

## 고지방식이 유도 비만쥐에서 이묘산의 항비만 효과

강석범 · 손우석 · 김영준 · 우창훈

대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학교실

### Anti-Obesity Effects of *Imyo-san* on High Fat Diet Induced Obese Mice

Seok-Beom Kang, K.M.D., Woo-Seok Shon, K.M.D., Young-Jun Kim, K.M.D., Chang-Hoon Woo, K.M.D.

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

**Objectives** This study is to investigate the effects and mechanisms of *Imyo-san* (IMS) on the obese mice model induced by high-fat diet.

**Methods** Antioxidative capacity was measured by *in vitro* method. C57BL/6 mice were randomly assigned into 5 groups (n=7). Normal group was fed general diet (Normal). The other 4 groups were fed high fat diet (HFD) with water (Control), with *Garcinia gummi-gutta* (GG, *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg), with low-dose IMS (IMSL, *Imyo-san* 0.54 g/kg) and with high-dose IMS (IMSH, *Imyo-san* 1.08 g/kg).

**Results** IMS showed high radical scavenging activity. After 6 week experiment, body weight, food intake, food efficiency ratio (FER), epididymal fat and liver weight, triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL) cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, very low density lipoprotein (VLDL) cholesterol, sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1), phospho-acetyl-CoA carboxylase (p-ACC), fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1), SREBP-2, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), phospho-liver kinase B1 (p-LKB1), phospho-AMP-activated protein kinase (p-AMPK), peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), uncoupling protein-2 (UCP-2), carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT-1A), and histology of liver and epididymal fat were measured and analysed. Body weight gain, FER, liver and epididymal fat weight of IMS groups were significantly decreased. There were significant improvements in blood lipids with less TG, TC, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and more HDL-cholesterol. Proteins associated with lipid synthesis (SREBP-1, p-ACC, FAS, SCD-1) and cholesterol (SREBP-2, HMGCR) was improved. Factors regulating lipid synthesis and lipid catabolism (p-LKB1, p-AMPK, PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , UCP-2, CPT-1A) were increased. In histological examinations, IMS group had smaller fat droplets than control group. All results increased depending on concentration.

**Conclusions** It can be suggested that IMS has anti-obesity effects with improving lipid metabolism. (**J Korean Med Rehabil 2022;32(2):19-36**)

RECEIVED March 21, 2022

REVISED April 1, 2022

ACCEPTED April 4, 2022

#### CORRESPONDING TO

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

TEL (054) 281-0055

FAX (054) 281-7463

E-mail jungwsungw@hanmail.net

Copyright © 2022 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

**Key words** *Imyo-san*, Lipid metabolism disorders, Anti-obesity agents, Antioxidants, Anticholesteremic agents

## 서론»»»»

비만은 체내에 필요한 에너지보다 과다 섭취되거나 섭취된 에너지보다 소비가 부족하여 초래되는 에너지 불균형의 상태를 말한다<sup>1)</sup>. 국내에서는 세계보건기구(World Health Organization) 아시아태평양 비만지침<sup>2)</sup>에 따라 체질량지수(body mass index, BMI) 25 kg/m<sup>2</sup> 이상을 비만으로 진단하고 있는데, 2019년 기준 대한민국 성인의 비만 유병률은 33.8%로 2005년 이후 꾸준히 증가하는 추세이며 특히 성인 남성에서 41.8%의 높은 유병률을 보이고 있다<sup>3)</sup>. 비만은 고혈압, 당뇨, 고지혈증과 같은 대사 증후군의 원인으로 지목되고 있으며<sup>4)</sup>, 특히 우리나라 성인을 대상으로 한 연구<sup>5)</sup>에서 고도비만일 경우 정상체중보다 대사 증후군이 있을 위험이 36.9배 높은 것이 확인되었다. 그러나 비만 치료를 위해 현재 사용되고 있는 약제는 장기간 사용할 경우 심혈관계에 미치게 되는 효과 및 안전성에 관한 연구 결과가 부족한 상황이기 때문에<sup>6)</sup> 안전하고 지속가능한 약제의 필요성이 대두되고 있는 실정이다.

『東醫寶鑑』<sup>7)</sup>에서 二妙散은 습열로 인해 생긴 통풍으로 힘줄과 뼈가 아픈 증상에 사용한다고 기록하고 있다. 二妙散은 黃柏, 蒼朮 각 등분으로 구성되어 있으며 二妙散 복합제에 관한 연구는 항염증 효과<sup>8-10)</sup>와 항암효과<sup>11)</sup>, 항동맥경화 효과<sup>12)</sup>에 관한 연구와 관절염<sup>13,14)</sup> 및 급성 췌장염<sup>15)</sup>에 대한 동물실험 효능이 보고되어있다. 黃柏에 관한 세포 및 동물실험으로 항산화효과<sup>16,17)</sup>, 항염효과<sup>18)</sup>, 항당뇨효과<sup>19,20)</sup> 및 항비만효과<sup>21,22)</sup>가 보고되었으며 蒼朮 역시 항산화<sup>23)</sup>, 항비만<sup>24)</sup>, 항당뇨<sup>25,26)</sup>효과가 알려져있다. 그러나 二妙散의 항비만 효과는 연구되지 않았다.

때문에 항비만효과가 보고된 黃柏, 蒼朮로 구성된 二妙散의 비만에 대한 효능을 다각도에서 확인하고자 체중, 단백질 표지자 및 조직학적 변화 등의 지표를 포함하여 실험을 설계하였으며, 그 결과 유의한 성과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법»»»»

### 1. 재료

#### 1) 시약

본 실험에 사용된 gallic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), sodium hydroxide, sodium carbonate, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), quercetin, potassium persulfate, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, potassium phosphate monobasic 및 potassium phosphate dibasic은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA), protease inhibitor mixture triglyceride (TG) 및 total cholesterol (TC) assay kit를 구입하였다. 또한, high density lipoprotein (HDL)-cholesterol assay kit는 Asan pharmaceutical (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. L-ascorbic acid 및 aluminium chloride는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1), fatty acid synthase (FAS), uncoupling protein-2 (UCP-2), peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), histone, sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT-1A), phospho-liver kinase B1 (p-LKB1), liver kinase B1 (LKB1), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR),  $\beta$ -actin 및 sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1)은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하여 사용하였다. Phospho-AMP-activated protein kinase (p-AMPK), AMP-activated protein kinase (AMPK), acetyl-CoA carboxylase (ACC) 및 phospho-acetyl-CoA carboxylase (p-ACC)는 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였고, 2차 항체는 GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. GE Healthcare (Chicago, IL, USA)에서 nitrocellulose membranes와 ECL western blotting detection reagents를 구입하여 사용하였다. Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)에서 BCA protein assay kit를 구입하였다.

## 2) 동물

DBL (Eumseong, Korea)에서 4주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 구입하여 물과 일반사료(Zeigler Bros., Inc., Gardner, PA, USA)를 공급하였으며, 1주일간 사육실 환경에 적응시켜 본 실험에 사용하였다. 본 실험은 동물실험의 윤리적, 효율적인 관리 및 과학적 타당성 검토를 하기 위해 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인(승인번호: DHU2021-074)을 받아 실험을 진행하였다. 동물실은 conventional system으로 명암 주기는 12시간 기준으로 조절하였으며, 온도 22±2°C와 습도 50±5%으로 설정하였다.

## 3) 시료의 제조

본 실험에 사용한 二妙散의 처방은 朱丹溪의 『丹溪心法·卷四痛風』<sup>27)</sup>에 준하였고, 구성 한약재는 웅기한약국(Daegu, Korea)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 약전규격에 합격한 것만을 사용하였으며, 1첩 분량은 다음과 같다 (Table I). 二妙散의 4첩 분량인 64 g에 10배수의 증류수를 넣은 다음, 100°C에서 2시간 가열하여 추출하였다. 추출물을 여과 후 회전 감압농축기로 농축하여 동결 건조해 20.99 g의 二妙散 물 추출물(IMS, 수율 32.80%)를 얻었으며, -80°C에서 보관하였다.

## 4) 실험기기

본 실험에서는 Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Bucheon, Korea), bead ruptor 12 (Omni International, Inc., Kennesaw, GA, USA), 동결건조기(Freezone 1 liter benchtop freeze dry system; Labconco Corp., Kansas city, MO, USA), ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan), 저온 냉동고(DF8520; Ilshinbiobase Co., Ltd., Dongducheon, Korea), Microplate reader (Infinite M200 pro; Tecan, Männedorf, Switzerland), 열탕추출기(DWT-1800T; Daewoong Bio, Hwaseong, Korea), 전자체중계

(CAS Co. Ltd., Yangju, Korea), vortex mixer (VXMNAL; OHAUS, Seoul, Korea), water bath (WB-11; DAIHAN Scientific Co., Ltd., Wonju, Korea), 회전 감압 농축기(Buchi B-480; BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) 및 원심분리기(LaboGene 1730R; GYROZEN Co., Ltd., Gimpo, Korea)를 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) DPPH free radical 소거능 측정

二妙散 추출물의 DPPH free radical 소거능을 측정하였다<sup>28)</sup>. 二妙散 추출물을 농도별로 희석한 용액 100 µL의 양에 60 µM DPPH 100 µL의 양을 혼합해 30분간 차광하여 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였으며, 흡광도는 아래의 식에 따라 산출하였다.

DPPH radical scavenging activity (%)

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

OD<sub>sample</sub> : 시료의 흡광도

OD<sub>control</sub> : 시료가 없는 흡광도

### 2) ABTS radical 소거능 측정

二妙散 추출물의 ABTS radical 소거능을 측정하였다<sup>29)</sup>. 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate를 혼합해 실온의 암소 상태에서 16시간 이상 방치시켜 ABTS<sup>+</sup>을 형성시켰다. ABTS 용액을 415 nm에서 0.70±0.02의 흡광도를 갖도록 ethanol로 희석하여 본 실험에 사용하였으며, 희석된 용액 95 µL에 추출물을 농도별로 희석된 용액 5 µL를 첨가해 15분 방치하여 측정하였다. L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였으며, 흡광도는 아래의 식에 따라 산출하였다.

ABTS radical scavenging activity (%)

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

OD<sub>sample</sub> : 시료의 흡광도

OD<sub>control</sub> : 시료가 없는 흡광도

Table I. Composition of *Imyo-san*

Herb name	Scientific name	Amount (g)
Changchul	<i>Atractylodes lancea</i>	8
Hwangbaek	<i>Phellodendron amurense</i>	8
Total amount (g)		16

### 3) Total polyphenol과 total flavonoid 측정

Folin-Ciocalteu의 방법을 참고하여 total polyphenol 함량(mg gallic acid equivalents (GAE)/g)을 측정하였다<sup>30)</sup>. 二妙散 추출물 100 μL에 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μL 및 7.5% sodium carbonate 400 μL를 첨가 후 차광하여 30분간 반응시켰으며, UV 분광광도계(Infinite M200, Tecan Group Ltd., ZH, Switzerland)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 gallic acid를 사용하여 표준검량선을 구하고 二妙散 추출물의 total polyphenol 함량을 산출하였다.

Total flavonoid 함량(mg quercetin equivalents (QE)/g)은 aluminium chloride를 사용한 비색법을 참고하여 측정하였다<sup>31)</sup>. 시료 100 μL, methanol 300 μL, 10% aluminium chloride solution 20 μL, 1 M potassium acetate solution 20 μL 및 증류수 560 μL를 혼합하여 차광상태에서 30분

반응시킨 다음, 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로는 quercetin을 사용하였으며, 표준검량선을 구하여 二妙散 추출물의 total flavonoid 함량을 산출하였다.

### 4) 약물투여와 군 분리

실험군은 일반사료를 공급한 정상군(Normal), 60% high fat diet (HFD) (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA)(Table II)를 공급한 대조군(Control), 60% HFD와 가르시니아 캄보지아 추출물을 200 mg/kg 투여한 약물군(GG), 60% HFD와 二妙散 추출물을 0.54 g/kg 투여한 약물군(IMSL) 및 60% HFD와 二妙散 추출물을 1.08 g/kg 투여한 약물군(IMSH)으로 군분리 하였으며, 약물은 증류수에 녹인 다음 6주동안 일정한 시각에 경구투여하였다. 二妙散 추출물의 고농도 투여군은 二妙散을 1첩 추출 시 5.25 g (수율 32.80%)을 얻었기에 성인의 하루 섭취량을 5.25 g/ 60 kg으로 한 후, 마우스의 체표면적 환산계수인 12.33으로 환산하여 1.08 g/kg로 투여하였다. 그리고 이의 절반의 농도인 0.54 g/kg을 저농도로 설정하여 실험을 진행하였다.

**Table II.** The Component of 60% High Fat Diet

Product #	D12492	
	gm%	kcal%
Carbohydrate	26.3	20
Fat	34.9	60
Protein	26.2	20
Total		100
kcal/gm	5.24	
Ingredients	gm	kcal
Calcium carbonate	5.5	0
Casein, 30 Mesh	200	800
Soybean oil	25	225
Maltodextrin 10	125	500
Cellulose, BW200	50	0
Sucrose	68.8	275.2
FD&C Blue Dye#1	0.05	0
Lard	245	2205
Corn starch	0	0
Potassium citrate	16.5	0
Dicalcium phosphate	13	0
L-Cystine	3	12
Vitamin mix V10001	10	40
Mineral mix S10026	10	0
Choline bitartrate	2	0
Total	773.85	4057

### 5) 체중, 식이섭취량 및 식이효율 측정

1일 1회 동일한 시간과 조건에서 전자체중계를 이용하여 마우스의 체중과 사료 섭취량을 측정하였고, 체중 증가량과 식이효율은 아래 공식을 이용해 산출하였다.

#### (1) 체중 증가량(body weight gain)

$$\text{체중 증가량(g)} = \text{실험 종료일 체중(g)} - \text{실험 시작일 체중(g)}$$

#### (2) 식이효율(food efficiency ratio, FER)

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

### 6) 간과 부고환주위지방 무게 측정

본 실험에 사용한 동물을 희생시켜 간과 부고환주위 지방조직을 적출해 생리식염수에 세척 후 물기를 제거한 다음, 무게를 측정하였다.

### 7) 혈청 지질 분석

마우스에서 얻은 혈액을 4,000 rpm, 4°C에서 10분동안 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청 내 TC, TG 및 HDL-cholesterol 수치는 assay kit를 이용하여 측정하였다. 그 외 low density lipoprotein (LDL)-cholesterol과 very low density

lipoprotein (VLDL)-cholesterol은 아래와 같은 Friedewald 공식을 이용하여 산출하였다<sup>32)</sup>.

$$\text{LDL-cholesterol} = \text{TC} - (\text{HDL-cholesterol} + \text{VLDL-cholesterol})$$

$$\text{VLDL-cholesterol} = \text{TG}/5$$

## 8) 단백질 발현량 분석

단백질 발현 분석을 위한 간조직의 세포질 분리를 위해 1.5 M sucrose, 7.5 pH 5 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 7.4 pH 100 mM Tris-HCl 및 15 mM CaCl<sub>2</sub>와 protease inhibitor와 0.1 M DTT를 더한 buffer A를 추가 후 tissue grinder로 분쇄하여 10%의 NP-40를 첨가하였다. Ice 위에서 30분 동안 방치 후, -4°C에서 2분간 12,000 rpm으로 원심분리 하여 세포질이 함유된 상층액을 분리하였다. 핵을 분리하기 위해 10%의 NP-40를 추가한 buffer A로 2회 150 µL 용량으로 pallet을 씻어내고 buffer C (50 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM PMSE, 50 mM KCl 및 1 mM DTT)를 더하여 부유시킨 뒤 10분마다 vortexing을 총 3회 실시하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분동안 원심분리 하여 상층액을 얻은 후 -80°C에서 냉동 보관하였다. 간조직 세포질의 HMGCR, p-LKB1, LKB1, p-AMPK, AMPK, p-ACC, ACC, PGC-1α, UCP-2, CPT-1A, FAS, SCD-1 및 β-actin과 핵에서 histone, SREBP-1, SREBP-2 및 PPARα의 단백질 발현량을 확인하기 위해서 8-12% sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 만든 뒤 8-12 µg의 단백질을 전기영동 후 SDS-polyacrylamide gel에서 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane에 분석하고자하는 1차 항체(Phosphate Buffered Saline with Tween™ 20 (PBS-T)로 1:1,000 희석)를 처리 후 4°C에서 overnight 하였으며, PBS-T로 8분마다 6회 세척하고, 2차 항체(PBS-T로 1:3,000 희석)를 사용해 상온에서 2시간 반응시킨 뒤, PBS-T로 8분마다 5회 세척하였다. 그 다음 enhanced chemiluminescence (ECL) solution에 membrane을 노출시켜, Sensi-Q2000 Chemidoc 기기를 사용하여 단백질의 발현을 확인한 뒤, 정량을 확인하기 위해 ATTO Densitograph Software를 이용하였으며, 각각의 단백질 발현량을 정상군의 단백질 발현량으로 나눠 상대비로 나타내었다(represented as 1).

## 9) 조직병리학적 분석

간과 부고환주위지방조직을 10% formalin에 고정시킨 다음, graded alcohol로 탈수시키고 나서 파라핀으로 포매하여 block을 제작하였다. Microtome으로 간과 부고환주위지방을 각각 4 µm와 4.5 µm 두께로 조직 절편을 제작해 hematoxylin & eosin (H&E)과 Oil red O 염색을 시행한 뒤, xylene clearing을 거쳐 permount로 처리한 후, 광학현미경(DSCHX50V, Sony, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

## 10) 통계처리

*In vitro*의 수치는 mean±standard error of the mean으로, *in vivo*의 수치는 mean±standard deviation로 나타냈으며, IBM SPSS Statistics 26 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 사용해 one-way analysis of variance test를 검증하였다. 각 데이터는 least significant difference (LSD) test로 사후 검증하였으며, 정상군과 대조군, 대조군과 약물 투여군 간의 유의성은 p-value < 0.05로 검증하였다.

# 결과»»»»

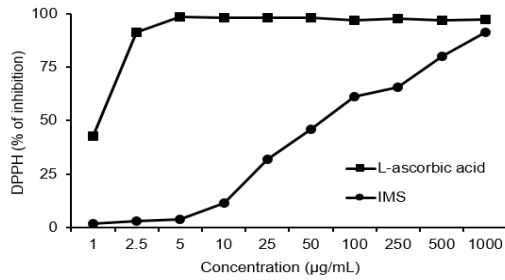
## 1. DPPH free radical 소거능

### 1) Total polyphenol 및 total flavonoid

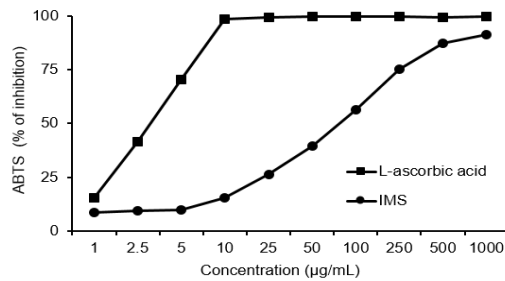
본 실험에 사용된 二妙散의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH free radical 소거능을 분석한 결과, 二妙散의 IC<sub>50</sub> 값은 63.38±2.37 µg/mL로 나타났다(Fig. 1).

## 2. ABTS radical 소거능

본 실험에 사용된 二妙散의 항산화 활성을 확인하기 위하여 ABTS radical 소거능을 분석한 결과, 二妙散의 IC<sub>50</sub> 값은 81.41±0.53 µg/mL로 나타났다(Fig. 2).



**Fig. 1.** Effect of IMS on DPPH free radical scavenging activity. IMS: *Imyo-san* water extract, DPPH: gallic acid, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. Data are presented as mean±standard error of the mean of three replications.



**Fig. 2.** Effect of IMS on ABTS radical scavenging activity. IMS: *Imyo-san* water extract, ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Data are presented as mean±standard error of the mean of three replications.

**Table III.** Total Polyphenol and Total Flavonoid Contents of *Imyo-san*

Sample	Total polyphenol (mg GAE/g)	Total flavonoid (mg QE/g)
IMS	42.32±0.71	16.82±0.15

Data are presented as mean±standard error of the mean of three replications.

IMS: *Imyo-san* water extract, GAE: gallic acid equivalents, QE: quercetin equivalents.

**Table IV.** Body Weight Gain, Food Intake, and Food Efficiency Ratio of Mice

Group	Body weight			Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (FER, %)
	Initial (g)	Final (g)	Gain (g)		
Normal	18.96±1.22	25.72±3.64	6.77±2.97	2.52±0.12	7.67±3.37
Control	18.47±1.06	34.86±1.61 <sup>###</sup>	16.38±2.05 <sup>###</sup>	1.83±0.24 <sup>###</sup>	23.67±3.82 <sup>###</sup>
GG	18.80±1.01	29.24±2.95 <sup>***</sup>	10.44±3.27 <sup>***</sup>	1.78±0.16	16.76±5.25 <sup>***</sup>
IMSL	18.87±0.47	30.98±1.84 <sup>**</sup>	12.11±1.93 <sup>**</sup>	1.81±0.21	19.11±3.05 <sup>*</sup>
IMSH	18.79±0.81	30.39±0.94 <sup>***</sup>	11.60±1.12 <sup>***</sup>	1.79±0.15	18.51±1.79 <sup>**</sup>

Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group).

Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, FER: food efficiency ratio, HFD: high fat diet.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus Control, <sup>###</sup>p<0.001 versus Normal.

### 3. Total polyphenol과 total flavonoid

二妙散의 total polyphenol과 total flavonoid를 측정 한 결과, total polyphenol 함량은 42.32±0.71 mg GAE/g으로 나타났으며, total flavonoid 함량은 16.82±0.15 mg QE/g으로 나타났다(Table III).

### 4. 체중, 식이섭취량 및 식이효율 변화

본 실험기간 동안의 체중 변화(g)를 분석한 결과, 정상군 6.77±2.97 대비 대조군에서 유의한 체중 증가가 나타났으며, 대조군 대비 GG군 10.44±3.27 (p<0.001), IMSL군 12.11±1.93 (p<0.01) 및 IMSH군 11.60±1.12 (p<0.001)로 모든 군에서 유의하게 감소하였다(Table IV).

식이섭취량(g)은 정상군 2.52±0.12 대비 대조군 1.83±0.24 (p<0.001)로 유의하게 감소하였으나, 대조군 대비 GG군 1.78±0.16, IMSL군 1.81±0.21 및 IMSH군 1.79±0.15로 감소하였다(Table IV).

식이효율(%)은 정상군 7.67±3.37 대비 대조군 23.67±3.82 (p<0.001)로 유의하게 증가하였으며, 대조군 대비 GG군 16.76±5.25 (p<0.001), IMSL군 19.11±3.05 (p<0.05) 및 IMSH군 18.51±1.79 (p<0.01)로 모두 유의하게 감소하였다(Table IV).

### 5. 간과 부고환주위지방 무게 변화

본 실험기간 동안의 간의 무게 변화(g)를 측정 한 결과, 정상군 0.95±0.17 대비 대조군 1.31±0.07 (p<0.001)로 유의하게 무게가 증가하였으며, 대조군 대비 GG군 1.01±0.14

( $p<0.001$ ), IMSL군  $1.10\pm 0.14$  ( $p<0.01$ ) 및 IMSH군  $0.98\pm 0.22$  ( $p<0.001$ )로 3개 군 모두 유의하게 감소하였다(Table V).

부고환주위지방 무게 변화(g)를 측정한 결과, 정상군  $0.28\pm 0.14$  대비 대조군  $1.52\pm 0.14$  ( $p<0.001$ )로 유의하게 무게가 증가하였으며, 대조군 대비 GG군  $1.01\pm 0.43$  ( $p<0.001$ ), IMSL군  $1.27\pm 0.25$  ( $p<0.05$ ) 및 IMSH군  $1.05\pm 0.13$  ( $p<0.001$ )으로 3개 군 모두 유의하게 감소하였다(Table V).

## 6. 혈청 중성지방 함량

혈청 내 TG 함량을 측정한 결과(mg/dl), 정상군  $101.20\pm 8.42$  대비 대조군  $194.60\pm 4.93$  ( $p<0.001$ )으로 혈청 내 TG가 유의하게 증가하였으며, 대조군 대비 GG군  $147.97\pm 10.35$  ( $p<0.001$ ), IMSL군  $158.60\pm 8.76$  ( $p<0.01$ ) 및 IMSH군  $152.52\pm 3.93$  ( $p<0.01$ )으로 3개 군 모두에서 혈청 내 TG가 유의하게 감소되었다(Fig. 3).

## 7. 혈청 total cholesterol 함량

혈청 내 TC 함량을 측정한 결과(mg/dl), 정상군  $79.44\pm 2.09$  대비 대조군  $131.63\pm 6.56$  ( $p<0.001$ )으로 혈청 내 TC가 유의하게 증가하였으며, 대조군 대비 GG군  $104.20\pm 5.03$  ( $p<0.001$ ), IMSL군  $110.02\pm 3.96$  ( $p<0.01$ ) 및 IMSH군  $100.70\pm 2.51$  ( $p<0.001$ )로 3개 군 모두 혈청 내 TC가 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

## 8. 혈청 HDL-cholesterol 함량

혈청 내 HDL-cholesterol 함량을 측정한 결과(mg/dl), 정상군  $37.70\pm 2.42$  대비 대조군  $23.20\pm 0.93$  ( $p<0.001$ )으로 HDL-cholesterol이 유의하게 감소하였으며, 대조군 대비 GG군  $35.47\pm 2.25$  ( $p<0.001$ ), IMSL군  $30.34\pm 1.14$  ( $p<0.05$ ) 및 IMSH군  $33.51\pm 2.40$  ( $p<0.01$ )으로 3개 군 모두 HDL-cholesterol이 유의하게 증가하였다(Fig. 5).

## 9. 혈청 LDL-cholesterol 함량

혈청 내 LDL-cholesterol 함량을 측정한 결과(mg/dl), 정상군  $21.50\pm 3.43$  대비 대조군  $69.51\pm 7.26$  ( $p<0.001$ )로

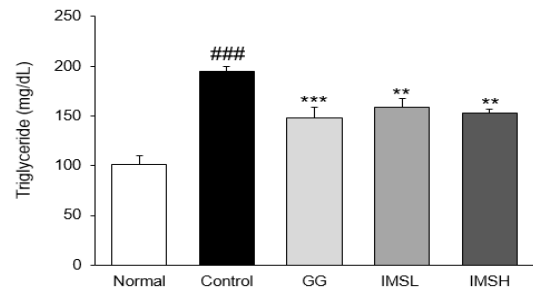
**Table V.** Liver and Epididymal Fat Weights of Mice

Group	Liver (g)	Epididymal fat (g)
Normal	$0.95\pm 0.17$	$0.28\pm 0.14$
Control	$1.31\pm 0.07^{###}$	$1.52\pm 0.14^{###}$
GG	$1.01\pm 0.14^{***}$	$1.01\pm 0.43^{***}$
IMSL	$1.10\pm 0.14^{**}$	$1.27\pm 0.25^*$
IMSH	$0.98\pm 0.22^{***}$	$1.05\pm 0.13^{***}$

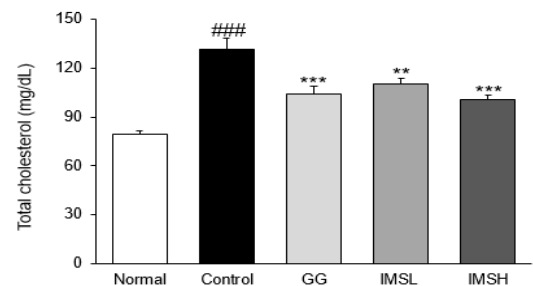
Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group).

Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, HFD: high fat diet.

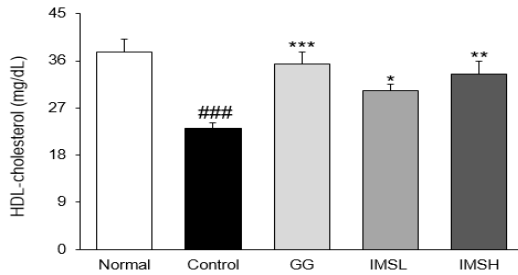
\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  versus Control, ### $p<0.001$  versus Normal.



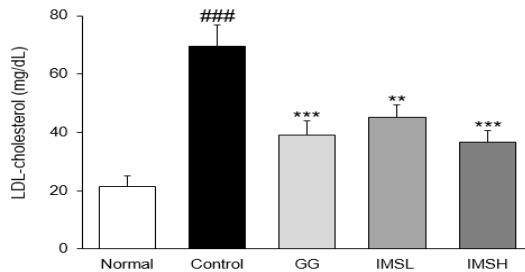
**Fig. 3.** Effect of *Imyo-san* on triglyceride in serum. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  versus Control, ### $p<0.001$  versus Normal.



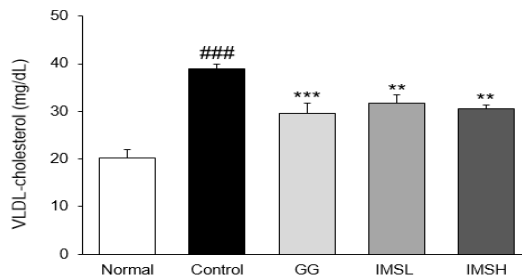
**Fig. 4.** Effect of *Imyo-san* on total cholesterol in serum. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  versus Control, ### $p<0.001$  versus Normal.



**Fig. 5.** Effect of *Imyo-san* on HDL-cholesterol in serum. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, HDL: high density lipoprotein, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.



**Fig. 6.** Effect of *Imyo-san* on LDL-cholesterol in serum. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, LDL: low density lipoprotein, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.



**Fig. 7.** Effect of *Imyo-san* on VLDL-cholesterol in serum. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, VLDL: very low density lipoprotein, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.

LDL-cholesterol이 유의하게 증가하였으며, 대조군 대비 GG 군 39.14±4.83 (p<0.001), IMSL군 45.26±4.13 (p<0.01) 및 IMSH군 36.69±4.02 (p<0.001)로 3개 군 모두 LDL-cholesterol이 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

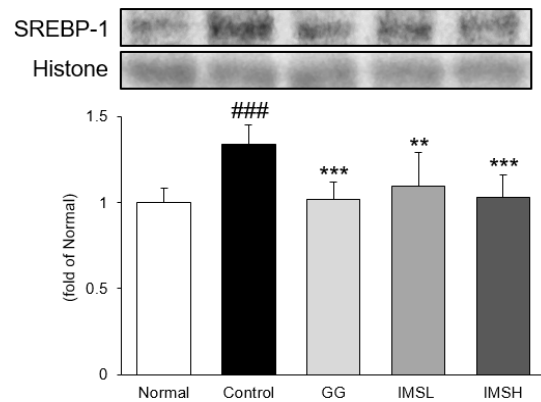
## 10. 혈청 VLDL-cholesterol 함량

혈청 내 VLDL-cholesterol 함량을 측정된 결과(mg/dl), 정상군 20.24±1.68 대비 대조군 38.92±0.99 (p<0.001)로 VLDL-cholesterol이 유의하게 증가하였으며, 대조군 대비 GG군 29.59±2.07 (p<0.001), IMSL군 31.72±1.75 (p<0.01) 및 IMSH군 30.0±0.79 (p<0.01)로 3개 군 모두 VLDL-cholesterol이 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

## 11. 간조직 내 triglyceride 합성 관련 단백질

### 1) SREBP-1

SREBP-1의 단백질 발현은 정상군 1.00±0.08 대비 대조군 1.34±0.11 (p<0.001)로 유의하게 증가하였으며, 대조군 대비 GG군 1.02±0.10 (p<0.001), IMSL군 1.10±0.20 (p<0.01) 및 IMSH군 1.03±0.13 (p<0.001)으로 3개 군 모두 단백질 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 8).



**Fig. 8.** Effects of *Imyo-san* on SREBP-1 expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, SREBP-1: sterol regulatory element-binding protein-1, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.



## 2) p-ACC

p-ACC의 단백질 발현은 정상군  $1.00 \pm 0.22$  대비 대조군  $0.68 \pm 0.05$  ( $p < 0.01$ )로 유의하게 감소하였으며, 대조군 대비 GG군  $1.00 \pm 0.23$  ( $p < 0.01$ ), IMSL군  $0.90 \pm 0.19$  ( $p < 0.01$ ) 및 IMSH군  $0.98 \pm 0.20$  ( $p < 0.01$ )으로 3개 군 모두 단백질 발현이 유의하게 증가하였다(Fig. 9).

## 3) FAS

FAS의 단백질 발현은 정상군  $1.00 \pm 0.13$  대비 대조군  $1.70 \pm 0.29$  ( $p < 0.001$ )로 유의하게 증가하였으며, 대조군 대비 GG군  $1.29 \pm 0.04$  ( $p < 0.001$ ), IMSL군  $1.39 \pm 0.13$  ( $p < 0.01$ ) 및 IMSH군  $1.30 \pm 0.11$  ( $p < 0.001$ )로 3개 군 모두 단백질 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 10).

## 4) SCD-1

SCD-1의 단백질 발현은 정상군  $1.00 \pm 0.06$ 에 비해 대조군  $1.26 \pm 0.08$  ( $p < 0.001$ )로 유의하게 증가하였으며, 대조군 대비 GG군  $1.07 \pm 0.11$  ( $p < 0.01$ ), IMSL군  $1.15 \pm 0.08$  ( $p < 0.05$ ) 및 IMSH군  $1.07 \pm 0.12$  ( $p < 0.01$ )로 3개 군 모두 단백질 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

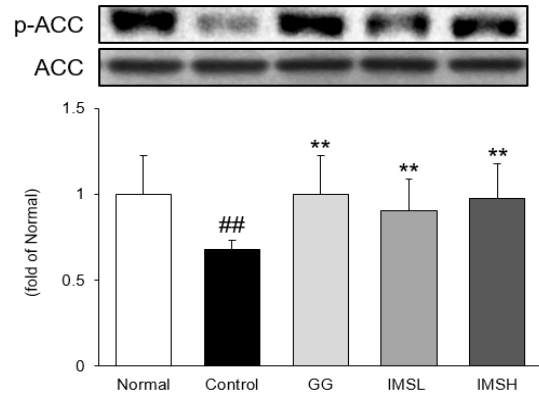
## 12. 간조직 내 cholesterol 합성 관련 단백질

## 1) SREBP-2

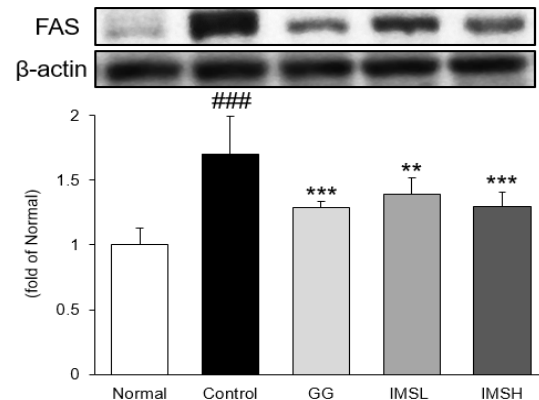
SREBP-2의 단백질 발현은 정상군  $1.00 \pm 0.09$  대비 대조군  $1.33 \pm 0.10$  ( $p < 0.001$ )으로 유의하게 증가하였으며, 대조군 대비 GG군  $1.02 \pm 0.14$  ( $p < 0.001$ ), IMSL군  $1.13 \pm 0.07$  ( $p < 0.01$ ) 및 IMSH군  $1.06 \pm 0.17$  ( $p < 0.001$ )로 3개 군 모두 단백질 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 12).

## 2) HMGCR

HMGCR의 단백질 발현은 정상군  $1.00 \pm 0.11$  대비 대조군  $1.35 \pm 0.12$  ( $p < 0.001$ )로 유의하게 증가하였으며, 대조군 대비 GG군  $1.14 \pm 0.06$  ( $p < 0.01$ ), IMSL군  $1.21 \pm 0.13$  ( $p < 0.05$ ) 및 IMSH군  $1.08 \pm 0.10$  ( $p < 0.001$ )으로 3개 군 모두 단백질 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 13).



**Fig. 9.** Effects of *Imyo-san* on p-ACC expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, p-ACC: phospho-acetyl-CoA carboxylase, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*\* $p < 0.01$  versus Control, ## $p < 0.01$  versus Normal.

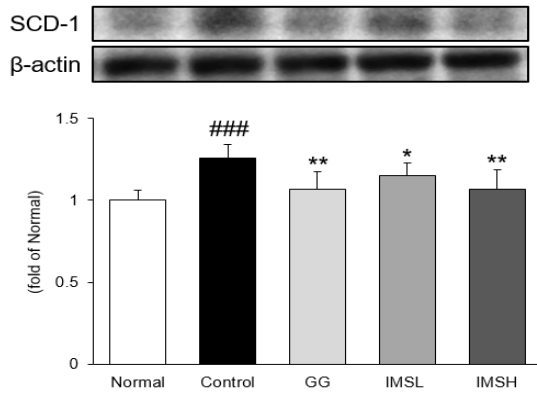


**Fig. 10.** Effects of *Imyo-san* on FAS expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, FAS: fatty acid synthase, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus Control, ### $p < 0.001$  versus Normal.

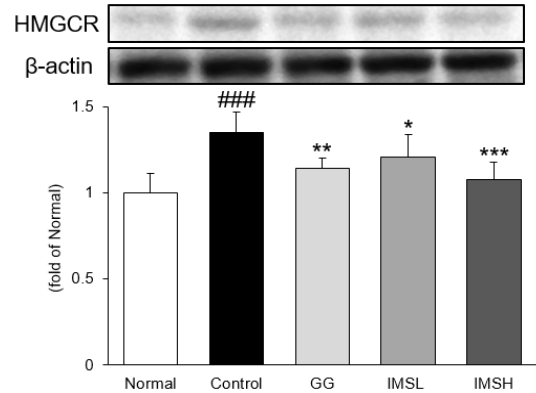
## 13. 간조직 내 LKB1/AMPK 인산화 단백질

## 1) p-LKB1

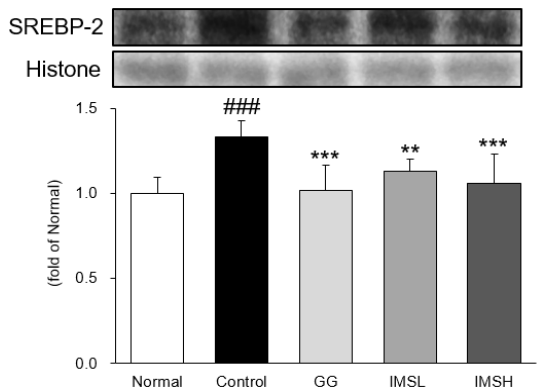
p-LKB1의 단백질 발현은 정상군  $1.00 \pm 0.10$  대비 대조군  $0.67 \pm 0.07$  ( $p < 0.001$ )로 유의하게 감소하였으며, 대조



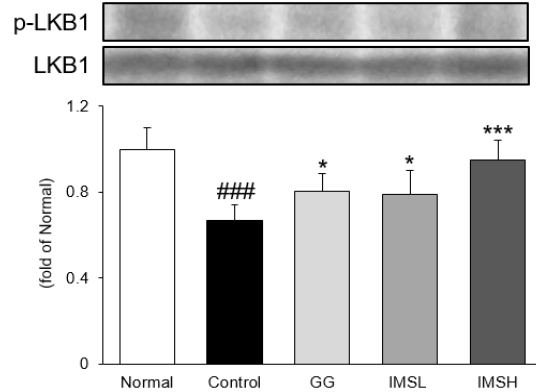
**Fig. 11.** Effects of *Imyo-san* on SCD-1 expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, SCD-1: stearoyl-CoA desaturase-1, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*p<0.05, \*\*p<0.01 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.



**Fig. 13.** Effects of *Imyo-san* on HMGR expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, HMGR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.



**Fig. 12.** Effects of *Imyo-san* on SREBP-2 expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, SREBP-2: sterol regulatory element-binding protein-2, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.



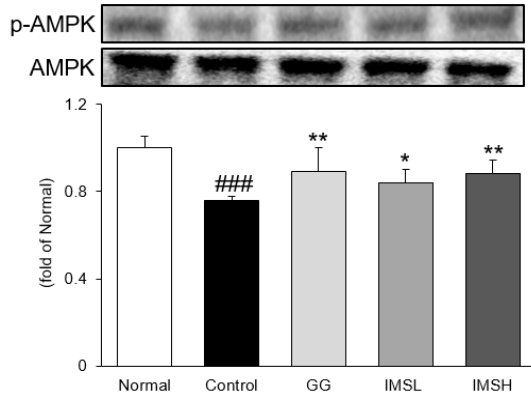
**Fig. 14.** Effects of *Imyo-san* on p-LKB1 expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, p-LKB1: phospho-liver kinase B1, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.

군 대비 GG군 0.80±0.08 (p<0.05), IMSL군 0.79±0.11 (p<0.05) 및 IMSH군 0.95±0.09 (p<0.001)로 3개 군 모두 단백질 발현이 유의하게 증가하였다(Fig. 14).

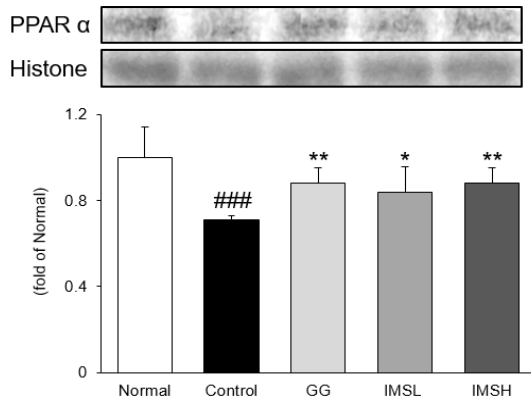
## 2) p-AMPK

p-AMPK의 단백질 발현은 정상군 1.00±0.05 대비 대조군 0.76±0.02 (p<0.001)로 유의하게 감소하였으며, 대조군 대비 GG군 0.89±0.11 (p<0.01), IMSL군 0.84±0.06 (p<0.05) 및 IMSH군 0.88±0.06 (p<0.01)으로 3개 군 모

두 단백질 발현이 유의하게 증가하였다(Fig. 15).



**Fig. 15.** Effects of *Imyo-san* on p-AMPK expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, p-AMPK: phospho-AMP-activated protein kinase, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*p<0.05, \*\*p<0.01 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.



**Fig. 16.** Effects of *Imyo-san* on PPARα expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, PPARα: peroxisome proliferator-activated receptor α, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*p<0.05, \*\*p<0.01 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.

## 14. 간조직 내 β-oxidation 관련 단백질

### 1) PPARα

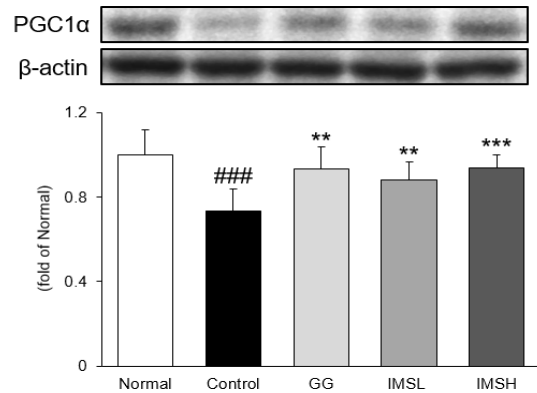
PPARα의 단백질 발현은 정상군 1.00±0.14 대비 대조군 0.71±0.02 (p<0.001)로 유의하게 감소하였으며, 대조군 대비 GG군 0.88±0.07 (p<0.01), IMSL군 0.84±0.12 (p<0.05) 및 IMSH군 0.88±0.07 (p<0.01)로 3개 군 모두 단백질 발현이 유의하게 증가하였다(Fig. 16).

### 2) PGC-1α

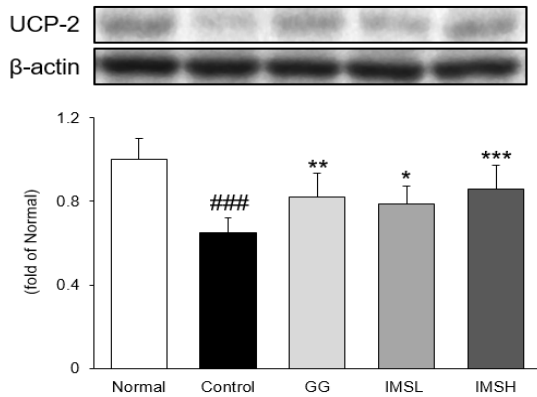
PGC-1α의 단백질 발현은 정상군 1.00±0.12 대비 대조군 0.73±0.11 (p<0.001)로 유의하게 감소하였으며, 대조군 대비 GG군 0.93±0.10 (p<0.01), IMSL군 0.88±0.09 (p<0.01) 및 IMSH군 0.94±0.06 (p<0.001)으로 3개 군 모두 단백질 발현이 유의하게 증가하였다(Fig. 17).

### 3) UCP-2

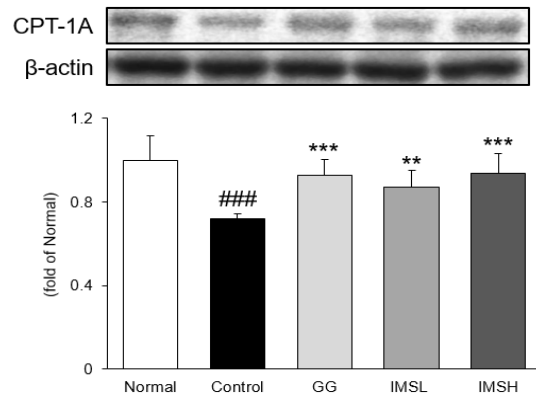
UCP-2의 단백질 발현은 정상군 1.00±0.10 대비 대조군 0.65±0.07 (p<0.001)로 유의하게 감소하였으며, 대조군 대비 GG군 0.82±0.11 (p<0.01), IMSL군 0.79±0.09 (p<0.05) 및 IMSH군 0.86±0.11 (p<0.001)로 3개 군 모두 단백질 발현이 유의하게 증가하였다(Fig. 18).



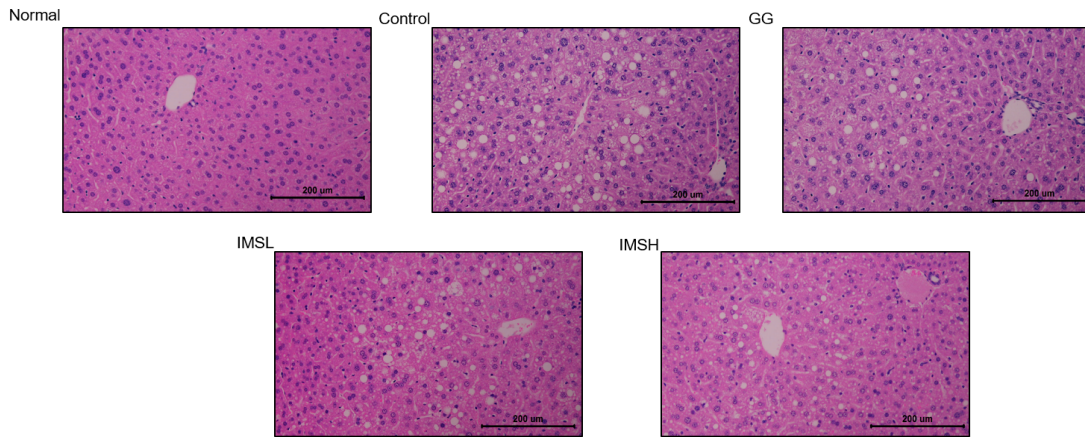
**Fig. 17.** Effects of *Imyo-san* on PGC-1α expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, PGC-1α: peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.



**Fig. 18.** Effects of *Imyo-san* on UCP-2 expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, UCP-2: uncoupling protein-2, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.



**Fig. 19.** Effects of *Imyo-san* on CPT-1A expression. Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, CPT-1A: carnitine palmitoyltransferase 1A, HFD: high fat diet. Data are presented as mean±standard deviation (n=7/group). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus Control, ###p<0.001 versus Normal.



**Fig. 20.** Histological observation on liver (hematoxylin & eosin staining, magnification ×200). Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, HFD: high fat diet.

#### 4) CPT-1A

CPT-1A의 단백질 발현은 정상군 1.00±0.12 대비 대조군 0.72±0.02 (p<0.001)로 유의하게 감소하였으며, 대조군 대비 GG군 0.93±0.08 (p<0.001), IMSL군 0.87±0.08 (p<0.01) 및 IMSH군 0.94±0.10 (p<0.001)으로 3개 군 모두 단백질 발현이 유의하게 증가하였다(Fig. 19).

#### 15. 조직병리학적 변화에 미치는 영향

##### 1) 간조직의 H&E 및 Oil red O staining

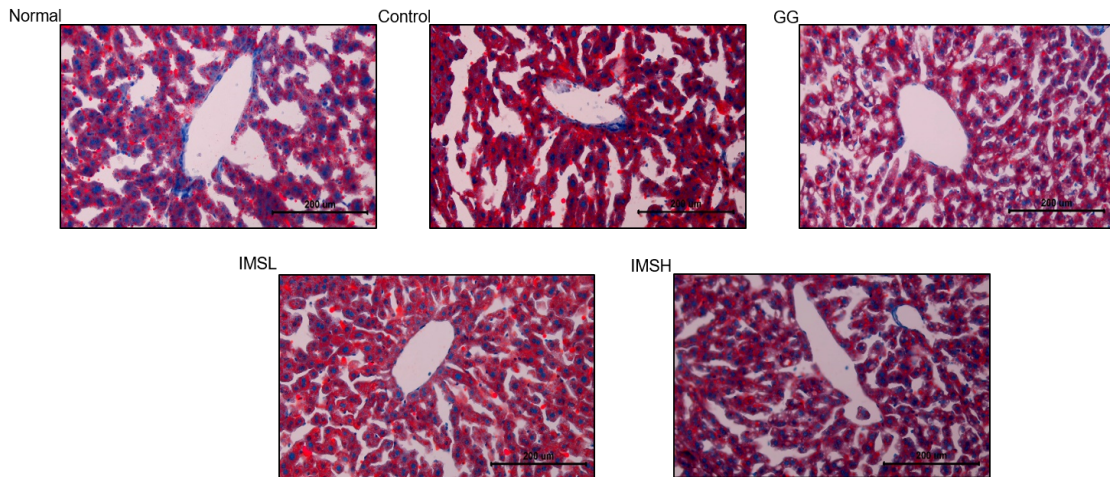
간조직에 H&E 및 Oil red O staining을 실시하여 광학 현미경으로 관찰하였다. H&E staining 관찰 결과, 정상군에 비해 대조군에서는 고지방식이 섭취로 인해 lipid droplet이 광범위하게 나타났고, 대조군에 비해 IMS를 처리한

모든 군에서 lipid droplet이 크게 감소하였으며, 특히 IMSL 군 및 IMSH군에서 lipid droplet이 전반적으로 감소한 것을 확인하였다(Fig. 20).

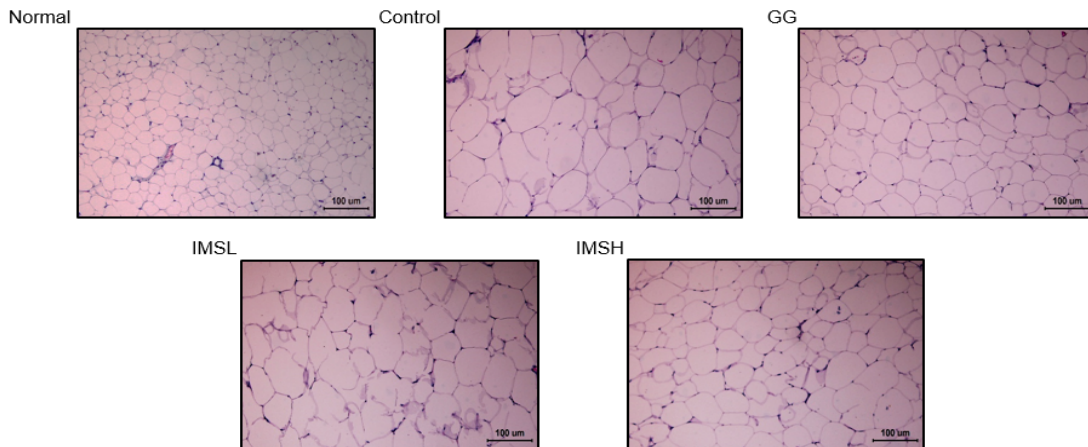
Oil red O staining 관찰 결과, 정상군에 비해 대조군에서 고지방식으로 인해 지질 축적이 증가한 것을 확인하였으며, IMS를 처리한 군에서는 농도 의존적으로 지질 축적이 감소한 것을 확인하였다(Fig. 21).

## 2) 부고환주위지방조직의 H&E staining

부고환주위지방조직에 H&E staining을 실시하여 광학 현미경으로 관찰한 결과, 정상군에 비해 대조군에서는 지방세포의 크기가 커진 것을 관찰할 수 있으며, IMSH군에서는 대조군에 비해 지방세포의 크기가 감소된 것을 확인하였다(Fig. 22).



**Fig. 21.** Histological observation on liver (Oil red O staining, magnification  $\times 200$ ). Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, HFD: high fat diet.



**Fig. 22.** Histological observation on epididymal fat (hematoxylin & eosin staining, magnification  $\times 100$ ). Normal: general diet and untreated mice, Control: HFD-induced obesity mice, GG: HFD-induced and *Garcinia gummi-gutta* 200 mg/kg treated obesity mice, IMSL: HFD-induced and *Imyo-san* 0.54 g/kg treated obesity mice, IMSH: HFD-induced and *Imyo-san* 1.08 g/kg treated obesity mice, HFD: high fat diet.

## 고찰»»»»

비만은 인슐린 저항성을 증가시켜 제2형 당뇨병, 고지혈증, 관상동맥 질환, 고혈압 등의 대사질환을 유발할 수 있으며 유방암, 대장암, 담낭암 등 일부 암과 골관절염, 수면 무호흡증 등의 위험 증가와 크게 관련되어 있다<sup>33)</sup>. 체중 감량은 전체 사망률과 다양한 비만 합병증으로 인한 사망률을 낮출 수 있기 때문에<sup>34)</sup> 비만에 대한 치료와 관리는 필수적이라고 할 수 있다. 그러나 비만은 다른 만성질환의 치료보다 더욱 어렵고 재발하기 쉬운 완치가 아닌 조절의 개념으로 접근하는 장기적 관리가 필요하다<sup>35)</sup>.

비만의 치료는 식사, 운동, 행동수정 요법을 기본으로 하며, 약물요법은 이의 보조적인 치료법으로 장기간 약효가 검증된 약제를 이용한다<sup>33)</sup>. 현재 우리나라에서 약물치료로 처방되고 있는 약은 제니칼(orlistat), 콘트라브(naltrexone-bupropion), 삭센다(liraglutide), 큐시미아(phentermine-topiramate)의 4종으로, 이러한 약물들은 적절한 행동 수정과 병행하여 사용할 경우 상당한 체중 감량과 합병증 예방에 효과적이다<sup>36)</sup>. 그러나 안전성에 대한 문제가 끊임없이 제기되고 있으며, 실제로 기존에 활용되던 벨빅(lorcaserin)이 발암 위험성 문제로 2020년 2월 시장에서 철수하였다. 그러므로 안전하고 장기적으로 사용가능한 비만 치료제에 대한 요구가 제기되고 있다<sup>6)</sup>.

한의학적으로 비만은 痰飲, 濕, 寒濕, 形盛氣衰 등과 같은 병인에 대한 인식이 있어 왔으며 이와 관련하여 다양하게 변증이 제시될 수 있으나, 현재 임상에서 가장 많이 쓰이는 변증은 肝鬱, 食積, 陽虛, 脾虛, 痰飲, 瘀血의 6개 유형이다<sup>1)</sup>. 비만의 치료법으로 침, 약침, 뜸, 부항, 기공, 한약 등이 이용되며, 특히 한약 중에서도 麻黃이 포함된 太陰調胃湯, 防風通聖散, 防己黃芪湯 등이 빈용되고 있다<sup>7)</sup>.

二妙散은 蒼朮과 黃柏으로 구성되어 있으며, 蒼朮은 苦溫하여 燥濕運脾하고 黃柏은 苦寒하여 清熱燥濕한다. 이 두 약물을 배합하여 脾胃를 손상시키거나 助熱하지 않고 清熱燥濕하도록 하는 처방이다<sup>38)</sup>. 최근 콜레스테롤이 관절염과 유관하다는 사실<sup>39)</sup>이 보고되었으므로 또한 처방을 구성하는 蒼朮과 黃柏은 각각 항비만 효과가 있음이 알려져 있기 때문에<sup>21,22,24)</sup> 기존에 주로 관절염 연구에 이용되었던 二妙散이 항비만 효과가 있을 것으로 기대하여 관련된 인자들을 분석하였다.

총 항산화 능력을 빠르고 정확히 편리하게 측정할 수 있는 방법으로 DPPH assay와 ABTS assay가 있다<sup>40)</sup>. DPPH는 안정적인 활성산소를 가진 분자로, 에탄올에 용해된 상태에서 자주색으로 보이는데, 이때 DPPH에서 활성산소가 제거되면 탈색되어 색이 없어지게 된다. 이러한 성질을 이용하여 시료의 항산화능을 측정할 수 있다<sup>41)</sup>. ABTS assay 또한 DPPH assay와 유사한 방식으로 용액의 분광도를 측정해 항산화능을 측정하는 방식이나, DPPH는 음이온 라디칼 소거능을 측정하고 ABTS는 양이온 라디칼 소거능을 측정한다는 차이가 있기 때문에 두 측정값에 차이가 발생할 수 있다<sup>42)</sup>.

二妙散에서 DPPH를 이용하여 활성산소의 절반을 소거하는 IC<sub>50</sub> 값을 측정하였을 때 63.38±2.37 μg/mL로 나타났으며(Fig. 1), ABTS를 이용한 방법에서는 IC<sub>50</sub> 값이 81.41±0.53 μg/mL가 확인되었다(Fig. 2). 이는 정 등의 연구<sup>8)</sup>에서 二妙散 열수 추출물이 2 mg/mL에서 DPPH에 대해 64%의 소거능을 보인 것에 비해 높아진 것으로, 추출 방식의 차이에서 기인한 것으로 판단된다. 정 등<sup>8)</sup>의 연구에서는 60°C에서 24시간 동안 3회 반복 추출하였으나 본 연구에서는 100°C에서 2시간 동안 추출하여 일반적으로 전탕 시에 사용되는 열수 추출방식을 이용하였다는 점에서 의의가 있다.

폴리페놀(polyphenol)은 식물에 많이 분포하는 항산화 효능을 나타내는 물질로, 일상적인 식단에서 가장 많이 접할 수 있는 항산화물질이다<sup>43)</sup>. 폴리페놀에는 퇴행성 질환을 예방하는 효과가 있으며 플라보노이드(flavonoid)는 이러한 폴리페놀의 일종이다. 二妙散 내의 total polyphenol와 total flavonoid 함량을 측정한 결과, total polyphenol 함량은 42.32±0.71 mg GAE/g으로 나타났으며 total flavonoid 함량은 16.82±0.15 mg QE/g으로 측정되어(Table III) 통상적인 약용식물의 메탄올 추출물<sup>44)</sup>보다 높은 편에 속했다.

*Garcinia Gummi-gutta*는 동남아시아에서 자생하는 과일의 일종으로, 과거 학명인 *Garcinia Cambogia*로도 불리며 여러 아시아 국가들에서 약용 식물로도 이용되어왔다<sup>45)</sup>. *G.Cambogia*에는 hydroxycitric acid (HCA)가 함유되어 있는데, HCA는 지방산 합성 기전에서 citrate가 acetyl-CoA로 전환되는 과정을 저해하여 지방산 합성을 억제하는 효과를 가진다<sup>46)</sup>. 때문에 본 연구에서는 二妙散의 효과를 검증하기 위한 약물 대조군으로 *Garcinia*를 선정하였다.



체지방 감소를 확인하기 위해 二妙散 투여군과 대조군의 체중, 식이효율, 간과 부고환주위지방 무게를 비교하였다. HFD를 지급한 결과 대조군에서 유의미한 체중 및 식이효율, 간과 부고환주위 지방 무게의 증가를 보여 HFD로 비만이 유발되었음을 확인할 수 있었다. 반면 GG군과 IMSL, IMSH군은 모두 유의미한 체중, 식이효율, 간과 지방조직 무게의 감소를 나타내었으며, IMSH군에서 농도 의존적으로 체지방 증가를 더 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Tables IV, V).

이상지질혈증은 총 콜레스테롤(TC), LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, 중성지방(triglyceride, TG)을 바탕으로 진단하며, 흡연, 고혈압, 당뇨, 비만과 함께 심혈관계 질환의 주요 위험인자이기 때문에 혈중 지질 농도의 개선이 중요하다<sup>47)</sup>.

본 연구에서 IMSL, IMSH군 모두에서 유의한 수준의 TC, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, TG 감소와 HDL-cholesterol 증가가 확인되어 혈청 지질 개선이 이루어졌음을 알 수 있었다(Figs. 3-7). 또한 체중 및 지방조직의 경우와 같이 농도 의존적으로 혈청 지질 개선이 이루어졌음을 알 수 있었으며 IMSH군에서는 GG군과 유사한 수준의 효능을 보여주었다.

SREBP-1은 인슐린에 의해 활성화되는 지방산 합성의 전사조절인자로, FAS, ACC, SCD-1이 타겟 유전자이다. p-ACC에서 인산기가 떨어져 ACC가 활성화되면 acetyl-CoA를 malonyl-CoA로 전환하고, malonyl-CoA는 FAS와 SCD-1에 의해 TG가 되어 VLDL-cholesterol의 형태로 혈관을 통해 이송되며 지방의 축적이 일어난다<sup>48)</sup>.

SREBP-2와 HMGCR은 콜레스테롤의 합성에 관련된 인자로, 콜레스테롤 수치가 낮으면 SREBP-2가 활성화되고, SREBP-2가 다시 HMGCR을 활성화하여 콜레스테롤을 합성하도록 한다<sup>49)</sup>.

본 실험에서 SREBP-1, FAS, p-ACC, SCD-1 단백질 발현을 대조군과 비교하였고 그 결과 지방산 합성을 활성화하는 SREBP-1, FAS, SCD-1은 감소하고 ACC의 비활성형인 p-ACC는 증가한 것을 관찰할 수 있었으며 결과는 농도 의존적이었다(Figs. 8-11).

콜레스테롤의 합성에 관여하는 SREBP-2와 HMGCR 역시 감소하는 결과를 보였으며 농도 의존적으로 IMSH군에서 감소가 두드러지게 나타났다(Figs. 12, 13).

AMPK는 생체 내의 에너지 인식 및 항상성 조절의 중

심이다. AMPK의 활성화는 간, 골격근, 지방세포에서 지방산의 산화와 콜레스테롤 합성 억제, 지방생성 억제 등의 작용을 한다. 이러한 AMPK의 작용은 인산화된 LKB1 (p-LKB1)이 AMPK를 인산화(p-AMPK)하여 발생하는데, p-AMPK는 새로운 지방산 합성에 필요한 ACC의 활성을 억제하여 지질 대사에 영향을 준다<sup>50)</sup>.

$\beta$ -Oxidation은 지방산을 분해하여 인체의 에너지 항상성을 유지하는 기전이다<sup>51)</sup>. PPAR $\alpha$ 는 지질 산화 과정을 조절하고, PGC-1 $\alpha$ 는 미토콘드리아 생합성과 산화 대사를 촉진한다<sup>52)</sup>. CPT-1A와 UCP-2는 지방산을 분해하며 열을 발생시킨다.

본 연구에서 대조군과 IMSL, IMSH를 비교하였을 때 p-AMPK, p-LKB1, PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , CPT-1A, UCP-2 모두 GG군과 같이 증가하였으며, 농도 의존적으로 IMSH군에서 더 많이 증가하는 양상을 나타내었다(Figs. 14-19).

이는 조직병리학적 검사에서도 드러난다. 간조직에 H&E staining 처리를 한 후 관찰하였을 때 대조군에 비해 IMS군에서 lipid droplet의 감소가 확인되었으며, Oil red O staining에서도 지질 축적이 농도 의존적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다(Figs. 20, 21). 부고환 주위 지방조직에서도 지방세포의 크기가 IMS군에서 감소한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 22).

상기 결과를 종합하여 볼 때, 二妙散은 지방산의 합성과 콜레스테롤 생성을 억제하고, 지방산을 산화하여 혈청 지질의 개선과 지방 축적 억제 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다.

## 결론»»»»

二妙散 물 추출물이 고지방식이로 인한 비만 동물 모델에 끼치는 영향을 확인하기 위해, 체중 증가량, 식이 효율, 혈중 지질 분석, triglyceride 합성 관련 단백질, cholesterol 합성 관련 단백질,  $\beta$ -Oxidation 관련 단백질 및 조직병리학적 변화를 관찰하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. IMS 투여는 체중 증가량, 식이효율, 간과 부고환 주위지방조직의 무게를 유의하게 감소시켰다.
2. IMS 투여는 TG, TC, LDL-cholesterol 및 VLDL-cholesterol을 유의하게 감소시켰으며, HDL-cholesterol은 유의하게 증가시켰다.

3. IMS 투여는 간조직에서 triglyceride 합성과 관련된 단백질인 SREBP-1, FAS 및 SCD-1의 발현을 유의하게 감소시켰으며, p-ACC는 유의하게 증가시켰다.
4. IMS 투여는 cholesterol 합성 관련 단백질인 SREBP-2 과 HMGCR의 발현을 유의하게 감소시켰다.
5. IMS 투여는 간 조직에서 LKB1/AMPK의 인산화 발현을 유의하게 증가시켰다.
6. IMS 투여는 간조직에서  $\beta$ -Oxidation 관련 단백질인 PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , UCP-2 및 CPT-1의 발현을 유의하게 증가시켰다.
7. 조직병리학적 검사에서 IMS 투여는 간조직의 lipid droplet을 감소시킬 뿐만 아니라 지질 축적 또한 감소시켰으며, 부고환주위지방에서 지방 세포크기를 개선시켰다.

따라서, 二妙散은 고지방식으로 유도되어진 비만 모델에서 혈중 지질의 함량을 개선시켰으며, triglyceride 합성 관련 단백질, cholesterol 합성 관련 단백질의 발현을 효과적으로 조절하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 향후 二妙散에 대한 기전과 효능을 검증할 수 있는 추가 연구가 이루어지기를 기대한다.

## References»»»»

1. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Oriental rehabilitation medicine. 5th ed. Paju:Globooks. 2020: 322-39.
2. International Association for the Study of Obesity. The asia-pacific perspective: redefining obesity and its treatment. Health Communication Australia Pty. 2000:17-20.
3. Ministry of Health and Welfare, Korea Disease Control and Prevention Agency. Korea health statistics 2019 [Internet] Cheongju:Korea Disease Control and Prevention Agency; 2020 [updated 2020 Dec 31; cited 2021 Nov 30]. Available from: URL: [https://knhanes.kdca.go.kr/knhanes/sub04/sub04\\_04\\_01.do](https://knhanes.kdca.go.kr/knhanes/sub04/sub04_04_01.do).
4. Nilsson PM, Tuomilehto J, Rydén L. The metabolic syndrome - what is it and how should it be managed? Eur J Prev Cardiol. 2019;26(2\_suppl):33-46.
5. Park EO. The obesity and the metabolic syndrome among Korean adults: based on national representative survey. Korean J Health Promot. 2020;20(4):144-50.

6. Kim MK, Kim CS. Recent advances in anti-obesity agents. Korean J Med. 2018;93(6):501-8.
7. Heo J. Treasured mirror of eastern medicine miscellaneous disorders I. Seoul:Yeogang. 1994:1308-12.
8. Jung YJ, Li SH. The effects of Er-miao-San extract on cell proliferation in normal human dermal fibroblasts. Asian J Beauty Cosmetol. 2013;11(5):943-9.
9. Chen G, Li KK, Fung CH, Liu CL, Wong HL, Leung PC, Ko CH. Er-Miao-San, a traditional herbal formula containing Rhizoma Atractylodis and Cortex Phellodendri inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages through inhibition of NF- $\kappa$ B pathway and MAPKs activation. J Ethnopharmacol. 2014;154(3):711-8.
10. Dai X, Ding M, Zhang W, Xuan Z, Liang J, Yang D, Zhang Q, Su B, Zhu H, Jia X. Anti-inflammatory effects of different elution fractions of Er-Miao-San on acute inflammation induced by carrageenan in rat paw tissue. Med Sci Monit. 2019;25(1):7958-65.
11. Kim SM, Yun HJ, Lee HW, Kim PJ, Lee CH, Park WH, Park SD. Imyosan induces caspases-mediated apoptosis in human colorectal cancer HCT116 cells. Herb Formula Sci. 2006;14(2):21-32.
12. Yun HJ, Heo SK, Yi HS, Kim TH, Kim DW, Kim SM, Park SD. Anti-atherosclerosis effect of Imyosan extract in human aortic smooth muscle cells. Kor J Herbology. 2008;23(4):113-20.
13. Dai X, Yang D, Bao J, Zhang Q, Ding J, Liu M, Ding M, Liu M, Liang J, Jia X. Er Miao San, a traditional Chinese herbal formula, attenuates complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats by regulating Th17/Treg cells. Pharm Biol. 2020;58(1):157-64.
14. Ahn HB, Kim SJ, Seo IB, Jeong SH. Effects of *Imyo-san* treatment on the monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. J Oriental Rehab Med. 2010;20(3): 13-26.
15. Lim YH, Kook YB. The comparison between single and Yimyosan in acute pancreatitis: *Atractylodes chinensis* (AC) and *Phellodendron amurense* Ruprecht (PAR). Herb Formula Sci. 2011;19(2):23-38.
16. Jang GW, Choi SI, Han X, Men X, Kwon HY, Choi YE, Park BW, Kim JJ, Lee OH. Development and validation of analytical method and antioxidant effect for berberine and palmartine in *P.amurense*. Journal of Food Hygiene and Safety. 2020;35(6):544-51.
17. Jang GW, Choi SI, Han X, Men X, Kwon HY, Choi YE, Kang NY, Park BW, Kim JJ, Lee OH. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Phellodendron amurense* extract fermented with *Lactobacillus plantarum* CM. Journal of Food Hygiene and Safety. 2021;36(2):196-203.
18. Oh YS, Kwon YS, Jung BD. Anti-inflammatory effects of



- the natural compounds cortex *Phellodendri* and *Humulus japonicus* on pelvic inflammatory disease in mice. *Int J Med Sci.* 2017;14(8):729-34.
19. Kim OK. Antidiabetic effect of ethanol extract on *Phelladindron amurense* Rupr. *Journal of the Korean Applied Science and Technology.* 2020;37(4):682-7.
  20. Kim SH, Shin EJ, Hyun CK. Enhancing effect of extracts of *Phellodendri Cortex* on glucose uptake in normal and insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Kor J Pharmacogn.* 2005;36(4):291-8.
  21. Kim KH, Ahn SC, Lee MS, Kweon OS, Oh WK, Kim MS, Sohn CB, Ahn JS. Adipocyte differentiation inhibitor isolated from the barks of *Phellodendron amurense*. *Korean J Food Sci Technol.* 2003;35(3):503-9.
  22. Ma YH, Kim HJ, Han YH, Kim HO, Oh JS. Effects of *Cortex Phellodendri* on the metabolic function in experimental mouse model of obesity. *J Int Korean Med.* 2015;36(4):447-57.
  23. Han HK, Choi EY. Effects of *Atractylodes lancea* on antioxidant enzyme activities in the liver cytosol of diabetic rats. *Culinary Science & Hospitality Research.* 2020;26(11):109-17.
  24. Park YJ, Seo MG, Cominguez DC, Han IS, An HJ. *Atractylodes chinensis* water extract ameliorates obesity via promotion of the SIRT1/AMPK expression in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients.* 2021;13(9):2992.
  25. Lee DH, Han JM, Yang WM. The effects of *Atractylodes japonica* Koidz. on type 2 diabetic rats. *J Korean Med.* 2015;36(1):75-85.
  26. Han HK, Choi EY. Effects of *Atractylodes lancea* on plasma glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Food Nutr.* 2020;33(5):544-50.
  27. Zhu ZH. *The heart & essence of Dan-xi's methods of treatment.* Beijing:China Bookstore Publishing. 1986:264.
  28. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects if tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull.* 1989;37(8):2016-21.
  29. 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):1231-7.
  30. Folin O, Ciocalteu V. Tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem.* 1927;73(2):627-50.
  31. Jiao H, Wang SY. Correlation of antioxidant capacities to oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry. *J Agric Food Chem.* 2000;48(11):5672-76.
  32. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry.* 1972;18(6):499-502.
  33. Korean Endocrine Society, Korean Society for the Study of Obesity. Management of obesity, 2010 recommendation. *Endocrinol Metab.* 2010;25(4):301-4.
  34. Ma C, Avenell A, Bolland M, Hudson J, Stewart F, Robertson C, Sharma P, Fraser C, MacLennan G. Effects of weight loss interventions for adults who are obese on mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2017;359:j4849.
  35. Choi JM, Kim CB. Obesity management and scientific evidence. *J Korean Med Assoc.* 2011;54(3):250-65.
  36. Kim BY, Kang SM, Kang JH, Kang SY, Kim KK, Kim KB, Kim BT, Kim SJ, Kim YH, Kim JH, Kim JH, Kim EM, Nam GE, Park JY, Son JW, Shin YA, Shin HJ, Oh TJ, Lee H, Jeon EJ, Chung SC, Hong YH, Kim CH. 2020 Korean society for the study of obesity guidelines for the management of obesity in Korea. *J Obes Metab Syndr.* 2021;30(2):81-92.
  37. Korea Institute of Oriental Medicine. Obesity: Korean medicine clinical practice guideline. Seoul:Elsevier Korea L.L.C. 2016:58-81.
  38. Herbal Formulations Text Compilation Committee. Herbal formula science in Korean medicine. Paju:Koonja publishers. 2020:1240-8.
  39. Choi WS, Lee GS, Song WH, Koh JT, Yang JY, Kwak JS, Kim HE, Kim SK, Son YO, Nam HJ, Jin IJ, Park ZY, Kim JY, Park IY, Hong JI, Kim HA, Chun CH, Ryu JH, Chun JS. The CH25H-CYP7B1-ROR $\alpha$  axis of cholesterol metabolism regulates osteoarthritis. *Nature.* 2019;566(7743):254-8.
  40. Kim MJ, Park EJ. Feature analysis of different *In Vitro* antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2011;40(7):1053-62.
  41. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011;48(4):412-22.
  42. Lee SM, You YH, Kim KM, Park JJ, Jeong CS, Jhon DY, Jun WJ. Antioxidant activities of native gwangyang *Rubus coreanus* miq. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012;41(3):327-32.
  43. Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, Ishtiaq A, Hussain S, Suleria HAR. Natural polyphenols: an overview. *International Journal of Food Properties.* 2017;20(8):1689-99.
  44. Lee YR, Yoon NR. Anti-oxidative and anti-diabetic effects of methanol extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015;44(5):681-6.

45. Semwal RB, Semwal DK, Vermaak I, Viljoen A. A comprehensive scientific overview of *Garcinia cambogia*. *Fitoterapia*. 2015;102:134-48.
46. Sullivan AC, Hamilton JG, Miller ON, Wheatley VR. Inhibition of lipogenesis in rat liver by (-)-hydroxycitrate. *Arch Biochem Biophys*. 1972;150(1):183-90.
47. Committee of Clinical Practice Guideline of the Korean Society of Lipid and Atherosclerosis. Korean guidelines for the management of dyslipidemia. 4th ed. Anyang: Academya. 2018:31-41.
48. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Reports*. 2001;2(4):282-6.
49. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):125-38.
50. Ha JH, Lee SH. Role of AMPK in the regulation of cellular energy metabolism. *Endocrinol Metab*. 2010;25(1):9-17.
51. Houten SM, Violante S, Ventura FV, Wanders RJA. The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation and its genetic disorders. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:23-44.
52. Liang H, Ward WF. PGC-1 $\alpha$ : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*. 2006;30(4):145-51.