO)-1 and histology of liver were evaluated. In the BYH group, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis (3 ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity were more than L-ascorbic acid. Body weight gain were significantly less than Veh group. Epididymal fat pad and liver weight gain were significantly less than Veh group. ROS and ONOO⁻ were significantly less than with Veh group. ALT and AST were significantly less than with Veh group. Total cholesterol, triglyceride and LDL were significantly less, HDL were significantly more than Veh group. SOD, catalase, Gpx, HO-1 significantly increased compared with Veh group. Injury on liver was lesser than Veh group.

Conclusions It can be suggested that BY has anti-obesity effects in high fat diet induced obese mice model. (*J Korean Med Rehabil* 2019;29(4):29-45)

Key words *Banggihwnggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang*, Obesity, High-fat diet, Antioxidants, Dyslipidemia

서론»»»»

비만은 섭취하는 에너지와 소비하는 에너지의 불균형으로 인해 지방이 체내에 과도하게 축적된 상태를 말하

는 것으로 체지방률이 여성은 체중의 30% 이상, 남성은 25% 이상인 경우로 정의한다¹⁾. 임상적으로는 체질량지수 25 kg/m² 이상인 경우를 말하는데 제2형 당뇨병 및 심혈관계 질환의 위험 증가와 대장, 유방, 자궁, 식도, 신

장, 위, 췌장, 담낭, 간 등의 암 발생률 및 사망률을 증가시킨다²⁾.

우리나라에서도 서구화된 식습관과 운동부족으로 비만 인구가 증가하고 있다. 2015년 국민건강영양조사에 따르면 신체활동은 감소하고 지방 섭취는 증가하였으며 성인 비만 유병률(만 19세 이상, 체질량지수 25 이상인 분율)이 10년에 비해 1.9%p 증가하였다³⁾.

비만은 기본적으로 식이요법과 운동을 통해 치료할 수 있지만, 서구화된 식습관 및 도시화와 산업화로 인한 신체활동 감소로 인해 비만 치료에 있어 식이요법과 운동만으로는 관리의 어려움이 있어 약물 요법을 병행하고 있으며, 우리나라에서 약물 요법으로 지방 흡수 저해제로서 orlistat가 주로 사용되고 있으나 소화기계 부작용이 흔하며, 간 손상, 급성 신증, 췌장염의 가능성이 있다⁴⁾.

한의학적으로 비만의 원인을 脾虛, 陽虛, 食積, 痰飲, 瘀血, 肝鬱의 6가지로 나누어 변증하고 있다⁵⁾. 이 중 脾虛와 陽虛는 虛證으로 인한 비만으로 생체에너지 대사 저하로 인해 발생하는 비만으로 볼 수 있다^{6,7)}.

비만 치료에 있어 섭취하는 에너지의 감소뿐만 아니라 소비하는 에너지의 증가를 통해 체지방률을 줄이는 것도 중요한데, 생체 에너지의 대사 축진을 통해 소비 에너지를 증가시킬 수 있다⁸⁾. 생체 에너지의 저하는 氣虛로 인해 濕痰이 정체되어 발생하는 비만으로 볼 수 있다⁹⁾. 脾虛의 경우 부종이 있으며, 피로하고, 몸에 힘이 없어 몸이 무겁고, 잘 먹지 못하고, 복부에 가스가 있으며 더부룩하다⁵⁾. 치료법으로는 健脾하고 利濕하는데 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯을 기본 처방으로 운용할 수 있다¹⁰⁾.

防己黃芪湯은 漢代張仲景의 金匱要略에서 風濕으로 인한 汗出, 惡風, 身重 등의 증상을 치료한다고 기록되어 있다¹¹⁾. 또한 健脾하고 利水하는 효능이 있어 虛證으로 인한 비만치료에 사용된다¹²⁾.

그리고 苓桂朮甘湯은 張仲景의 傷寒論 및 金匱要略에서 痰飲으로 인해 胸脇이 脹滿하고 目眩 등의 증상을 치료한다고 기록되어 있다^{13,14)}. 溫陽시키고 利水하는 효능이 있어 脾의 運化기능이 실조하여 형성된 水濕과 痰飲을 치료한다¹⁵⁾.

그러나 비만형 동물모델에서 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯의 항비만 효과와 관련된 연구가 보고되지 않았기 때

문에, 본 연구에서 고지방식으로 유발된 비만형 동물 모델에 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯을 투여하여 항비만 효과를 평가하였다. 본 실험에서 체중 증가량 및 식이 효율, 혈청 생화학적 검사, 지질검사, 간, 부고환 지방조직의 무게를 측정하고, 지방세포의 병리조직학적 변화를 확인하였으며, 항산화 효과에 대한 분석을 하였다. 이를 통해 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 (Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang, BY)의 처방은 『한방재활의학』에 준하였고¹⁰⁾, 약재는 웅기한약국(대구, 한국)에서 공급받았으며, 1첩 분량은 Table 1과 같다.

2) 실험동물 및 약물투여

오리엔트바이오(성남, 한국)에서 구입한 생후 4주령의 체중 22 g 내외의 수컷 C57BL/6 mice를 사용하였다. 동물은 실험 당일까지 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제 무첨가; 삼양사, 서울, 한국)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2°C, 상대 습도 50±5%, 12시간 명암 주기(light-dark cycle)의 환경에서 1주일간 적응시킨 후 60% 실험식으로 7주간 사육하였다. 몸무게는 1일 1회 같은 시간에 측정하였으며, 약물은 1일 1회 같은 시간에 각 농도에 맞게 증류수에 희석하여 투여하였다. 대구한대학교 동물실험윤리위원회의 승인(DHU2017-072)을 받아 시행하였으며 동물 관리 규정을 준수하였다.

실험군은 각 군별로 난괴법에 의해 9마리씩 5군으로 나누었다.

- ① 정상군(normal mice, Nor): 일반식이를 섭취한 군.
- ② 대조군(high fat diet fed mice, Veh): 60 kcal% 고지방이 함유된 사료를 섭취한 군.
- ③ 양성대조군(high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, Oris): 60 kcal% 고지방 함유 사료를 섭취하

Table I. The Composition of *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang*

Herbal name	Pharmacognostic name	Amount (g)	Source
Hwanggi	<i>Astragali Radix</i>	10.0	Korea
Changchul	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	10.0	China
Baekchul	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	10.0	China
Banggi	<i>Sinomenii Radix</i>	10.0	China
Jeokbokryeong	<i>Poria</i>	10.0	China
Taksa	<i>Alismatis Rhizom</i>	10.0	Korea
Chajeonja	<i>Plantaginis Semen</i>	15.0	China
Gyegi	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	10.0	China
Gamcho	<i>Glycyrrhiza Radix</i>	3.0	China
Total		88.0	

고 양성대조약물인 Orlistat를 40 mg/kg 투여한 군.

- ④ 저농도 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 투여군(high fat diet plus BY 0.87 g/kg body weight, BYL): 60 kcal% 고지방 함유 사료를 섭취하고 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 추출물을 0.87 g/kg 투여한 군.
- ⑤ 고농도 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 투여군(high fat diet plus BY 1.74 g/kg body weight, BYH): 60 kcal% 고지방 함유 사료를 섭취하고 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 추출물을 1.74 g/kg 투여한 군.

3) 시약

본 실험에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), gallic acid, naringin, diethylene glycol, 2,2'-azinobis(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), potassium persulfate, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT)는 Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 혈청 지질 분석을 위한 cholesterol reagent kit, direct high density lipoprotein (HDL)-cholesterol kit, 간기능 분석을 위한 aspartate aminotransferase (AST) assay kit, alanine aminotransferase (ALT) assay kit는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. Superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (Gpx), heme oxygenase (HO)-1, β -actin은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, 2차 항체인 Rabbit IgG antibody, Mouse IgG antibody는 GeneTex, Inc. (San Antonio, TX, USA)에서 구입하였다. Protease inhibitor mixture,

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 또한, Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little Chalfont, UK)에서 구입하였고, ECL Western Blotting Detection Reagents와 nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

4) 실험기기

열탕추출기(대웅바이오키, 괴산, 한국), 전자체중계(카스, 양주, 한국), AE-6530 mPAGE (ATTO Corporation, Tokyo, Japan), Sensi-Q2000 Chemidoc (루젠에스씨아이, 부천, 한국), DWT-1800T (대웅바이오키, 화성, 한국), vortex mixer, 동결건조기(Labconco, Kansas, USA), Deep-freezer (Sanyo Co., Japan), Infinite m200 pro 흡광도 측정기(Tecan, Mannedorf, Switzerland), Incapacitance Meter Tester 600 (IITC Life Science Inc., Wooland and Hills, USA), BX-51 편광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan), 냉장 초고속원심분리기(라보진, 서울, 한국) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 제조

防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 1첩 분량인 88 g에 10배수의 증류수를 가한 뒤 100°C에서 2시간 동안 열수추출하였다. 추출하여 얻은 액을 여과한 후 감압추출장치로

농축하였다. 농축액을 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조시켜 8.7 g의 시료를 취하여 1일 1회 같은 시간에 각 농도에 맞게 증류수에 희석하여 사용하였다. 防己黃芪湯 合 蒼桂朮甘湯 추출물(BY)의 수율은 9.88%였다.

2) 항산화 효과 측정

(1) 총 polyphenol 함량

총 polyphenol 함량은 Folin-Denis법을 이용하였다¹⁶⁾. 각 시료 20 μ L (1 mg/mL)와 증류수 1.58 mL, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ L를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨다. 그 후 20% Na_2CO_3 300 μ L를 더하여 20°C에서 120분 동안 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도 (Multiscan spectrum; Thermo Scientific)를 측정하였다. 이때 총 polyphenol 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

(2) 총 flavonoid 함량

총 flavonoid의 함량 측정은 Davis법을 변형한 방법에 따라 측정하였다¹⁷⁾. 추출한 시료 50 μ L에 diethylene glycol 445 μ L를 잘 섞어준 후, 이 혼합물에 1N-NaOH 5 μ L를 가하여 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 flavonoid 함량은 naringin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

(3) DPPH radical 소거능

추출한 시료의 free radical 소거능 측정을 위해 DPPH법을 이용하였다¹⁸⁾. 각 시료를 농도별로 희석한 용액 100 μ L와 0.2 mm DPPH 용액 100 μ L를 혼합하여 30분간 암소 상태에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 소거능은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료 첨가군의 흡광도를 1/2로 억제하는 IC_{50} 값으로 나타내었으며, L-ascorbic acid를 양성 대조군으로 사용하였다.

(4) ABTS radical 소거능

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 Re 등의 방법을 이용하였다¹⁹⁾. 7 mm ABTS와 2.4 mm의 potassium persulphate을 혼합하여 실온의 암소 상태에서 약 16시간 이상 방치하여 ABTS를 형성시킨 후 415 nm에서 흡광도 값이 0.70 (± 0.02)이 되게 100% ethanol로 희석하였다. 희석된 용액 95 μ L에 시료 5 μ L를 가하여 15분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의

free radical 소거능은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료 첨가군의 흡광도를 1/2로 억제하는 IC_{50} 값으로 나타내었으며, 양성대조군은 L-ascorbic acid를 사용하였다.

3) 고지방식이 조성표

식은 정상군은 일반사료를 공급하였고, 대조군과 약물처리군은 60 kcal%의 고지방이 함유된 고지방식이(D12492; Research Diets, Inc., NJ, USA)를 7주간 공급하였다(Table II).

4) 체중 및 식이섭취량 측정

실험동물의 체중은 매일 오후 2시 동일 조건에서 측정하였고, 실험종료일 체중에서 실험 개시 전의 체중을 빼서 체중증가량(body weight gain [g])을 산출하였다. 식이섭취량은 제공된 사료에서 1주일간 섭취하고 남은 사료량을 제하고 각 실험군의 하루 사료섭취량을 산출하였다. 한편, 각 실험동물의 체중증가량을 동일 사육기간의 사료섭취량으로 나누어 사료효율(food efficiency

Table II. The Ingredients of High Fat Diet

Ingredients	gm (%)	kcal (%)
Protein	(26.2)	(20)
Carbohydrate	(26.3)	(20)
Fat	(34.9)	(60)
Total		(100)
kcal/gm	(5.24)	
Casein, 30 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 H ₂ O	16.5	0
Vitamin mix V100001	10	40
Choline bitartrate	2	0
FD&C blue dye No. 1	0.05	0
Total	773.85	4057

ratio)을 구하였다.

(1) 체중(body weight)

① 체중변화: 매일 오후 2시 측정 및 기록

② 총 체중증가량: Final body weight (g) - Initial body weight (g) = body weight gain (g)

(2) 사료섭취량(food intake)

① 1일 평균 식이 섭취량: Total food intake / days

5) 혈청분석 및 주요 장기 적출

실험동물은 희생시키기 전 12시간 동안 절식시킨 후 isoflurane으로 흡입마취 후 심장에서 채혈하였다. 채혈된 혈액은 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 혈청을 얻었고 혈청은 -80°C에 보관한 후 분석에 사용하였다. 안락사 후 간, 부고환 지방조직을 적출하여 즉시 생리식염수에 행구고 여과지를 이용하여 표면의 물기를 제거한 후 각각 무게를 측정하였다. 혈청의 total cholesterol (TC)와 triglyceride (TG), HDL-cholesterol (HDL-C)은 각각 cholesterol reagent kit와 direct HDL-cholesterol kit를 시약으로 하였다. 한편 TC, HDL-C, TG 수치를 이용하여 다음과 같이 low density lipoprotein (LDL)-cholesterol (LDL-C)을 계산하였다.

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - (\text{HDL-C}) - \text{TG}/5$$

간기능 손상 지표인 AST와 ALT는 각각 AST assay kit, ALT assay kit의 프로토콜에 따라 측정하여 분석하였다.

6) 혈청 내 반응성 산화종 측정

Reactive oxygen species (ROS) 측정은 Kooy 등의 방법을 시행하였다²⁰⁾. 혈청과 25 mm 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Molecular Probes; Eugene, OR, USA)를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 5분씩 35분간 emission 파장 530 nm와 excitation 파장 485 nm를 이용하여 30분간 측정한 산출값을 계산하였다.

Peroxynitrite (ONOO⁻)는 Kooy 등의 연구를 이용하여 측정하였다²⁰⁾. 각 샘플을 pH 7.4의 rhodamine buffer와 5 mm DHR123과 섞은 후 5분간 37°C에서 흔들어 준 후 5분씩 35분간 emission wavelength 535 nm와 excitation wavelength 480 nm를 이용하여 30분간 측정한 산출값을 계산하였다.

7) Western blot 분석

간 조직의 세포질을 얻기 위해 100 mm 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris)-HCl (pH 7.4), 5 mm Tris-HCl (pH 7.5), 2mm MgCl₂, 15 mm CaCl₂, 1.5M sucrose, 0.1M dithiothreito (DTT), protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 2분간 원심분리(12,000 rpm, 2 min, 4°C)하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 행구고 100 mL의 buffer C (50 mm 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazyl] ethanesulfonic acid (pH 7.9), 50 mm KCl, 0.3 mm NaCl, 0.1 mm EDTA, 1 mm DTT, 0.1 mm PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유시킨 뒤 10분마다 3번 vortex 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C에서 냉동 보관하였다. 간 조직의 세포질의 SOD, catalase, Gpx, HO-1, β-actin 단백질의 발현을 측정하기 위하여 10 mg의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight시킨 다음 phosphate buffered saline with tween 20 (PBS-T)로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체(PBS-T로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence에 노출시킨 후 Sensi-Q2000 Chemidoc에 감광시켜 단백질 발현을 확인하였고, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)를 사용하여 정량하였다.

8) 조직학적 분석

실험 종료 후 적출한 간 조직에 대한 조직병리학적 관찰을 수행하기 위해 조직을 10% neutral buffered formalin에 24시간 동안 고정시킨 다음 graded alcohol로 탈수시키고 파라핀으로 포매하여 block을 제작한 다음 microtome으로 4 mm 두께의 조직절편을 제작하여 hematoxylin & eosin (H&E) 염색 및 Oil red-O 염색을 시행한 뒤 xylene clearing을 거쳐 permount로 처리한 후 광학현미경

위에서 간 조직에 대한 특이 병변의 유무를 관찰하였다.

9) 통계처리

SPSS for windows version 22 (IBM Co., Armonk, NY, USA)를 이용하여 실험결과를 분석하였으며, 모든 측정 결과는 평균±표준오차의 평균(mean±standard error)으로 나타내었으며, 실험군 간의 차이는 one-way analysis of variance, least-significant differences 분석법을 사용하여 $p<0.05$ 값인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과»»»»

1. 항산화 효과에 미치는 영향

Total phenol과 total flavonoid 함량을 측정한 결과,

BY의 total phenol 함량은 2.15 ± 0.01 mg/g이었고, total flavonoid 함량은 5.60 ± 0.08 mg/g을 나타내었다(Table III).

BY의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH와 ABTS free radical 소거 활성을 측정하였다. DPPH radical 소거 활성은 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 0.80 ± 0.02 mg/mL이었고, BY의 IC_{50} 값은 78.71 ± 1.84 mg/mL이었다. ABTS radical 소거 활성은 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 3.14 ± 0.04 mg/mL이었고, BY의 IC_{50} 값은 112.46 ± 0.21 mg/mL이었다(Table IV).

2. 체중 및 식이섭취량 변화에 미치는 영향

체중변화를 측정한 결과 Nor 4.27 ± 1.19 g, Oris 4.38 ± 0.86 g, BYL 4.82 ± 1.32 g, BYH 4.34 ± 1.38 g으로 나타나, Veh 6.96 ± 1.17 g과 비교하여 유의한 차이를 보였다 ($p<0.001$)(Fig. 1, Table V). 1일 평균 식이섭취량은 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

Table III Total Phenol and Total Flavonoid Contents of *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang*

Sample	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
<i>Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang</i>	2.15 ± 0.01	5.60 ± 0.08

Table IV. DPPH and ABTS Radical Scavenging Activity of *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang*

Sample	Radical scavenging activity (IC_{50})	
	DPPH free radical (mg/mL)	ABTS free radical (mg/mL)
L-ascorbic acid	0.80 ± 0.02	3.14 ± 0.04
<i>Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang</i>	78.71 ± 1.84	112.46 ± 0.21

Table V. Initial and Final Body Weight, Body Weight Change in Mice

Group	Body weight		
	Initial (g)	Final (g)	Gain (g)
Nor	22.97 ± 1.03	27.24 ± 1.82	$4.27\pm1.19^{***}$
Veh	23.91 ± 1.61	30.86 ± 2.57	6.96 ± 1.17
Oris	22.95 ± 1.03	27.33 ± 1.41	$4.38\pm0.86^{***}$
BYL	23.45 ± 0.96	28.27 ± 2.04	$4.82\pm1.32^{***}$
BYH	22.99 ± 0.67	27.34 ± 1.73	$4.34\pm1.38^{***}$

Values are presented as mean±standard error, n=9 mice per group.

Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight.

*** $p<0.001$ vs. high fat diet fed mice.

Fig. 1. Body weight changes. Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight.

Fig. 2. Food intake in mice fed high fat diet. Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight.

Fig. 3. Absolute liver weights of high fat diet fed mice. Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggitang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. high fat diet fed mice.

3. 간, 부고환 지방조직의 무게

실험동물을 희생시킨 후 적출한 간 조직의 무게 측정 결과 대조군은 1.33 ± 0.10 으로 정상군 1.23 ± 0.08 에 비하여 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 증가된 간 무게는 Oris 및 BYL, BYH 모두에서 감소하였다(Fig. 3). 대조군의 증가된 간 무게는 Oris 1.08 ± 0.07 , BYL 0.97 ± 0.17 , BYH 0.95 ± 0.09 로 유의성 있게 감소하였으며, Oris에서는 18.93% ($p < 0.001$), BYL에서는 27.00% ($p < 0.001$),

BYH에서는 28.84% ($p < 0.001$)로 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯의 투여가 간 무게를 유의하게 감소시켰음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

또한 부고환지방의 무게를 측정한 결과, Veh은 0.05 ± 0.01 로 Nor의 0.02 ± 0.01 에 비하여 유의하게 증가하였으며($p < 0.001$), Veh의 증가된 부고환지방의 무게는 Oris 0.04 ± 0.00 ($p < 0.01$), BYH 0.04 ± 0.01 ($p < 0.05$)로 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

Fig. 4. Visceral fat weights of high fat diet fed mice. Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. high fat diet fed mice.

Fig. 5. ROS level of serum in high fat diet fed mice. ROS: reactive oxygen species, Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. *** $p<0.001$ vs. high fat diet fed mice.

Fig. 6. ONOO- level of serum in high fat diet fed mice. ONOO-: peroxyntirite, Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. high fat diet fed mice.

Fig. 7. Evaluation of AST in high fat diet fed mice for 7 weeks. AST: aspartate aminotransferase, Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. high fat diet fed mice.

4. 혈청 내 산화적 스트레스에 미치는 영향

1) Reactive oxygen species

채취한 혈액에서 혈청 분리 후 혈청 내 ROS를 측정하였다. 그 결과 대조군 $79,584 \pm 9,762.1$ (Nor은 $58,816 \pm 10,346.7$)에 비해 유의하게 증가하였고($p<0.001$), Oris의 $71,875 \pm 3,871.9$ 은 감소하는 경향을 보였다. 약물투여군인 BYL의 $49,569 \pm 12,751.5$ 과 BYH의 $48,778 \pm 9,555.6$ 은 유의하게 감소하였다($p<0.001$)(Fig. 5).

2) Peroxynitrite

ONOO-의 측정 결과는 Veh는 844.13 ± 19.21 이고, Nor 837.16 ± 13.23 으로 Veh가 Nor에 비하여 증가하였고, Oris는 828.14 ± 22.88 로 유의하게 감소하였고($p<0.05$), BYL

은 820.01 ± 15.00 , BYH는 817.25 ± 20.56 로 Veh에 비해 유의하게 감소하였다($p<0.01$)(Fig. 6).

5. 혈중 간기능 관련 효소 평가

1) Aspartate aminotransferase

혈청내 AST는 Veh에서 64.44 ± 23.82 IU/L로 Nor의 44.16 ± 5.90 IU/L에 비해 유의하게 증가하여 간기능의 손상을 야기하였다($p<0.01$). BYH는 48.78 ± 13.34 IU/L로 손상된 간기능이 유의하게 회복되는 것을 보여주었다($p<0.05$). Oris는 54.37 ± 6.56 , IU/L와 BYL는 54.57 ± 11.28 IU/L로 감소하였다(Fig. 7).

Fig. 8. Evaluation of ALT in high fat diet fed mice for 7 weeks. ALT: alanine aminotransferase, Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. ***p<0.001 vs. high fat diet fed mice.

2) Alanine aminotransferase

혈청내 ALT는 Veh에서 12.49 ± 1.56 IU/L로 Nor에서 6.39 ± 3.06 IU/L에 비해 유의하게 증가하였고(p<0.001), Oris는 4.48 ± 2.60 IU/L, BYL는 1.27 ± 1.53 IU/L, BYH는 0.55 ± 0.16 IU/L로 모두 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(p<0.001)(Fig. 8).

6. 혈청 내 지질농도

1) 총콜레스테롤

총콜레스테롤의 결과를 보면, Veh에서 74.77 ± 13.10 mg/dL의 경우 Nor에서 45.57 ± 2.86 mg/dL에 비해 농도가 유의하게 상승하였으며(p<0.001), BYL 58.80 ± 2.92 mg/dL과 BYH 57.32 ± 2.41 mg/dL은 Veh에 비하여 유의하게 감소하였다(p<0.001). Oris 69.35 ± 2.99 mg/dL은 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였으며 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 9).

2) 중성지방

중성지방의 측정 결과를 보면, Veh 35.56 ± 4.77 mg/dL의 경우 정상군 29.10 ± 2.02 mg/dL에 비해 농도가 유의하게 상승하였으며(p<0.01), BYL 29.71 ± 3.59 mg/dL은 Veh에 비하여 유의하게 감소하였다(p<0.01). BYH 25.06 ± 1.86 mg/dL은 Veh에 비하여 투여군 중 가장 유의하게 감소하였다(p<0.001). Oris는 34.06 ± 5.25 mg/dL로 감소하는 경향을 보였지만 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 10).

Fig. 9. Total cholesterol level in high fat diet mice. Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. ***p<0.001 vs. high fat diet fed mice.

Fig. 10. Triglyceride level in high fat diet mice. Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. **p<0.01, ***p<0.001 vs. high fat diet fed mice.

3) 고밀도지단백콜레스테롤

고밀도지단백콜레스테롤 측정 결과를 보면, Veh 25.92 ± 0.06 mg/dL의 경우 Nor 26.13 ± 0.06 mg/dL에 비해 농도가 유의하게 감소하였으며(p<0.05), Oris 26.10 ± 0.04 mg/dL, BYL 25.98 ± 0.07 mg/dL은 증가하는 경향이 있었으나 통계적 유의성은 없었으며, BYH 26.11 ± 0.07 mg/dL은 유의하게 증가하였다(p<0.05)(Fig. 11).

4) 저밀도지단백콜레스테롤

저밀도지단백콜레스테롤 측정 결과에서, Veh 41.09 ± 4.26 mg/dL의 경우 Nor 15.83 ± 0.76 mg/dL에 비해 농도가 유의하게 상승하였으며(p<0.001), Oris 34.91 ± 1.10 mg/dL은 Veh에 비해 유의하게 감소하였다(p<0.05). 특히, BYL군

Fig. 11. HDL-cholesterol level in mice fed high fat diet. Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. * $p < 0.05$ vs. high fat diet fed mice.

Fig. 12. LDL-cholesterol level in mice fed high fat diet. LDL: low density lipoprotein, Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. high fat diet fed mice.

Fig. 13. The effects of *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* on the superoxide dismutase protein expression in high fat diet fed mice. Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggitang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. ** $p < 0.01$ vs. high fat diet fed mice..

Fig. 14. The effects of *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* on the catalase protein expression in high fat diet fed mice. Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggitang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. high fat diet fed mice.

26.48±1.06 mg/dL과 BYH군 25.51±0.26 mg/dL에서는 대조군에 비하여 유의적인 감소를 확인할 수 있었다 ($p < 0.001$)(Fig. 12).

7. 간조직내 항산화 단백질 분석

1) Superoxide dismutase

간 조직에서 SOD 단백질을 분석한 결과 Veh는 0.75±0.02로 Nor 1.00±0.15에 비하여 유의하게 적게 발현하였다($p < 0.01$). 그러나, Oris 0.90±0.10, BYL 0.92±0.13과 BYH 0.93±0.08 모두에서 대조군에 비하여 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 13).

2) Catalase

간 조직에서 Catalase 단백질을 분석한 결과 Veh는 0.79±0.11로 Nor 1.00±0.19에 비하여 유의하게 적게 발현하였다($p < 0.05$). 그러나 Oris 0.95±0.19과 BYL 0.84±0.22에서는 Veh에 비하여 발현량이 증가하였지만 통계적으로 유의하지 않았다. 특히 BYH 1.08±0.24에서는 Veh에 비하여 발현량이 유의적으로 증가하였다($p < 0.01$)(Fig. 14).

3) Glutathione peroxidase

간 조직에서 Gpx 단백질을 분석한 결과 Veh는 0.88±0.05로 Nor 1.00±0.11에 비하여 유의적으로 적게 발현하였다($p < 0.05$). 또한 Oris 1.07±0.11, BYL 1.07±0.14과 BYH

Fig. 15. The effects of *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* on the Gpx protein expression in high fat diet fed mice. Gpx: glutathione peroxidase, Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. high fat diet fed mice.

Fig. 16. The effects of *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* on the HO-1 protein expression in high fat diet fed mice. HO-1: heme oxygenase-1, Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. high fat diet fed mice.

1.18±0.14은 Veh에 비하여 유의적으로 발현량이 증가하는 모습을 나타냈다($p < 0.001$)(Fig. 15).

4) Heme oxygenase-1

간 조직에서 HO-1 단백질을 분석한 결과 Veh은 0.80±0.13로 Nor 1.00±0.06에 비하여 유의적으로 적게 발현하였다($p < 0.01$). 또한, Oris 1.04±0.14은 Veh에 비하여 유의적으로 발현량이 증가하는 모습을 보였다($p < 0.001$). 그러나, BYL 0.92±0.10과 BYH 0.93±0.09에서는 유의하진 않았지만 발현량이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 16).

8. 조직학적 분석

1) 간 조직의 H&E 염색

적출한 간 조직을 H&E염색 후, 광학현미경을 이용하여 관찰한 결과, Nor (Fig. 17A)에 비하여 Veh (Fig. 17B)에서는 혈관 주위의 염증 정도와 지방의 크기가 늘어남을 관찰할 수 있었으며 Oris (Fig. 17C)에서는 염증과 지방이 감소한 모습을 관찰할 수 있었다. BYL (Fig. 17E)은 Veh에 비하여 염증 정도와 지방의 크기가 감소하는 경향을 보였으며, BYH (Fig. 17D)은 Veh에 비하여 염증 정도와 지방의 크기가 크게 감소하는 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 17).

2) 간 조직의 Oil red-O 염색

적출한 간 조직을 Oil red-O 광학현미경을 이용하여 관찰한 결과, Nor (Fig. 18A)에 비하여 Veh (Fig. 18B)에서는 지방세포가 붉게 염색된 모습을 관찰할 수 있었으며, Oris (Fig. 18C)에서는 지방세포가 감소한 모습을 관찰할 수 있었다. BYL (Fig. 18D)은 Veh에 비하여 지방세포가 감소하는 경향을 보였으며, BYH (Fig. 18E)은 Veh에 비하여 지방세포가 크게 감소하는 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 18).

3) 부고환지방 조직의 H&E 염색

적출한 부고환 지방 조직을 H&E염색 후, 광학 현미경을 이용하여 관찰한 결과, Nor (Fig. 19A)에 비하여 Veh (Fig. 19B)에서는 지방세포의 크기가 증가하였고, Oris (Fig. 19C)에서는 Veh에 비하여 지방세포의 크기가 감소하였다. BYL (Fig. 19D)은 Veh과 지방세포의 크기가 비슷한 경향을 보였지만, BYH (Fig. 19E)은 Veh에 비하여 지방세포의 크기가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 19).

고찰»»»»

비만은 체내에 지방이 과잉 축적된 상태로 섭취 및

Fig. 17. The histological analysis of the liver tissues after treatment of high fat diet fed mice (H&E staining, $\times 200$). A: normal mice (Nor), B: high fat diet fed mice (Veh), C: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight (Oris), D: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight (BYH), E: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight (BYL).

Fig. 18. The histological analysis of the liver tissues after treatment of high fat diet fed mice (Oil red-O staining, $\times 200$). A: normal mice (Nor), B: high fat diet fed mice (Veh), C: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight (Oris), D: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight (BYL), E: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight (BYH).

Fig. 19. The histological analysis of the visceral fat tissues after treatment of high fat diet fed mice (H&E staining, $\times 200$). A: normal mice (Nor), B: high fat diet fed mice (Veh), C: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight (Oris), D: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight (BYL), E: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight (BYH). Nor: normal mice, Veh: high fat diet fed mice, Oris: high fat diet plus orlistat 40 mg/kg body weight, BYL: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 0.87 g/kg body weight, BYH: high fat diet plus *Banggihwanggi-tang-hap-yeonggyechulgam-tang* 1.74 g/kg body weight.

소비 에너지의 불균형으로 야기되는 것으로 섭취 에너지가 신체 활동에 필요한 에너지보다 초과되어 지방조직에 축적된다¹⁾. 고열량, 고지방, 고탄수화물 식품에 대한 접근 용이성이 높으며, 교통 및 이동 수단의 발달과 정보 통신 매체 발달의 영향으로 정적인 활동이 증가하고 신체 활동이 감소함으로 인한 운동 부족, 산업화 및 분업화로 인한 스트레스 증가 등 현대 사회의 환경은 비만을 유도하는 환경이며 이로 인해 전 세계적으로 비만 인구가 증가하고 있다²¹⁾.

비만은 단순한 체중증가 뿐만 아니라 고혈압, 당뇨병, 골관절염과 같은 동반질환들을 유발하며 비만 치료 시 이러한 동반질환의 발생 위험 저하 및 동반질환 개선의 효과가 있는 경우 보다 적극적인 비만 치료가 필요하다²²⁾. 우리나라에서는 장기간 비만치료를 목적으로 사용가능한 약물 중에서 주로 orlistat가 사용된다⁴⁾. Orlistat는 가역적인 위장관계 지질분해효소 길항제로서 섭취한 지방의 분해와 흡수를 감소시키므로 부작용은 기름변, 기름이 새어나오는 방귀, 변실금, 대변 횟수의 증가, 복통 등 불편한 소화기계 증상과 지용성 비타민 A, D, E, K와 β -carotene의 흡수를 저하가 있고, 중대한 작용으로는

간 손상이나 oxalate 신증이 발생할 수 있다⁴⁾.

비만의 한의학적 문헌 연구에 따르면 비만의 원인으로는 膏粱厚味多食, 先天稟賦, 內傷七情 등이 있고, 병리적인으로는脾胃의運化기능 실조로 인해 水濕, 痰濁이 형성되거나 반대로 水濕과 痰濁이脾胃의運化기능에 영향을 주며, 장부적으로는脾臟과 관련 있다²³⁾.

脾虛한 경우 잘 부어 몸이 무겁고 움직이는 것을 싫어하며 평소 힘이 없고 피곤해하며, 배가 더부룩하고 입맛이 없다⁵⁾.脾胃의 약화된運化기능을 補하며, 水濕과 痰濁을 제거하며 黃芪, 蒼朮, 白朮, 防己, 茯苓, 澤瀉, 車前子, 桂枝, 甘草로 이루어진 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯을 기본 처방으로 운용한다¹⁰⁾. 비만의 치료에 있어 防己黃芪湯에 대한 연구는 있으나 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯에 대한 연구는 이루어지지 않아 안정성이나 효과에 대한 연구가 필요한 실정이다.

防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯의 항비만 효과 및 항산화 효과를 알아보기 위해 본 연구에서는 C57BL/6 마우스를 각 9마리씩 무작위로 정상군(Nor), 고지방식이군(Veh), 양성대조군(Oris), BY를 0.87 g/kg으로 투여한 BYL군, 1.74 g/kg으로 투여한 BYH군으로 배정하여 7주 동안

진행하였다.

防己黃芪湯 合 薏桂朮甘湯의 항산화 효과를 확인하기 위하여 BY의 total phenol과 total flavonoid의 함량을 측정하였으며, total phenol 함량은 2.15 ± 0.01 mg/g이었고, total flavonoid 함량은 5.60 ± 0.08 mg/g을 확인하였다. 활성을 평가하기 위하여 DPPH free radical 측정법과 ABTS free radical 측정법을 이용하여 BY의 free radical 소거 활성을 측정한 결과 DPPH radical 소거 활성은 IC_{50} 78.71 $\pm$ 1.84 mg/mL, ABTS radical 소거 활성은 IC_{50} 112.46 $\pm$ 0.21 mg/mL으로 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid의 IC_{50} 에 비해 항산화 효과를 나타냈다(Table IV).

체중 변화를 관찰한 결과 BYH가 Veh에 비해 체중이 유의하게 감소하였다($p < 0.001$)(Fig. 1, Table V). 그리고 실험동물을 희생시킨 후 간의 무게와 부고환 지방조직의 무게를 측정한 결과, Veh에 비해 BYL과 BYH에서 간의 무게가 유의하게 감소하였으며($p < 0.001$), 양성대조군은 18.93%, BYH에서는 28.84% 감소하였다(Fig. 3). 비만으로 인해 간에 지방이 축적되면 간의 무게가 증가하는 것으로 알려져 있으며^{24,25}, 위의 결과를 볼 때 防己黃芪湯 合 薏桂朮甘湯이 간에 지방이 축적되는 것을 억제할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 Veh에서 부고환 지방조직의 무게는 Nor에 비하여 유의하게 증가하였으며($p < 0.001$), Veh의 증가된 부고환지방의 무게는 BYH에서 유의하게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 4). 고지방식을 하는 오늘날의 서구화된 식습관에서 防己黃芪湯 合 薏桂朮甘湯을 복용하는 경우 지방의 증가억제에 영향을 미칠 것으로 보인다.

防己黃芪湯 合 薏桂朮甘湯이 전지방세포에서 지방세포로 분화하는 과정에 관여하여 지방세포 크기 증가와 지방구 생성을 억제하는지 관찰하기 위해 간과 부고환 주위 지방조직을 H&E 염색법, Oil red-O 염색법 통해 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다. 관찰 결과 Veh에 비해 BYH에서 간 조직에서 혈관주위의 염증 정도와 지방의 크기가 크게 감소하며, 부고환 지방조직에서는 지방세포의 크기가 감소하는 경향을 보였다. 이를 통해 防己黃芪湯 合 薏桂朮甘湯이 지방세포의 크기 증가 및 지방이 침착되는 것을 억제하는 데 영향을 미칠 것으로 생각된다.

혈청 내 산화적 스트레스에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ROS와 ONOO⁻를 분석하였다. 혈청 내 ROS는 Veh

에 비해 BYH에서 유의하게 감소하였다($p < 0.001$)(Fig. 5). ONOO⁻ 또한 BYH에서 Veh에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 6). 비만으로 인해 지방이 몸에 축적되면서 지질 과산화물이 형성되고 체내 산화 스트레스가 증가하는데, 이로 인해 생성된 과도한 ROS는 세포를 손상시킨다²⁶. ROS와 ONOO⁻는 세포의 DNA, 단백질 및 지질을 산화시켜 심혈관 질환, 염증성 질환 및 암과 같은 질환을 유발한다^{27,28}. 이를 통해 防己黃芪湯 合 薏桂朮甘湯이 혈청 내 항산화 작용에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

그리고 비만으로 인한 간 손상 및 약물의 간기능 개선효과를 평가하기 위해 AST, ALT의 혈청 농도를 측정하였다. AST와 ALT는 간세포 내 미토콘드리아에 존재하며 간세포의 파괴에 의해 혈액 내로 유출되는 효소이다. 약물 독성이나 알코올, 지방대사이상 등의 원인으로 간세포 파괴가 일어나면 정상수치 이상의 AST와 ALT가 혈액 속으로 유출된다. 혈청 내 AST는 Veh는 Nor에 비해 유의하게 증가하였다($p < 0.01$)(Fig. 7). 또한 혈청 내 ALT는 Veh에서 Nor에 비해 유의하게 증가하였고($p < 0.001$), Oris, BYL, BYH 모두 대조군에 비하여 유의한 감소를 보여주었다($p < 0.01$)(Fig. 8). BYH에서 손상된 간기능이 유의하게 AST, ALT가 감소하였다($p < 0.05$)(Figs. 7, 8). 위의 결과로 고지방식이 간세포의 파괴를 유발할 수 있으며, 防己黃芪湯 合 薏桂朮甘湯이 비만으로 인한 간 손상으로 인한 간세포 파괴를 억제하는 작용에 영향을 미칠 것으로 보인다.

혈청 내 지질농도 분석 결과 BYH에서는 Veh에 비해 총콜레스테롤($p < 0.001$)(Fig. 9), 중성지방($p < 0.001$)(Fig. 10)의 함량이 유의하게 낮으며, HDL-C 함량의 경우 유의하게 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 11). HDL-C은 혈관 내의 유리 콜레스테롤을 간으로 운반하고, LDL-C을 억제하여 동맥경화를 억제하여, HDL-C과 LDL-C의 비율이 깨지면 심혈관 질환의 발병률이 증가한다²⁹. 중성지방 또한 관상동맥, 심혈관 질환을 일으킬 수 있는 주요한 원인이 되며 비만이 심할수록 증가한다³⁰. 또한 중성지방의 함량이 증가하면 HDL-C은 낮아진다³¹. 위의 결과를 통해 고지방식이 HDL-C를 감소시키고, LDL-C를 증가시킬 수 있으며, 고지방식에서 防己黃芪湯 合 薏桂朮甘湯의 복용은 HDL-C를 증가시키고, LDL-C는 감소시키는 데 영향을 미칠 것으로 생각된다.

간 조직에서의 항산화 효과를 확인하기 위하여 SOD, Catalase, Gpx, HO-1 단백질을 분석하였다. 비만인의 경우 항산화 효과가 정상인에 비해 낮게 유지되며, 비만인에서 SOD와 Gpx의 활성이 각각 41%, 22%로 더 낮았다고 보고되었다³²⁾. SOD는 superoxide anion (O_2^-)을 수소 원자(H^+)와 반응시켜 과산화수소(H_2O_2)와 산소 분자(O_2)로 만들고, GSH-Px는 과산화수소와 유리과산화물을 제거하여 GSH-Px의 결핍은 지질과산화 반응을 야기한다^{33,34)}. 또한 catalase는 과산화수소를 물로 환원시키거나 ethanol, methanol과 같은 hydrogen donor의 산화에 관여하며 활성 산소를 소거시킨다^{26,35)}. 그리고 HO-1은 heme의 분해를 촉진하는데, pro-inflammatory cytokines를 줄이고 anti-inflammatory cytokines의 생성을 촉진시켜 세포를 보호한다³⁶⁻³⁸⁾. 본 연구에서 간 조직의 SOD, catalase, Gpx, HO-1 단백질 분석 결과 Veh에서 Nor에 비하여 유의하게 적게 발현하였다(Figs. 13-16). BYH에서 발현량이 유의하게 증가하는 경향을 보여 고지방식이가 간조직 내 항산화 단백질의 발현의 억제에 영향을 미칠 것으로 보이며, 이에 대해 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯이 간조직 내 항산화 단백질 발현의 촉진에 영향을 미칠 것으로 보인다.

또한 간 조직, 부고환 지방 조직을 광학 현미경을 이용하여 조직학적으로 분석하였다. 간 조직을 H&E 염색 후 관찰한 결과 Nor에 비하여 Veh에서 혈관주위의 염증 정도와 지방의 크기가 늘어났으며, BYH는 Veh에 비하여 염증 정도와 지방의 크기가 크게 감소하는 모습을 보였다(Fig. 17). 그리고 간 조직을 Oil red-O 염색 후 관찰한 결과 Nor에 비하여 Veh에서는 붉게 염색된 지방세포의 크기가 증가하였으며, BYH는 Veh에 비하여 지방세포가 크게 감소하는 모습을 보였다(Fig. 18). 마지막으로 부고환 지방 조직을 통해 내장 비만의 정도를 분석하였다. 부고환 지방 조직을 H&E 염색 후 관찰한 결과 Nor에 비하여 Veh에서 지방세포의 크기가 증가하였고, BYH는 Veh에 비하여 지방세포의 크기가 감소하는 모습을 보였다(Fig. 19). 이를 통해 조직학적 분석에서도 고지방식이가 간 조직 내 염증 및 지방의 크기 및 내장 비만 축적에 영향을 미침을 알 수 있으며 이를 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯이 억제하는 데 영향을 미칠 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 보면 고지방식으로 유도된

마우스에서 증가된 체중, 지방조직, 혈청 내 지질, 간기능 관련 효소, 산화 활성을 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 추출물을 투여한 경우 이를 억제하여 항비만, 항산화 효과에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 볼 수 있다. 그러나 본 연구는 동물 모델을 이용한 연구 결과로 고지방식으로 인한 사람의 비만 치료에 직접적으로 반영하기에는 어려움이 있어 향후 비만 예방과 치료에 대한 효과에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

결론»»»

고지방식으로 유도된 C57BL/6 mice 비만형 동물모델에 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 (0.87 g/kg, 1.74 g/kg)을 7주간 투여한 결과 유의한 항비만 효과 및 항산화 효과를 아래와 같이 확인할 수 있었다. 향후 지속적인 연구를 통해 비만의 예방과 임상 치료에 활용될 것으로 기대한다.

1. 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 추출물에서 total phenol과 flavonoid의 함량은 각각 2.15 ± 0.01 mg/g, 5.60 ± 0.08 mg/g으로 활성 산소 소거능은 BPPH, ABTS 각각 78.71 ± 1.84 mg/mL, 112.46 ± 0.21 mg/mL이다.
2. 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 투여군과 대조군의 체중이 각각 4.34 ± 1.38 g, 6.96 ± 1.17 g으로 유의하게 감소하였다.
3. 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 투여군과 대조군의 간조직이 각각 0.95 ± 0.09 g, 1.33 ± 0.10 g, 부고환 지방조직이 0.04 ± 0.01 g, 0.05 ± 0.01 g으로 유의하게 감소하였다.
4. 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 투여군과 대조군의 혈청 내 ROS가 각각 $48,778 \pm 9,555.6$, $79,584 \pm 9,762.1$, 혈청 내 ONOO-가 각각 817.25 ± 20.56 , 844.13 ± 19.21 으로 모두 유의하게 감소하였다.
5. 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 투여군과 대조군의 혈청 내 AST가 각각 48.78 ± 13.34 IU/L, 64.44 ± 23.82 IU/L, 혈청 내 ALT가 각각 0.55 ± 0.16 IU/L, 12.49 ± 1.56 IU/L로 간기능관련 효소가 유의하게 감소하였다.
6. 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 투여군과 대조군의 혈청 내 총콜레스테롤이 각각 57.32 ± 2.41 mg/dL, 74.77 ± 13.10 mg/dL, 중성지방이 각각 25.06 ± 1.86 mg/dL,

35.56±4.77 mg/dL으로 유의하게 감소하였고, HDL-C은 각각 26.11±0.07 mg/dL, 25.92±0.06 mg/dL으로 유의하게 증가하였다.

7. 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 투여군과 대조군의 간조직내 SOD가 각각 0.93±0.08, 0.75±0.02, catalase가 각각 1.08±0.24, 0.79±0.11, Gpx가 각각 1.18±0.14, 0.88±0.05, HO-1이 각각 0.93±0.09, 0.80±0.13으로 증가하였다.
8. 防己黃芪湯 合 苓桂朮甘湯 투여군이 대조군에 비하여 정상적인 간조직이 확인되었고, 간, 부고환 지방조직 크기가 감소하였다.

References»»»»

1. Choi YG, Min HG, Koh CS, Heo GB, Lee TH, Lee HG, Shin SH, Kim YS. Endocrinology. Medicine Publish. 1994;735-42.
2. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer : epidemiological evidence and proposed mechanisms. Nat Rev Cancer. 2004;4(8):579-91.
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. 2015.
4. Kim KG. Safety of anti-obesity drugs approved for long-term use. The Korean Journal of Obesity. 2015; 24(1):17-27.
5. Moon JS, Kang BG, Ryu EG, Choi SM. A study of syndrome index differentiation in obesity. J Korean Med Obes Res. 2007;7(1):55-69.
6. Kim SJ, Shin SW, Kim HJ. Obesity from the view point of metabolic rate. J Korean Med Obes Res. 2003;3(1): 95-105.
7. Song MY. Evaluation of efficacy of aconitum carmichaeli debx extract on obesity and glucose tolerance in diet induced obese mice. J Korean Med Obes Res. 2017;17(1):29-36.
8. Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. Nat Rev Drug Discov. 2010;9(6):465-82.
9. Heo SY, Kang HS. Oriental and Western medical study on the treatment of obesity. J Korean Med Rehabil. 1997;7(1):272-86.
10. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean Rehabilitation Medicine. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015: 298-314.
11. Jang JG. Geumgweyoryakbangron. Seoul:Sungbo publish. 1985: 21,35,70.
12. Song YS. Effects of Bangkihwanokitang, Bangkihwanokitang with Lycii fructus and Lycii fructus on the weight of obese rats. Hangukjeontonguihakji. 1991;1(1):25-43.
13. Park BH. Sanghanronhaeseol. Seoul:Euibang publish. 2004: 218-20.
14. Jin SW. Geumgweyoryakcheonju. Seoul:Salgusup publish. 2018: 50-2.
15. The Korean Medicine Society for the Herbal Formula Study. The Herbal Formula Study. Seoul:Yeongrim publish. 1999: 514-515.
16. Folin AD, Denis W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenolderivatives) in urine. J Biol Chem. 1915;22:305-8.
17. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chen JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal. 2002;10:178-82.
18. Blois MS. Antioxidants determination by the use of a stable free radical. Nat 1958;181:1199-200.
19. 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. 1998;26(9):1231-7.
20. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H. Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite. Free Radic Res. 1997;27(3):245-54.
21. Chopra M, Galbraith S, Darnton-Hill I. A global response to a global problem : the epidemic of overnutrition. Bull World Health Organ 2002;80(12):952-8.
22. Korean Society for the Study of Obesity. Clinical obesity. Seoul:Koryeo Medicine Publish. 2008: 403-13.
23. Lee BJ, Kim SH. The study of record relate with the notion, the diagnosis and treatment for obesity. J Haehwa Med. 1998;7(1):533-41.
24. Han CT, Lee SH, Lim SB, Kong HS, Kim SH, Lee SK. Studies on production of high fat diet induced obesity C57BL/6NCrjBgi mice. Lab Anim Res. 2006;22(3): 221-6.
25. Song MY. The study of the changes of obesity-relating biomarkers in high fat fed-induced C57BL/6 mice. J Korean Med Obes Res. 2016;16(1):19-26.
26. Bae GJ, Ha BJ. Antioxidative effect of fermented rhynchosia nulubilis in obese rats. J Food Hyg Saf. 2015; 30(4):383-9.
27. Morihiro M, Iichiro S. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. Obes Res Clin Pract. 2013;7:e330-41.

28. Channon KM, Qian H, George SE. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury: insights from experimental gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1873-81.
29. Lee KN, Hwang YS, Lee SH, Neo KH, Yan DH, Jeong SK. Handbook of laboratory & diagnostic tests. Seoul: Sungjee D & J Co. Ltd. 2015:23-8.
30. Shin W, Lee KR. The effect of aerobic exercise on insulin resistance and free fatty acids of impaired fasting glucose in middle aged women. *The Journal of Korea Society for Wellness.* 2013;(8)4:337-45.
31. Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis : central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res.* 1996;37(4):693-707.
32. Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(9):1159-64.
33. Lloyd D. How to avoid oxygen. *Science* 1999;249:286.
34. Kesavulu MM, Giri R, Kameswara RB, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabeté Metab.* 2000;26(5):387-92.
35. Sung KS, Chun C, Kwon YH, Kim KH, Chang CC. Effects of red ginseng component on the antioxidative enzymes activities and lipid peroxidation in the liver of mice. *J Ginseng Res.* 2000;24, 29-34.
36. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-54.
37. Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Natl Med.* 2000;8:240-6.
38. Otterbein LE, Chai AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol* 2000;279:1029-37.