

Original Article

차전자 약침액을 통한 비만 유도 마우스에서의 국소 부위 지방 감소 효과 연구

박찬우#, 최유연, 양응모*

경희대학교 한의과대학 융합한의과학교실

Study on the Local Fat-Reducing Effects of *Plantago depressa* Willd (PD) pharmacopuncture, in Obesity-Induced Mice

Chanwoo Park#, You Yeon Choi, Woong Mo Yang*

Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea

Objectives: We aimed to confirm the effect of *Plantago depressa* Willd (PD) pharmacopuncture, specifically a rich extract of polysaccharides and flavonoids, on reducing fat deposition in local areas using a mouse model of diet-induced obesity.

Methods: Obesity was induced in C57BL/6 with a high-fat diet for 7 weeks. The right inguinal fat pad was injected with 100 μ L of physiological saline as a control, and the left inguinal fat pad was injected with 100 μ L of PD extract at a concentration of 0.6 mg (equivalent to 20 mg/kg). PD extract was injected a total of 6 times, 3 times a week for 2 weeks starting from the 5th week of high-fat diet feeding. After treatment, the weight of the inguinal fat pad were confirmed, and the size of adipocytes was assessed through histological analysis using H&E staining. Furthermore, Western blot analysis was conducted on enzymes associated with lipolysis to evaluate molecular changes both in vivo and in vitro.

Results: In the inguinal fat treated with PD pharmacopuncture, a significant reduction in the weight and size of the inguinal adipose tissues was observed compared to the vehicle. The expression of hormone-sensitive lipase (HSL) and adipose triglyceride lipase (ATGL), factors related to lipolysis, was increased in the adipose tissue in the local area where PD was injected. Additionally, the formation of lipid droplets was suppressed, and enzymes related to lipolysis were increased by PD extract treatment in differentiated 3T3-L1 adipocytes.

Conclusion: The PD pharmacopuncture effectively reduced fat mass in the inguinal fat pads of mice with obesity and promoted lipolysis by increasing the activity of lipolytic enzymes.

Key words :*Plantago depressa* Willd, pharmacopuncture, obesity, lipolysis, lipolytic enzymes.

First author: Chanwoo Park

Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University
Tel : +82-2-961-2209; FAX: +82-2-961-2209, E-mail:chanaldo7@naver.com

*Corresponding author: Woong Mo Yang

Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University
Tel : +82-2-961-2209; FAX: +82-2-961-2209, E-mail:wmyang@khu.ac.kr

Received : 07 June 2024

Revised : 08 July 2024

Accepted : 27 December 2024

서론

비만(肥滿)은 현대 사회에서 중요한 건강 문제로 인식되고 있으며, 섭취한 음식의 칼로리가 소모된 양을 초과하게 되면서 에너지 대사가 불균형을 이루게 되어 발생한다¹⁾. 이는 단순 체중의 증가가 아닌 체내 지방 세포의 크기와 양이 증가하여 체내에 체지방이 과다하게 쌓인 상태로, 그 원인으로 유전적 요인, 고칼로리 식품 가용성 증가, 신체 활동 기회 감소 및 심리적 스트레스 등이 주요 원인으로 지목되고 있다^{2,3)}. 세계보건기구(WHO)에 따르면, 성인 기준 체질량 지수(BMI)가 30 kg/m² 이상, 아시아 인구에 대해서는 25 kg/m² 이상을 비만으로 분류하며⁴⁾, 이는 지역적, 인종적 특성을 고려한 기준으로 전 세계적으로 비만 인구가 급속도로 증가하고 있음을 나타낸다⁵⁾.

체지방은 쌓인 위치에 따라 내장지방(Visceral fat)과 피하지방(Subcutaneous fat)으로 구분되며, 내장지방은 복강 내 내장 주변의 장간막에 존재하는 지방으로, 심혈관 질환, 당뇨병, 고혈압 등 대사증후군의 위험 발생이 높다고 보고되었다⁶⁾. 반면, 피하지방은 과다한 유리지방산, 글리세롤이 지방 세포에 중성지방(triglyceride) 형태로 저장되는 형태로, 피부밑과 근육 사이에 쌓인 지방으로 아랫배에 축적되는 경우가 많고, 팔, 엉덩이, 허벅지 등에 주로 분포하며, 건강상의 문제뿐만 아니라 외모적인 측면으로도 문제가 되고 있다⁷⁾. 또한, 어린이와 청소년의 비만을 증가시키는 큰 우려를 낳고 있으며, 이는 성인기의 건강 문제로 이어져 다양한 예방 및 관리 프로그램이 운영되고 있지만, 비만 인구의 지속적인 증가는 여전히 큰 과제로 남아있다⁸⁾.

사회 질적 수준이 높아짐에 따라 개인의 건강 관리에 관심도가 증가하고 있으며 이에 따라 다양한 비만 치료법들이 제시되고 있다⁹⁾. 대한비만학회의 진료 지침에 따르면 개인의 비만도와 체지방의 분포도에 따라 약물요법, 식이요법, 운동 요법인 내과적 치료와 안마요법, 침구요법 등의 외과적인 치료 등이 활용되고 있다¹⁰⁾. 또한, 특정 부위 혹은 국소적 지방을 줄이기 위한 비만의 치료법으로 다양한 기기들을 사용한 지방흡입술과 같은 외과적인 처치나 국소에 직접 약물을 주입하는 약물 주입요법(mesotherapy), 마사지, 초음파 등이 주로 행해지고 있다¹¹⁾. 양방에서 대표적인 국소 부위 치료 방법인 지방흡입술은 축적된 지방층을 단시간 내에 제거할 수 있지만, 과도한 흡입으로 인한 피부 유착, 피부 괴사, 색소 침착이 등의 부작용이 발생한다¹²⁾. 반면, 한의학에서 비만 치료에는 주로 침 치료와 한약 치료를 병용하여 전신 비만을 치료에 적용하였으며, 최

근에는 국소 비만의 부위에 침의 자극 효과와 한약의 약리 효과를 결합한 약침 치료(pharmacopuncture)를 통해 비만을 치료하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다¹³⁾.

비만은 한의학에서의 비(肥), 비반(肥胖), 육인(肉人), 비인(肥人), 비귀인(肥貴人) 등 다양한 용어로 설명하고 있으며, 주요 원인으로 ‘비귀인, 고량지질야(肥貴人, 膏粱之疾也)’라 하여, 기름진 음식과 고칼로리 음식의 과다한 섭취를 꼽으며, 이러한 생활 습관이 비위(脾胃)의 운화(運化) 기능에 영향을 미쳐 담(痰), 습(濕), 열(熱) 등을 유발한다고 언급되었다¹⁴⁾. 이러한 상태는 습담(濕痰)의 체내 수액 대사가 제대로 이루어지지 않아 나타나는 현상으로, 체내 에너지의 불균형으로 해석될 수 있다¹⁵⁾.

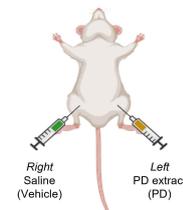
차전자 (*Plantago depressa* Willd)는 질경이과(車前科, Plantaginaceae)에 속한 다년생 초본인 질경이(*Plantago asiatica* Linne) 또는 털질경이(*Plantago depressa* Willdenow)의 잘 익은 종자로, 여름 가을에 열매가 익으면 과수(果穗)를 거두어들여 햇볕에 말리고 비벼 씨를 털어내고 잡질을 없앤 후 사용한다¹⁶⁾. 성질은 미한(微寒)하고 감(甘)한 성미(性味)로, 간(肝), 소장(小腸), 신(腎), 폐(肺)에 歸經하여 거담(祛痰), 청열(淸熱), 이뇨(利尿), 삼습통림(滲濕通淋) 하는 효능을 가져 이뇨 작용을 촉진하고, 부기를 줄이며, 혈액순환을 개선하는 데 사용되어 왔다¹⁷⁾. 차전자 포함 약물 추출액 경구 투여를 한 고지방식이 비만 마우스에서 aspartate aminotransferase(AST) 및 alanine aminotransferase(ALT) 수치 감소를 통한 간기능 향상 및 콜레스테롤 함량 저하 및 지질대사 개선을 통한 고지혈증에 대한 효과가 관찰되었다¹⁸⁾. 차전자 포함 복합추출물이 고지방식이로 유발된 비만 마우스에서 체중 감소와 더불어 간의 지방 변성 및 부고환 지방세포의 억제 등 항비만 효과를 확인하였다¹⁹⁾. 이와 같은 차전자 추출물을 경구 투여를 통한 항비만 및 지질대사 개선 효과는 보고되었으나, 국소 부위를 타겟한 연구는 수행되지 않았다.

본 연구에 사용된 C57BL/6는 고지방식이로 인해 비만 유도가 용이하며, 비만 유도 후 지방의 분포가 인간의 내장 지방 축적과 비슷한 양상을 나타낸다²⁰⁾. 더욱이 비만 유도 후 인슐린 저항, 고혈당증, 고지혈증 등과 같은 대사증후군이 인간과 유사하게 나타나는 특성을 나타내고 있어 비만 연구에 다양하게 사용되고 있다²¹⁾. 해당 연구에서는 고지방식 급여를 통해 유도된 비만 마우스 모델에서 차전자 약침을 투여함으로써 국소 부위의 지방 감소 효과를 확인하

고자, 약물이 투여된 국소 부위의 지방 조직의 무게, 지방 세포의 크기뿐만 아니라 지방 조직 내에 지방분해 관련 효소인 호르몬 민감성 리파제(HSL; Hormone-Sensitive Lipase) 및 지방 트리글리세라이드 리파제(ATGL; Adipose Triglyceride Lipase) 등의 분자학적 지표를 통해 차전자 약침의 국소 부위 지방 분해 효과를 확인하고자 하였다.

액은 고지방 식이 공급 5주 차부터 2주간 1주일에 3회씩 총 6번 투여하였다(Fig. 1).

0 weeks	1~4 weeks	5~6 weeks
Adaptation	60% High fat diet (HFD)	
		<ul style="list-style-type: none"> - Injection of PD - 20 mg/kg, b.w - 3 times/week for 2 weeks - Subcutaneous injection



실험재료 및 방법

1. 차전자 약침액 제조

정도생약국(서울, 한국)에서 구입한 차전자(*Plantago depressa* Willd; PD) 200g을 1,500mL의 증류수에서 100°C 2시간으로 환류 추출한 후, 30분 동안 초음파(sonication)를 처리하였다. 추출된 용액의 불순물을 제거하기 위해 정량 여과지(quantitative filter paper, NO.20, 185mm) 및 멸균 여과지로(Filtrox FibraFix AF-101H Filter Sheets AF-101H) 필터 후, 감압 농축 과정을 거쳐 동결 건조하여 15g (수율: 7.5%)의 분말 상태의 PD 파우더를 얻었다. 차전자 동결건조 표본(voucher specimen: #PD-2017)은 20°C에 보관하였다. 동결건조된 PD 파우더는 실험 직전 생리식염수에 녹여 PD 약침액으로 사용하였다.

2. 실험동물

수컷 5주령의 C57BL/6 (수컷, 19~21g, n=6)은 라온 바이오(한국)에서 구매하여, 실험 당일까지 고형사료와 물을 충분히 공급하고, 온도 22±2°C, 습도 55±15%, 12시간 light-dark cycle의 환경을 유지하며 1주간 적응기 후 실험에 사용되었다. 모든 동물실험 과정은 NIH (National Institutes of Health)의 실험동물 관리 규정(Principle of Laboratory Animal Care)과 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 동물 윤리 준칙에 따라 수행되었다 (Permit Number: KHUASP(SE)-16-145).

3. 비만 유도 모델 및 약물 투여

고지방 식이 비만 유도 동물모델 구축을 위해 60kcal % 지방을 함유한 고지방 식이(HFD; high fat diet, Research Diets, D12492)를 7주간 공급하여 비만으로 유도하였다(Table. 1). 4주간의 고지방 식이 후 실험 시작(0주차)과 비교해 유의적인 체중 증가를 확인한 후 약물 투여를 시행하였다. 마우스를 아래로 눕히는 것을 기준으로 하여 오른쪽 서혜부 지방(inguinal fat pad)은 대조군(vehicle)으로서 생리식염수를 100 µL씩 주사하였고, 왼쪽 서혜부 지방(inguinal fat pad)은 PD 약침액 0.6mg의 농도로 100 µL (20 mg/kg) 농도로 주사하였다. PD 약침

Fig. 1. Experimental design and sample treatment. Based on when the mouse is lying down, 100 µL of physiological saline was injected into the right inguinal fat pad as a control, and 100 µL of PD extract at a concentration of 20 mg/kg (0.6 mg) was injected into the right inguinal fat pad.

4. 마우스 체중 측정 및 서혜부(Inguinal) 지방 무게 측정

마우스의 체중은 실험 시작일부터 종료일까지 전자저울(OHAUS pioneer, PAG214)을 사용하여 일정한 시간대인 오전 10시에 매주 1번씩, 총 8번 측정하였다. 마우스의 움직임이 멈추었을 때의 체중을 기록하여 체중의 오차를 최소화하였다. 실험 종료 날 실험동물은 Zoletil™ (tiletamine HCl and zolazepam, Virbac Lab, Carroscedex, France)을 복강 투여하여 전신 마취시킨 후 희생시켰다. 개복 후 마우스의 복부를 촬영하였으며, 생리식염수가 처리된 오른쪽 서혜부 지방(inguinal fat pad)과 PD 약침액이 투여된 왼쪽 서혜부 지방을 분리하여 각각의 무게를 전자저울(PAG214, OHAUS pioneer)을 사용하여 측정하였다.

5. 조직 병리 변화 관찰

실험 종료 후, 대조군(vehicle) 및 PD 약침액이 처리된 서혜부 지방 조직은 10% paraformaldehyde에 24시간 동안 고정하였다. 고정액이 남지 않게 충분히 수세시킨 후, 자동표본조직처리기(automatic tissue processor)를 통해 탈수(dehydration), 투명(clearing), 침투(impregnation) 과정을 거쳐 표본을 제작하고 파라핀으로 포매(tissue embedding) 하였다. 파라핀 블럭은 조직 절편기(microtome, Leica, HIS-3368, Germany)를 사용하여 5 m 간격으로 박절(sectioning)하여 절편을 만든 후 탈 파라핀(deparaffinization), 탈수 과정(dehydration; 70%, 95%, 100% 에탄올 순차 처리) 및 함수(hydration; 100%, 95%, 70% 에탄올 순차 처리) 과정을 거친 다음 hematoxylin & eosin (H&E)의 염색을 실시하였다. Hematoxylin 용액의

로 6분간 염색 후, 0.1~1% hydrogen chloride (HCl)이 각각 포함된 75% alcohol로 세척한 후 eosin 용액을 떨어뜨려 3분간 대조 염색하고, 95% 및 100% 알코올로 탈수, 투명 과정을 거친 후 PermOUNT (VectaMount, Vectro Labs, USA)로 봉입하여 구조변화를 현미경으로 관찰하였다. 염색된 슬라이드는 지방 조직의 크기 분석을 위해 광학 현미경으로 400 배율에서 관찰되었다.

6. 지질대사 관련 단백질 발현의 분석

실험이 종료된 마지막 날 수집된 마우스 서혜부 지방 조직 및 3T3-L1 지방세포에서 차전자 약침액이 지방 조직의 단백질 대사에 미치는 영향을 조사하기 위해 Western blotting assay를 실시하였다. 서혜부 지방 50 mg을 protease inhibitors cocktail이 포함된 RIPA assay buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM EDTA) 700 μ L에 넣어 분쇄한 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액에 있는 총단백질을 분리하였다. 얻어진 단백질은 Bradford method를 사용하여 정량하고, 단백질 30 μ g은 SDS 12%-polyacrylamide gel 전기영동을 통해 분리하고, Transfer buffer (39 mM glycine, 48 mM Tris-base, pH 8.3, 0.37% (w/v) SDS, 20% (v/v) methanol)를 사용하여 PVDF membrane 막으로 이동시켰다. 단백질이 옮겨진 membrane은 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 위해 5% BSA (in TBS-T)를 처리하고, 1차 항체인 Anti-mouse- β -actin, HSL, ATGL (in TBS-T, 1:1,000)이 처리되어 4°C에서 overnight에서 반응시켰다. 다음날 TBS-T로 15분 동안 3회 세척하고, horseradish peroxidase; HRP가 결합된 goat-anti-mouse 2차 항체를 TBS-T로 희석하여 (1:2,000) 실온에서 1시간 동안 처리되었으며, 이후 enhanced chemiluminescence (ECL) assay kit를 사용하여 LAS (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, USA)로 밴드가 측정되었다. internal control로 β -actin이 사용되었다.

7. 3T3-L1 지방 전구세포의 배양 및 분화 유도

3T3-L1 (mouse embryonic fibroblast cell line) 지방전구세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, WelGene Biopharmaceuticals, Daegu, Korea)에 10% Bovine Calf Serum (BCS, WelGene Biopharmaceuticals, Daegu, Korea), antibiotics (penicillin/streptomycin 100 units/ml, Bioshop, Burlington, Ontario, Canada)를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 세포는 6 well plate에 5 × 10⁴로 seeding 한 후 confluent 상태까지 배양한 후 이틀간 방치하여 100% confluent 상태로 만들었다 (day 0). 3T3-L1 지방 전구세포(preadipocyte)는 지방세포(adipocyte)로 분화할 수 있으며, 지방 세포 형성과 지방 대사 조절인자들을 연구하는 모델로 사용되고 있다²².

지방세포 분화를 위해 MDI (10 μ g/ml insulin, 0.1 μ M dexamethasone 및 0.5 μ M IBMX) 분화 배지로 교환하여 3

일간 배양하였으며 (day 1-3), 그 후 2일 마다 10 μ g/ml insulin이 포함된 배지로 교환하면서 지방분화의 정도를 확인하였다(day 4-10). 10 일간 분화 유도 후, 차전자 약침액은 0.1, 1, 10 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리하였다 (day 11).

8. 분화된 3T3-L1 지방세포의 지방구(lipid droplet) 측정

차전자 약침액 처리가 분화된 3T3-L1 지방세포의 Lipid droplet 생성 정도에 미치는 영향을 평가하기 위해 Oil Red O 염색을 실시하였다. 지방 분화가 끝난 3T3-L1 지방세포에 차전자 약침액을 0.1, 1, 10 μ g/ml 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후, 인산염 완충용액(phosphate-buffered saline; PBS)으로 세척한 후 4% formalin으로 1시간 동안 고정하였다. 고정된 세포는 60% isopropanol을 이용하여 세척한 다음 Oil Red O working solution을 처리하여 실온에서 1시간 동안 염색하였다. 염색 후 Oil Red O solution을 제거하고 증류수로 3회 세척한 후 완전히 건조시켜 광학 현미경 이용하여 관찰하였다(\times 100). 또한, 정량적 분석을 위하여 100% isopropanol을 이용하여 지방구를 용출한 후 96 well plate에 200 μ L씩 옮겨서 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. 분화된 3T3-L1 지방세포의 지방분해효소 측정

분화된 3T3-L1 지방세포에서의 지방분해효소인 HSL 및 ATGL의 분비량을 확인하기 위해, 샘플 처리가 완료된 (day 11) 3T3-L1 세포를 1× PBS로 세척 후, protease inhibitor cocktail을 포함하는 RIPA buffer로 균질화하였다. 분화된 3T3-L1에서 얻어진 단백질에서 지방분해효소인 HSL 및 ATGL의 발현을 Western blotting assay로 평가하였다. 분석 방법은 상위 기술된 방법과 동일하다.

10. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균 \pm 표준오차(standard error of the mean) 값으로 표시하였다. 통계적 분석은 ANOVA (analysis of variance)을 이용하여 Dunnett's test로 대조군(vehicle)과 실험군(PD) 간의 차이를 분석하였으며, p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과

1. 체중 변화

적응기가 끝난 0 주차 마우스의 체중은 23.11 \pm 0.91 g으로, 고지방 식이 유도 후 체중 변화는 1 주차 25.95 \pm 1.37 g, 2 주차 27.20 \pm 1.43 g, 3 주차 28.64 \pm 2.01 g, 4 주차 30.34 \pm 2.79 g, 5 주차 30.00 \pm 2.68 g으로 약 29.8%의 체중 증가를 확인하였으며, 서혜부 지방에 PD 약침액을 투여한 3회 투여한 후 6 주차의 체중은 30.48 \pm 2.79 g, 6회 투여 이후인 7 주차는 30.06 \pm 3.00 g으로 체중의 유의적인 증감은 관찰되지 않았다 (Fig. 2).

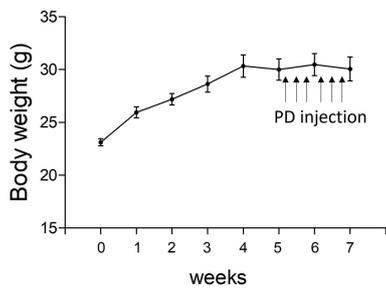


Fig. 2. The changes of body weight in HDF-induced obesity mice. The PD extract was injected six times over two weeks, three times a week, starting from the fifth week of high-fat diet supply. The arrow indicates PD injection. PD: *Plantago depressa* Willd. extract.

2. 차전자 약침액이 국소 지방 조직 무게에 미치는 영향
차전자 약침액 처리에 의한 국소 부위의 지방 조직의 변화를 확인하기 위해 실험 종료 날 복부를 개방하여 서혜부 지방의 분포도 및 무게를 측정하였다 (Fig.3A). 비만 유도된 마우스에서 생리식염수가 투여된 대조군(vehicle)서혜부 지방 조직 무게는 140.99 ± 30.74 mg, PD 약침액이 투여된 서혜부 지방 조직의 무게는 102.93 ± 37.04 mg로 유의적인 감소가 관찰되었으며 (Fig. 3B), 대조군(1.00 ± 0.22)을 기준으로 PD 약침액 처리군에서는 0.73 ± 0.26 으로, 차전자 약침액 투여군에서 약 30%의 지방 감소를 나타내었다(Fig. 3C).

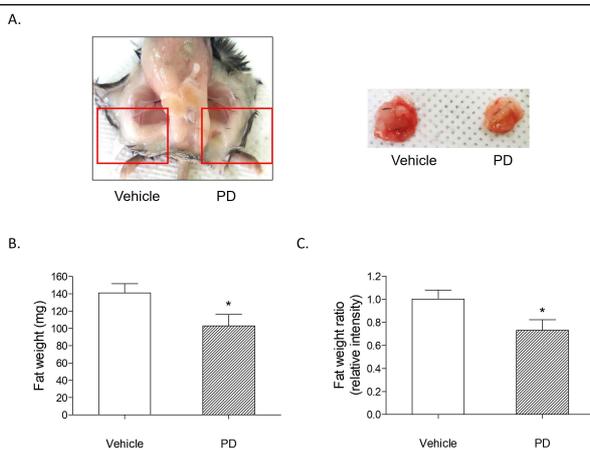


Fig. 3. The effect of local PD treatment on the weight of inguinal fat tissues after six injections. (A) The visual aspect of the inguinal fat pad, (B) the weight of inguinal fat, and (C) the ratio of inguinal fat to body weight. * $p < 0.05$ vs. the vehicle group. PD: *Plantago depressa* Willd. extract.

3. 차전자 약침액이 국소 지방세포의 크기에 미치는 영향

PD 약침액 국소 처리가 지방 조직에 미치는 변화를 평가하기 위해 조직병리학 분석을 시행하였다. 대조군(vehicle)인 생리식염수가 투여된 왼쪽 서혜부 지방 세포의 크기($260.41 \pm 70.93 \mu\text{m}$)에 비해 PD 약침액 처리 군의 오른쪽 서혜부 지방 세포 크기는 $226.61 \pm 78.35 \mu\text{m}$ 로 측정되었다(** $p < 0.001$, Fig. 4A). 지방 매개변수 비율(fat diameter ratio)은 대조군(vehicle) 1.00 ± 0.25 를 기준으로 PD 약침액에서는 0.88 ± 0.33 로 약 12.98%의 지방세포 크기의 감소 하였다(** $p < 0.001$, Fig. 4B).

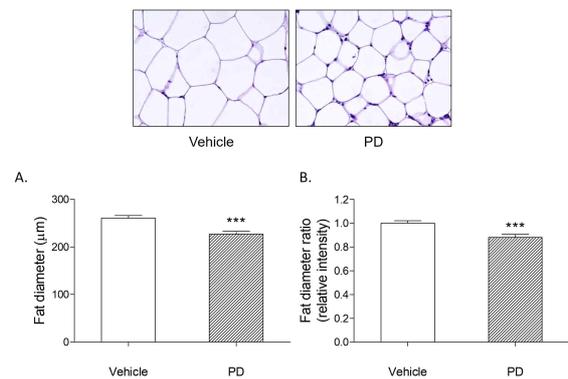


Fig. 4. The effect of local PD treatment on the fat diameter of inguinal fat tissues after six injections. PD-injected inguinal fat tissue was histologically analyzed through hematoxylin and eosin staining. Microscopic examination was observed at 400x magnification. (A) The fat diameter of inguinal fat, and (B) the ratio of fat diameter in inguinal fat. *** $p < 0.001$ versus the vehicle group. PD: *Plantago depressa* Willd. extract.

4. 차전자 약침액이 지방분해효소에 미치는 영향

비만 유도 마우스에서 PD 약침액의 국소처리가 비만 유도 마우스 내 서혜부 지방 세포 내 지방분해효소인 HSL 및 ATGL의 분비에 미치는 영향을 분석하였다. 생리식염수를 투여한 대조군(vehicle)의 HSL 발현량 (1.00 ± 0.24)에 비해 PD 약침액을 투여한 서혜부 지방 조직 내 HSL 발현량은 3.38 배 증가하였다(3.38 ± 1.33 , Fig. 5A). ATGL의 발현량 또한 대조군(vehicle)에 비해(1.0 ± 0.11) PD 약침액을 투여한 지방 조직에서 3.08 배 증가하였다(3.08 ± 1.10 , Fig. 5B).

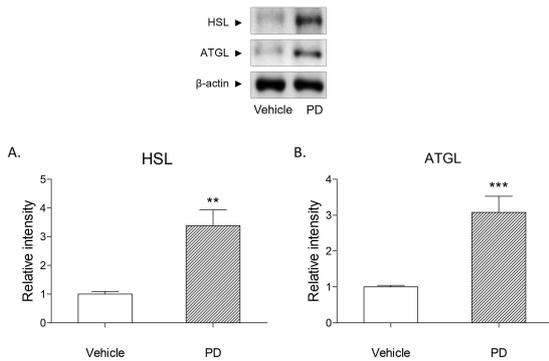


Fig. 5. The effect of local PD treatment on adipose-degrading enzyme protein in inguinal fat tissues after 6 injections. Protein expression in (A) HSL and (B) ATGL in the inguinal fat pad was performed by Western blot analysis. ***p < 0.001 and **p < 0.01 vs. the vehicle group. PD: *Plantago depressa* Willd. extract.

5. 차전자 약침액의 3T3-L1세포에 대한 지방구 분해능 평가

PD 처리가 분화된 3T3-L1 지방세포 내 지방구에 미치는 영향을 확인하기 위하여 PD 약침액을 농도별 (0, 0.1, 1, and 10 μ g/mL)로 24 h 처리한 후 Oil red O 염색을 실시하여 세포 내 지방구의 생성 정도를 확인하였다(Fig. 6A). 3T3-L1 지방 전구세포에 10 일간 분화 및 지방 생성을 유도 각테일 MDI 처리군에서는 세포질 내 지방구가 생성되어 성숙한 지방세포가 형성하였으며, MDI 분화 후 PD 약침액 농도 의존적으로 지방구의 형성이 현저하게 억제되는 것이 확인되었다(0.1 μ g/mL; 18.71%, 1 μ g/mL; 27.39%, 10 μ g/mL; 32.00%, Fig. 6B).

6. 차전자 약침액이 3T3-L1 지방세포의 지방분해효소에 미치는 영향

분화된 3T3-L1 지방세포에서 PD 약침액이 지방 대사에 관여하는 지방분해효소인 HSL 및 ATGL의 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 분화를 유도한 지방세포인 MDI 군 비해 1, 10 μ g/ml PD 약침액을 처리한 군에서는 HSL의 발현이 대조군(vehicle)에 비해 각각 1.85 배, 3.04 배 증가하였다(Fig. 7A). ATGL의 발현의 경우 10 μ g/ml에서만 1.25배 증가함을 확인하였다(Fig. 7B).

고찰

본 연구는 고지방 식이로 유도한 비만 동물모델에서 차전자 약침액의 국소 부위 지방감소 효과를 확인하기 위해 7 주간 고지방 식이와 함께, 2주간 총 6번 (3 times/weeks) 서혜부 지방(inguinal fat pad)에 차전자 약

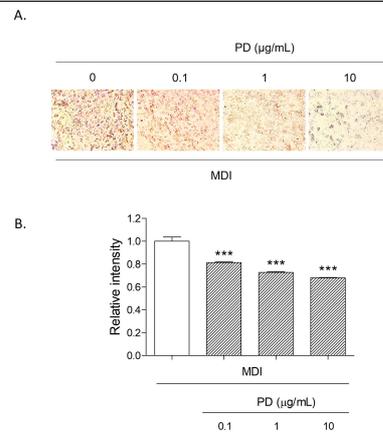


Fig. 6. The effect of PD treatment on lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes. After inducing adipocyte differentiation for 10 days, PD was treated at concentrations of 0.1, 1, and 10 μ g/ml for 24 hours. (A) Representative images of intracellular lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes using Oil Red O staining. (B) The intracellular triglyceride content was measured in 3T3-L1 adipocytes. All experiments were performed independently in triplicate. ***p < 0.001 vs. 0 (non-PD treatment). PD: *Plantago depressa* Willd. extract.

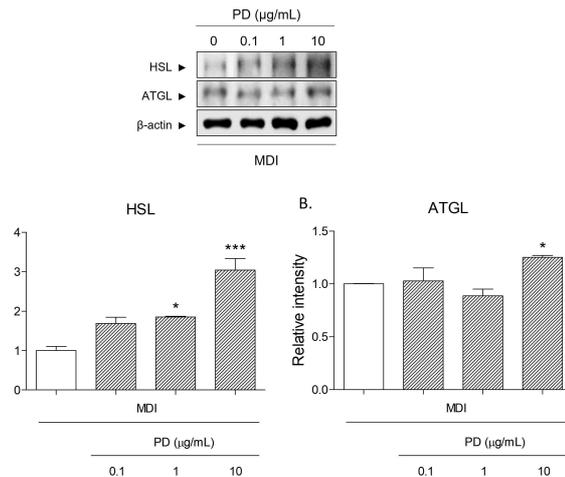


Fig. 7. The effect of PD treatment on adipose-degrading enzyme protein in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Protein expression in (A) HSL and (B) ATGL in differentiated 3T3-L1 adipocytes were performed by Western blot analysis. All experiments were performed independently in triplicate.***p < 0.001, *p < 0.05 vs. 0 (non-treatment). PD: *Plantago depressa* Willd. extract.

침액을 투여한 후 지방의 무게 변화와 지방 세포의 크기, 그리고 지방분해효소(lipase) 관련 인자의 발현을 평가했다.

한의학에서 활용되는 병변 부위에 약물을 직접 주입하는 약침 치료법은 경락학을 기반으로 하여 병변 부위의 치료 효과를 최대화하기 위해 적용된다²³. 이 방법은 비교적 유효성, 재현성, 사용 편의성이 뛰어나 임상 치료 및 연구 분야에서의 사용이 증가하고 있다²⁴. 따라서, 국소 부위에 직접적으로 차전자 약침액을 투여함으로써 국소 부위의 지방 분해 효과를 확인하고자 하였다.

차전자는 “저령차전자탕”, “차전자산” 등의 처방에서 “이뇨통림(利尿通淋)” 효능으로 율체된 습(濕)을 조절하는데 사용되며, 약리학적으로 주요 성분인 aucubin, catalpol, geniposidic acid, plantagoside 등은 Iridoid glycosides로 분류되며, 이 외에도 polysaccharides와 flavonoids와 같은 성분이 포함되어 있다²⁵. 차전자의 주요 활성 성분인 iridoid glycosides는 항고지혈증(antihyperlipidemic) 및 항염증(anti-inflammatory)을 통한 지질 대사조절에 기여됨이 보고되었으며²⁶, flavonoids는 강력한 항산화제로서 체내 염증을 감소시키고, 대사증후군과 비만으로 인한 산화 스트레스 감소 효과에 대해 보고 되었다²⁷.

서혜부(inguinal fat pad) 지방은 복부 내부에 위치하는 내장지방과 달리, 피부 바로 아래에 위치하는 피하지방으로서 뚜렷한 해부학적 특성이 있어 접근이 용이하여 국소 부위 연구에 많이 활용 됩니다²⁸. 차전자 약침액을 서혜부 지방에 주사하는 동안 이상 반응은 관찰되지 않았으며, 마우스 체중의 유의미한 변화는 관찰되지 않았다. 차전자 약침액을 경구 투여 시 체중 감소가 관찰된 이전 연구 결과와 다른 약물 투여 경로에 따른 약물의 대사율 차이의 결과로 해석될 수 있으며, 이는 국소 부위의 약침 요법이 전신 반응에 영향을 미치지 않음을 시사한다²⁹.

지방 세포의 증가는 세포의 크기가 커지면서 조직이 커지는 상태인 비대(hypertrophy)와 세포수가 증가하면서 조직이 커지는 증식(hyperplasia)으로 나눌 수 있다³⁰. 차전자 약침액이 투여된 서혜부 지방조직 무게(inguinal fat tissues weight)는 식염수가 투여된 부분에 비해 약 30%의 감소율을 나타내었으며 (Fig. 3, *p < 0.05), 조직학적 평가를 통해 관찰된 차전자 약침액에 의해 지방 세포의 크기(adipose cell size)도 12.98%의 감소되었다 (Fig. 4, ***p < 0.001). 이러한 결과는 차전자 약침액 투여가 국소 부위 지방에 지방세포의 비대뿐만 아니라 증식을 억제함을 보여준다.

식을 통해 유입된 중성지방은 간에서 리파제(lipase)라고 불리는 효소에 의해 지방산(fatty acids)과 글리세롤(glycerol)로 분해된다³¹. 분해된 지방산(fatty acids)은 간에서 분비되어 혈중으로 이동하여 다른 조직이나 세포로 운반되어 에너지 생산 혹은 지방 조직에 다시 저장되게 된다³². 유입되는 지방산이 많을수록 지방 조직에 축적되는 양도 증가하게 됨으로써 비만이 발생하게 된다. 비만을 치료하는 방법으로는 과도한 지방축적을 조절하는 기전인 지방 전구세포에서 지방 세포로의 분화를 막거나, 지방 축적 자체를 억제하는 지방 분해를 촉진하는 방법 등이 있다³³.

지방 대사에 관여하는 지방 분해효소로 HSL, ATGL, lipoprotein lipase (LPL) 등이 알려져 있으며³⁴, HSL은 아드레날린 및 글루카곤과 같은 호르몬에 의해 세포 내에 Protein Kinase A를 활성화함으로써 HSL가 최종적으로 중성지방을 지방산과 글리세롤로 분해하는 역할을 함으로써 지방분해 경로에 관여하게 된다³⁵. ATGL 또한 중성지방을 분해하는 주요 효소 중 하나로 지방산과 글리세롤을 분해하는 역할을 담당하고 있다³⁶. HSL과 다르게 ATGL은 자체로 활성화되는 경향이 있으며, 활성화에 필요한 외부의 신호 개입이 적은 편이며, HSL은 지방세포의 지방구에 결합하여 작용하는 반면, ATGL은 주로 세포질에 존재하여 지방구와의 상호작용은 상대적으로 적다³⁷. 차전자 약침액을 처리한 서혜부 지방에서 약 3배의 HSL(**p < 0.01)의 발현 증가뿐만 아니라 ATGL(***p < 0.001)의 증가를 관찰하였으며(Fig. 5), 이 결과는 차전자 약침액이 지방조직 내 HSL 및 ATGL 효소의 활성을 증가시켜 지방 분해 과정에 기여 하는 것으로 사료된다.

지방구 생성의 감소에 대한 분자학적 분석을 위해, 분화된 3T3-L1 지방세포에 차전자 약침액을 처리하여 지방 분해 효소인 HSL과 ATGL의 발현 변화를 측정하였다. 지방 유도 카테일 MDI cocktail이 처리로 인해 3T3-L1 지방 세포 내부에 지방구의 함량이 증가되는 것을 확인하였으며, 차전자 약침액 10 µg/ml을 24시간 동안 처리한 지방 세포의 경우 지방구의 형성이 약 32% 감소한 것을 확인하였다(*p < 0.05). 차전자 약침액의 농도 의존적인 지방구 감소는 차전자 약침액이 in vitro 상에서 지방세포 내 지방구의 지방 분해에 효과적임을 재검증한 결과로 볼 수 있다 (Fig. 6). 뿐만 아니라, MDI처리군 지방세포에 비해 차전자 약침액 처리한 그룹에서 HSL 및 ATGL 발현이 고농도 처리군에서 증가함을 확인 하였다 (Fig. 7). 이러한 결과는 앞서 서술되었던 결과들과 일치하며, 종합적으로 차전자 약침액이 3T3-L1 지방세포에서 지방분해 효소인 HSL 및 ATGL의 활성 촉진을 통해 국소 부위 지방 감소 약침 치료제로써의 가능성을 제시한다. 더 나아가, 차전자 약침액의 장기 투여 시 안정성 평가와 지방감소 효과 평가를 위한 실험이 추가적으로 필요할 것으로 보이며, 후속 연구를 통해 장기 투여로 인한 체내 축적, 내성 및 부작용 뿐만 아니라 지방 지방 감소를 유도하는 다양한 신호 경로와 분자 기전을 분석하여 지방 감소에 미치는 기타 분자적 인자들을 규명하고자 한다.

결론

차전자 약침액은 HSL과 ATGL의 발현을 촉진하여 국소 지방 무게와 세포 크기를 줄여 국소 부위 지방 감소 효과를 보였으며, 이는 향후 지방 감소 원료 개발에 대한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료 된다.

감사의 글

이 논문은 2024년도 정부재원(미래창조과학부 여성 과학기술인R&D 경력복귀지원사업)으로 한국연구재단과 한국여성과학기술인지원센터의 지원을 받아 연구되었습니다.

참고문헌

1. Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. Energy balance and obesity. *Circulation*. 2012; 126(1): 126-132.
2. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 706978.
3. Schwartz MW, Seeley RJ, Zeltser LM, Drewnowski A, Ravussin E, Redman LM, et al. Obesity Pathogenesis: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev*. 2017; 38(4): 267-296.
4. Lim JU, Lee JH, Kim JS, Hwang YI, Kim TH, Lim SY, et al. Comparison of World Health Organization and Asia-Pacific body mass index classifications in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017; 12: 2465-2475.
5. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*. 2015; 33(7): 673-689.
6. Mirza MS. Obesity, Visceral Fat, and NAFLD: Querying the Role of Adipokines in the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN Gastroenterol*. 2011; 2011: 592404.
7. Frayn KN, Humphreys SM. Metabolic characteristics of human subcutaneous abdominal adipose tissue after overnight fast. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 302(4): E468-E475.
8. Sanyaolu A, Okorie C, Qi X, Locke J, Rehman S. Childhood and Adolescent Obesity in the United States: A Public Health Concern. *Glob Pediatr Health*. 2019; 6: 2333794X19891305.
9. Kumanyika SK. A Framework for Increasing Equity Impact in Obesity Prevention. *Am J Public Health*. 2019; 109(10): 1350-1357.
10. 대한비만학회. CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR OBESITY, 8th Edition. Seoul: Korean Society for the Study of Obesity; 2022.
11. Dixit VV, Wagh MS. Unfavourable outcomes of liposuction and their management. *Indian J Plast Surg*. 2013; 46(2): 377-392.
12. Dhama LD. Liposuction. *Indian J Plast Surg*. 2008; 41(Suppl): S27-S40.
13. Niu S, Ren L. Treatment of obesity by acupuncture combined with medicine based on pathophysiological mechanism: A review. *Medicine (Baltimore)*. 2023; 102(48): e36071.
14. 韓醫입상진료지침-비만, 한의학연구원, 2016년, 엘스비어코리아 (유) (Elsevier Korea L.L.C.)
15. on J, Kang B, CHoi S, Ryu E. A Study of Syndrome Index Differentiation in Obesity. *J Korean Med Obes Res* 2007;7:55-70.
16. Tzeng TF, Liu WY, Liou SS, Hong TY, Liu IM. Antioxidant-Rich Extract from Plantaginis Semen Ameliorates Diabetic Retinal Injury in a Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Model. *Nutrients*. 2016; 8(9): 572.
17. Ji-Ping L, Ren-Chao T, Xiao-Meng S, Hao-Yue Z, Shuai S, Ai-Zhen X, et al. Comparison of main chemical composition of *Plantago asiatica* L. and *P. depressa* Willd. seed extracts and their anti-obesity effects in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomedicine*. 2021; 81: 153362.
18. Yu BS, Lee JH, Cho SE, Baek SH. Antifibrotic Effects of Oriental Herbs Extraction on Liver Cirrhosis. *YAKHAK HOEJI* 2007;51(1):7-12
19. Effects of Plantaginis Semen & Poria (CJB) Water Extract on Histomorphometrical Aspects and Histopathological Changes in High Fat Diet-induced Obese Rats. *The Korea Journal of Herbology*. 2012 ; 27(5) : 99-107.
20. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*. 2010;23(2):270-299.
21. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:798-808.
22. Chen J, Lu Y, Tian M, Huang Q. Molecular mechanisms of FOXO1 in adipocyte differentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2019; 62(3): R239-R253.
23. Sung SH, Shin BC, Park MJ, Kim KH, Kim JW, Ryu JY, et al. Current status of management on pharmacopuncture in Korea through introduction of an accreditation system. *Journal of Pharmacopuncture*. 2019; 22(2): 75–82.
24. Park KS, Kim S, Seo JY, Cho H, Lee JY, Lee YJ, et al. Effectiveness and safety of pharmacopuncture therapy for chronic low back pain: A protocol for a pragmatic randomized controlled trial. *Journal of Pain Research*. 2022; 15: 2629–2639.
25. Najafian Y, Hamed SS, Farshchi MK, Feyzabadi Z. *Plantago major* in Traditional Persian Medicine and modern phytotherapy: a

- narrative review. *Electron Physician*. 2018; 10(2): 6390-6399.
26. Wang C, Gong X, Bo A, Zhang L, Zhang M, Zang E, et al. Iridoids: Research Advances in Their Phytochemistry, Biological Activities, and Pharmacokinetics. *Molecules*. 2020; 25(2): 287.
27. Mahboob A, Samuel SM, Mohamed A, Wani MY, Ghorbel S, Miled N, et al. Role of flavonoids in controlling obesity: molecular targets and mechanisms. *Front Nutr*. 2023; 10: 1177897.
28. Lee YY, Tang T, Chan E, Phuah ET, Lai OM, Tan CP, et al. Medium chain triglyceride and medium-and long chain triglyceride: metabolism, production, health impacts and its applications – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021; 62: 4169-4185.
29. Yang Q, Qi R, Tong R, Wang D, Ding L, Li Z, Hunag C, Wang Z, Yang L. *Plantago asiatica* L. Seed Extract Improves Lipid Accumulation and Hyperglycemia in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017;18(7): 1393.
30. Ogden CL, Carroll M, Kit BK, Flegal K. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA*. 2014; 311(8): 806-814.
31. Locke A, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015; 518: 197-206.
32. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019; 15: 288-298.
33. Lal S, Kirkup AJ. Adipocyte differentiation and its implications for metabolic disease. *Clinical Science*. 2020; 134(5): 641-656.
34. Hamilton A, Zhang Q, Salehi A, Willems M, Knudsen JG, Ringgaard AK, et al. Adrenaline stimulates glucagon secretion by Tpc2-dependent Ca²⁺ mobilization from acidic stores in pancreatic α -cells. *Diabetes*. 2018; 67(5): 1128-1139.
35. Yamada M, Suzuki J, Sato S, Zenimaru Y, Saito R, Konoshita T, et al. Hormone-sensitive lipase protects adipose triglyceride lipase-deficient mice from lethal lipotoxic cardiomyopathy. *Journal of Lipid Research*. 2022; 63.
36. Wang J, Liang G, Zhao TJ. Adipose triglyceride lipase: the first transacylase for FAHFAs. *Life Metabolism*. 2022; 2.
37. Romero A, Mu A, Ayres J. Adipose triglyceride lipase mediates lipolysis and lipid mobilization in response to iron-mediated negative energy balance. *iScience*. 2022; 25. 2004:25(3):440-450



