

多様な 黄芩藥鍼製劑가 前脂肪細胞 3T3-L1의 増殖에 미치는 影響

김호경, 강은정, 고병섭 *

ABSTRACT

Effect of the various aqua-aqupuncture of Hwanggum(黄芩)
on proliferation of preadipocyte 3T3-L1 cells

Ho-Kyoung Kim, Eun-Jung Kang, Byoung-Seob Ko
Korea Institute of Oriental Medicine

These studies were conducted to investigate the effects of the various aqua-aqupuncture of Hwanggum(*Scutellariae Radix*) on the proliferation of 3T3-L1 cells. They were tested by means of Sulforhodamin B(SRB) assay. The results were summerized as follows:

All tested aqua-aqupuncture inhibited the proliferation of preadipose 3T3-L1 cells. In case of the dilution of Hwanggum aqua-aqupuncture(HG), the results were quite opposite. In 1000 times dilution of HG($\times 1000$), a low concentration increased the proliferation of preadipose 3T3-L1 cells, but the high(100 μ l and 200 μ l) concentration inhibited it.

These results suggest that Hwanggum aqua-aqupuncture may be used on the obesity induced by the overgrowth of preadipose 3T3-L1 cells.

Key words : 3T3-L1 cell, Sulforhodamin B(SRB) assay, Proliferation, Preadipose,
Aqua-aqupuncture

I. 서론

前脂肪細胞(preadipocyte)인 3T3-L1 細胞는 3T3 細胞로부터 유래된 細胞株으로써 그 生物學的 특성이 잘 알려져 있고, 적절한 條件下에서 培養 하면 脂肪細胞(adipocyte cell)로 分化하는 성질이 있어 脂肪細胞의 代謝過程은 물론 脂肪蓄積과 脂肪細胞의 分化過程을 研究하는데 널리 사용되고 있다¹⁻³⁾.

脂肪細胞의 형성과정은 前脂肪細胞의 增殖過程, 前脂肪細胞로부터 脂肪細胞로의 分化過程 그리고 成熟過程으로 크게 大別할 수 있고 각각의 段階는 여러 因子에 의해서 制御되고 있다³⁻¹²⁾.

前脂肪細胞의 增殖 및 脂肪細胞로의 分化에 影響을 미치는 物質을 探索하고 그 作用過程을 밝히는데 3T3-L1 細胞를 利用하여 實驗한 結果 retinol, retinoic acid, vitamin D group, vitamin E, nicotinamide, phorbol ester, dihydroteleocidin B, lithium 등은 前脂肪細胞에서 脂肪細胞로의 分化를 抑制하지만⁴⁾, 이와는 달리 ascorbate, hemin, cadmium, corticosterone, cAMP 등⁵⁻¹⁹⁾은 脂肪細胞로의 分化를 촉진시킨다는 사실이 밝혀져 脂肪細胞의 分化過程을 자세하게 理解할 수 있는 수준까지 되었다.

藥鍼製劑의 効能和 機作에 대한 檢證은 대부분 動物實驗을 통한 *in vivo*에서 實施되고 있으나, 人的, 時間的, 經濟的인 要因으로 研究에 많은 制限을 받고 있는 실정이다. 본 研究에서 이러한 制限的 要因들을 보완할 수 있는 方法의 전환을 *in vitro*의 細胞水準에서 摸索하고자 하였다.

黃芩은 韓醫學의 寒하며, 심, 폐, 담, 대장 경으로 들어가며, 壯熱煩渴, 濕熱瀉痢, 熱淋, 吐 등에 적용할 수 있는 韓藥材이다²⁰⁾. 脂肪細胞의 形成過程은 前脂肪細胞로 增殖하는 段階와 分化 段階로 나눌 수 있는데, 본 研究에서는 煎湯, 濾過, 稀釋에 의한 方法으로 藥鍼製劑를 製造한²¹⁾ 黃芩水液製劑(HG)와 黃芩水液稀釋製劑, 흡착크로

마토그래피에 의한 XAD-4製劑, 複合注射劑 그리고 黃芩八綱注射劑들이 3T3-L1 細胞의 增殖段階에 미치는 影響을 檢討하였는데 약간의 知見을 얻었기에 報告하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 實驗材料

1) 細胞株

實驗에 使用한 3T3-L1 細胞는 日本 나고야(名古屋)大學 農學部 生化學制御室 Y. Kitagawa 教授로부터 分讓받아 使用하였다.

2) 試藥 및 機器

實驗에 使用한 試藥은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco), Fetal bovin serum (FBS, Gibco), Trypsin-EDTA(Gibco), Gentamicin(Gibco), Phosphate buffered saline (PBS, Sigma), Trichloroacetic acid(TCA), Acetic acid(Aldrich), Trizma base(Sigma), Sulforhodamin B(SRB, Sigma), Dimethyl sulfoxide(DMSO, Aldrich), 使用한 機器는 Culture flask(Falcon), 96-Well plate(Falcon), Disposable pipette(Falcon), ELIZA-Reader (Spectra), CO₂ incubator(Fisher), Inverted microscope(Olympus) 등을 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 檢液試料

黃芩을 煎湯, 濾過, 稀釋에 의한 方法으로 藥鍼製劑를 製造한²¹⁾ 黃芩水液製劑(HG)와 黃芩水液稀釋製劑, 흡착크로마토그래피에 의한 XAD-4製劑, 複合注射劑 그리고 黃芩八綱注射劑들을 使用하였고 對照群으로 蒸溜水을 使用하여 比較하였다.

2) 細胞培養

實驗에 사용된 3T3-L1 細胞의 培養液은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)이였으며, Fetal bovine serum(FBS), Gentamicin (100 units/ml), Streptomycin(100 μ g/ml) 등을 添加하였다. 3T3-L1은 培養 3日 간격으로 培養細胞 表面을 phosphate buffered saline (PBS) 溶液으로 씻어준 後 50ml flask當 1ml의 0.25% trypsin-EDTA 溶液을 넣고 室溫에서 1分間 처리한 다음 trypsin-EDTA溶液을 버리고 37 $^{\circ}$ C에서 5分間 保管하여 細胞를 脫着하여 繼代培養하였다. 脫着된 細胞는 10% FBS가 添加된 DMEM 培地 10ml에 浮遊시킨 다음 새로운 培養容器 (50ml culture flask)에 옮겨 1 : 20의 split ratio로 CO₂ 培養機(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 培養하였다.

3) SRB法에 의한 細胞增殖能 測定

SRB法에 의한 細胞增殖能 測定은 Alley 등²²⁾과 Skehan 등²³⁾의 方法을 응용하여 사용하였다. 10% FBS가 添加된 DMEM培地에서 3日間 培養하고 培養培地를 除去한 後, PBS로 細胞表面을 洗滌하고 0.25% trypsin-EDTA 1ml를 添加하여 1分間 反應 後, 0.25% trypsin-EDTA를 除去, 10% FBS가 添加된 DMEM 培養液 5ml를 添加하여 피펫팅하고 細胞浮遊(cell suspension) 대 trypan blue(1%)=1:1로 混合하여 Haemacytometer로 細胞數를 計算하여 5 \times 10⁴ cells/ml로 浮遊시켰다. 細胞浮遊液 100 μ l씩을 96 well plate의 각 well에 分株하여 well當 5 \times 10³ cells/ml의 細胞가 接種되게한 다음 5% CO₂ incubator(5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C)에서 24時間 培養하여 細胞를 부착시킨 後 다시 각 well에 稀釋된 濃度의 黃芩水液製劑(HG)와 黃芩水液稀釋製劑, 흠착크로마토그래피에 의한 XAD-4製劑, 複合注射劑 그리고 黃芩八綱注射劑를 檢液試料로 添加하였다. 以上과 같이 處理한 後, CO₂ incubator에서 2日間 培養하여 培養이 끝난 細胞에 TCA를 最終 濃度가 10%로 되게 添加하고 4 $^{\circ}$ C에서 1時間 培養하여 細胞를 固

定시켰다. 蒸溜水로 5回 反復하여 細胞를 洗滌하였다. 乾燥된 plate의 각 well에 1% acetic acid로 溶解시킨 0.1% SRB용액 100 μ l씩 가하여 常溫에서 30分동안 충분히 染色시킨 後 1% acetic acid로 5회 洗滌하여 空氣中에서 乾燥시켰다. 완전히 乾燥되면 10mM unbuffered Tris(pH 10.5) 溶液을 각 well에 添加하여 細胞蛋白質에 부착된 SRB dye를 10分間 잘 溶出시키고 均一하게 만든 後 ELISA reader 564nm에서 吸光度(OD)를 測定하여 細胞의 增殖정도를 測定하였다.

4) 結果分析

檢液의 效果는 SRB assay로 測定한 對照群의 吸光度에 대한 實驗群의 百分率로 換算하여 二項檢定 p-value로 處理하였다. 對照群에 대해서는 p<0.05(*), p<0.01(**)로 判定하였다.

III. 結 果

1. 繼代培養

脂肪細胞의 研究을 糾明하는데 주로 利用되는 3T3-L1 細胞는 DMEM/FBS 培地로 通常의인 條件인 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 恒溫機에서 培養되면 doubling time이 20~30時間 걸린다고 알려져 있으나, 본 研究의 豫備實驗 및 文獻檢索에 의한 研究 報告書를 分析한 結果 3T3-L1 細胞는 繼代培養 回數에 따라 變化가 있었다. 본 實驗에 使用한 3T3-L1 細胞의 標準增殖을 調查한 結果 doubling time은 16.7時間이었으며 飽和密度(saturation density)는 대략 5 \times 10⁴ cells/cm²로 測定되어(Fig. 1) 3T3-L1 細胞의 一般의인 增殖特性을 保有하고 있는 것으로 確認되었다. 본 實驗에 使用한 3T3-L1 細胞의 單一 容積當 最適細胞密度는 Fig. 2에 log값으로 나타냈으며, 또한 Fig. 3은 3T3-L1 細胞의 標準長曲線으로 直線으로 그린 것이며 본 實驗에 使用하였다.

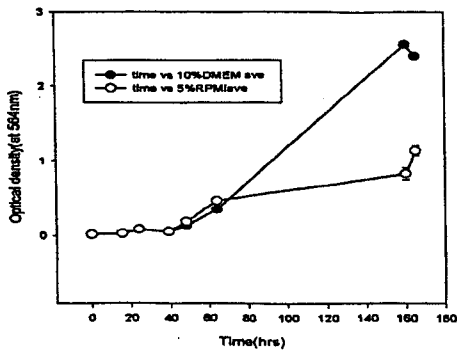


Fig. 1. Growth curve of 3T3-L1
* Initial seeding density 1.0×10^4 cells/ml

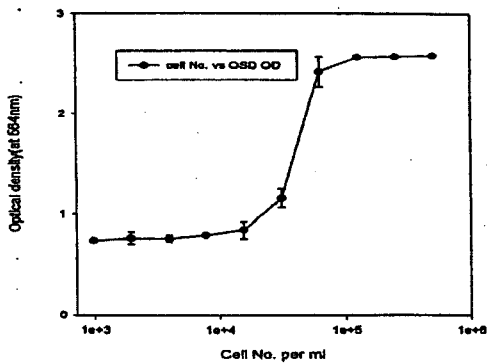


Fig. 2. Optimal seeding density of 3T3-L1

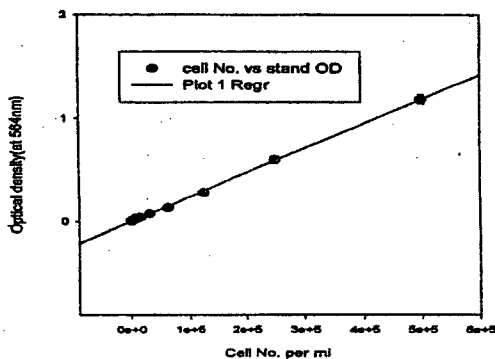


Fig. 3. Standard linear graph of 3T3-L1

2. 細胞의 增殖效果

脂肪細胞로 分化되기 前段階인 前脂肪細胞의 增殖에 미치는 多様な 黃芩藥鍼製劑의 影響을 調査하기 위하여 96-well plate의 각 well에 細胞濃度를 5×10^3 cells/ml로 하고 黃芩水液製劑(HG)와 黃芩水液稀釋製劑, 흡착크로마토그래피에 의한 XAD-4製劑, 複合注射劑 그리고 黃芩八綱注射劑들을 $1\mu\text{l}$, $10\mu\text{l}$, $100\mu\text{l}$, $200\mu\text{l}$ 로 調整하고 處理하여 2日동안 培養하였다. 細胞의 增殖能에 미치는 檢液의 效果는 SRB法으로 測定한 對照群의 吸光度에 대한 實驗群의 吸光度를 百分率로 換算하여 算定하고 統計處理는 二項檢定 p-value로 處理하였다. 對照群에 대한 p-value는 <0.05 와 <0.01 로 有意性을 判定하였고, 그 結果들은 Table 1과 같다. Fig. 4는 3T3-L1 細胞의 增殖過程에 있어서 增殖抑制와 促進을 나타낸 藥鍼製劑의 實驗結果를 촬영한 것이다.

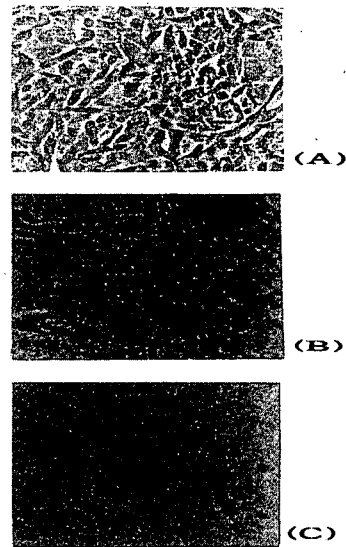


Fig. 4. Micrographs of 3T3-L1 cells treated with diluted Hwangggum Aqua-aqu-puncture ($\times 1000$)
A; normal 3T3-L1 cells
B; Proliferation C; Inhibition

Table 1. The inhibition effect of Aqua-aupuncture on the proliferation of 3T3-L1 cells by SRB assay

Group \ Conc.	1 μ l	10 μ l	100 μ l	200 μ l
Control	100 \pm 5.39			
HG	16.69	23.12	26.82	22.41
	14.59	20.74	30.02	32.24
	14.79	17.37	20.82	23.16
	15.36 \pm 4.9**	20.41 \pm 3.9**	25.89 \pm 6.1**	25.94 \pm 6.8**
\times 10	95.46	56.97	38.65	44.92
	96.80	57.53	41.73	48.06
	95.34	61.67	40.72	47.72
	95.87 \pm 4.0	58.72 \pm 4.2**	40.37 \pm 1.5**	46.90 \pm 1.89**
\times 100	99.74	96.17	68.79	20.46
	101.73	99.79	44.63	16.38
	98.84	97.85	39.16	15.31
	100.10 \pm 1.3	97.94 \pm 4.1	50.86 \pm 16.6**	17.38 \pm 2.7**
\times 1000	109.30	106.33	84.70	19.04
	114.00	107.89	86.55	19.15
	106.16	106.10	86.32	24.42
	109.82 \pm 3.5**	106.77 \pm 2.9*	85.86 \pm 4.2**	20.87 \pm 5.2**
Composite Aqua-aupuncture ¹⁾	99.59	99.04	28.60	15.11
	101.49	99.04	35.46	18.35
	100.42	93.31	24.12	14.99
	100.5 \pm 0.97	97.13 \pm 3.9	29.39 \pm 8.7**	16.15 \pm 2.1**
Distillation	95.43	70.78	26.74	24.16
	99.35	72.96	30.93	30.46
	99.16	79.20	27.25	25.66
	97.98 \pm 1.8	74.31 \pm 8.0**	28.31 \pm 2.2**	26.76 \pm 3.1**
XAD-4	99.71	83.08	44.75	56.13
	98.15	83.13	44.87	55.45
	102.63	83.80	43.41	52.76
	100.16 \pm 1.9	83.34 \pm 0.6**	44.34 \pm 1.0**	54.78 \pm 1.8**

a) Each value represents mean \pm standard error of 3 determinations, respectively.

Significantly different from control group(*: p<0.05, **: p<0.01)

1) Baicalin+Baicalein+Wogonin

黃芩水液製劑(HG)는 1 μ l, 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l의 각 농도에서 3T3-L1 전지방세포의 증식을 p-value가 <0.01로 유의성이 높게 억제하였다.

황금수액제제(HG)를 희석한 黃芩水液稀釋製劑에서 $\times 10$ 은 1 μ l에서는 前脂肪細胞인 3T3-L1의 增殖에 影響을 미치지 못했으나, 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l의 각 濃度에서 p-value가 <0.01로 有意性이 높게 細胞의 增殖을 抑制하였고 $\times 100$ 은 100 μ l와 200 μ l의 濃度에서 p-value가 <0.01로 有意性이 높게 前脂肪細胞인 3T3-L1의 增殖을 抑制하였지만, 1 μ l와 10 μ l에서는 細胞의 增殖에 影響을 끼치지 않았다. 그러나 $\times 1000$ 은 低濃度와 高濃度에서 相異한 結果를 나타냈다. 1 μ l와 10 μ l에서 增殖能이 각각 109.82 \pm 3.5, 106.77 \pm 2.9로 有意性(p-value는 <0.01)있게 3T3-L1 細胞의 增殖을 促進시키고 있으나 100 μ l와 200 μ l에서는 p-value가 <0.01로 有意性 있게 3T3-L1 細胞의 增殖을 抑制시키고 있다. 이들의 增殖能은 각각 85.86 \pm 4.2, 20.87 \pm 5.2를 나타냈다. 複合注射劑는 100 μ l와 200 μ l에서는 p-value가 <0.01로 3T3-L1 細胞의 增殖을 억제시키고 있다. 黃芩八綱注射劑는 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l의 각 濃度에서 p-value가 <0.01로 매우 有意性 있게 細胞의 增殖을 抑制하였다. 흡착크로마토그래피에 의한 XAD-4는 p-value가 <0.01로 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l의 각 濃度에서 有意性 있게 細胞의 增殖을 抑制하였다.

IV. 고 찰

前脂肪細胞인 未分化 狀態의 3T3-L1 細胞의 增殖에 대한 黃芩藥鍼製劑들의 影響을 實驗한 結果는 前脂肪細胞의 增殖을 직접 抑制하는데 이들 藥鍼製劑가 有效하게 作用하리라는 點을 시사하고 있다. 그러나 黃芩水液製劑(HG)를 稀釋한 黃芩水液稀釋製劑의 $\times 1000$ 은 低濃度와 高濃度에서 相反된 結果를 얻었는데, 低濃度에서는 細胞의

增殖을 촉진시키는 促進劑의 效果를 보이고 있고 高濃度에서는 正反對인 細胞의 增殖을 억제시키는 抑制劑로 作用하였다. 韓方藥 및 그 成分들은 合成藥과는 달리 生體에 대해 다양한 作用을 한다고 報告되고 있다. 이들의 生理活性은 特定의 作用에 關與하는 것이 아니기 때문에 藥理作用을 解明하는 것은 어려운 일이다. 金井成行²⁴⁾은 黃芩에서 추출한 baicalein과 wogonin이 生體膜에 미치는 影響을 赤血球를 사용하여 溶血變化를 生體膜에 대한 實驗結果에서 低濃度에서는 溶血保護作用을 나타냈으나 高濃度에서는 抗血恒進을 나타내 相反性的 反應을 나타냈다고 報告하고 있다.

黃芩藥鍼製劑가 함유하고 있는 成分²⁵⁾은 glucoside인 baicalin과 aglycone構造를 하고 있는 baicalein, wogonin이다. Baicalin, baicalein 그리고 wogonin은 構造 骨格이 서로 비슷하지만 그 作用은 명확히 다르다. 黃芩水液製劑(HG)의 경우 低濃度인 1 μ l에서부터 p-value가 <0.01로 3T3-L1 細胞의 增殖抑制에 有意性은 높았으나, 細胞毒性이 강하게 나타나고 있다고 생각되어진다. 複合注射劑는 200 μ l 농도에서 黃芩水液製劑(HG)의 경우 보다 더 강한 細胞毒性 나타나고 있다고 推測되어진다. 黃芩水液稀釋製劑에서 $\times 1000$ 은 흥미로운 結果를 보여주었는데 低濃度에서는 細胞의 增殖促進作用을 나타냈으나 高濃度에서는 細胞의 增殖抑制作用을 나타냈다. 이 相反된 生理活性의 結果는 金井成行들의 結果와 유사한 것으로 同種요법(homeopathy)²⁶⁾에서도 高稀釋倍數의 경우에 力價(potency)가 더욱 상승한다고 주장하고 있다. 본 實驗의 경우에도 이러한 原理를 間接적으로 證明해 준 것이라 思料된다. 黃芩水液稀釋製劑中 $\times 1000$ 에서 보여준 傾向과 유사한 結果는 癌細胞의 培養에서도 인정되고 있다²⁷⁾.

脂肪細胞가 過形成되는 過程을 거쳐 脂肪組織이 肥大化되어 肥滿하게 되는데, Fig.5는 肥滿組

織의 肥大化過程에서 脂肪細胞의 過形成을 抑制시키는 制御點을 戰略化한 것이다.²⁸⁾ 前脂肪細胞의 增殖과 分化段階가 중요한 肥滿形成의 制御點이라 할 수 있다. 여러 가지 因子가 關여하고 있는 前脂肪細胞의 增殖과 分化段階에서 본 實驗에서 사용한 藥劑製劑들을 應用한다면, 脂肪細胞의 脂肪生産을 調節하거나, 에너지의 過乘攝取로 인한 過多한 脂肪生産과 蓄積을 抑制시킬 수 있다고 思料된다. 즉, 黃芩藥劑製劑들이 脂肪細胞의 形成過程에서 前脂肪細胞로 增殖하는 段階 또는

分化段階를 抑制할 수 있다면 脂肪組織의 肥大를 예방하고 肥滿을 治療하는데 應用할 수 있을 것이다.

이상의 結果를 整理해 보면, in vitro에서 前脂肪細胞 3T3-L1 등과 같은 正常細胞에 대한 藥劑製劑들의 作用을 檢討하는 것은 in vivo에서 藥劑製劑들의 生理活性을 解明하는데 貴重한 資料로서 活用할 수 있다고 생각되며 今後 多種多樣한 藥劑製劑를 研究할 必要가 있다고 생각된다.

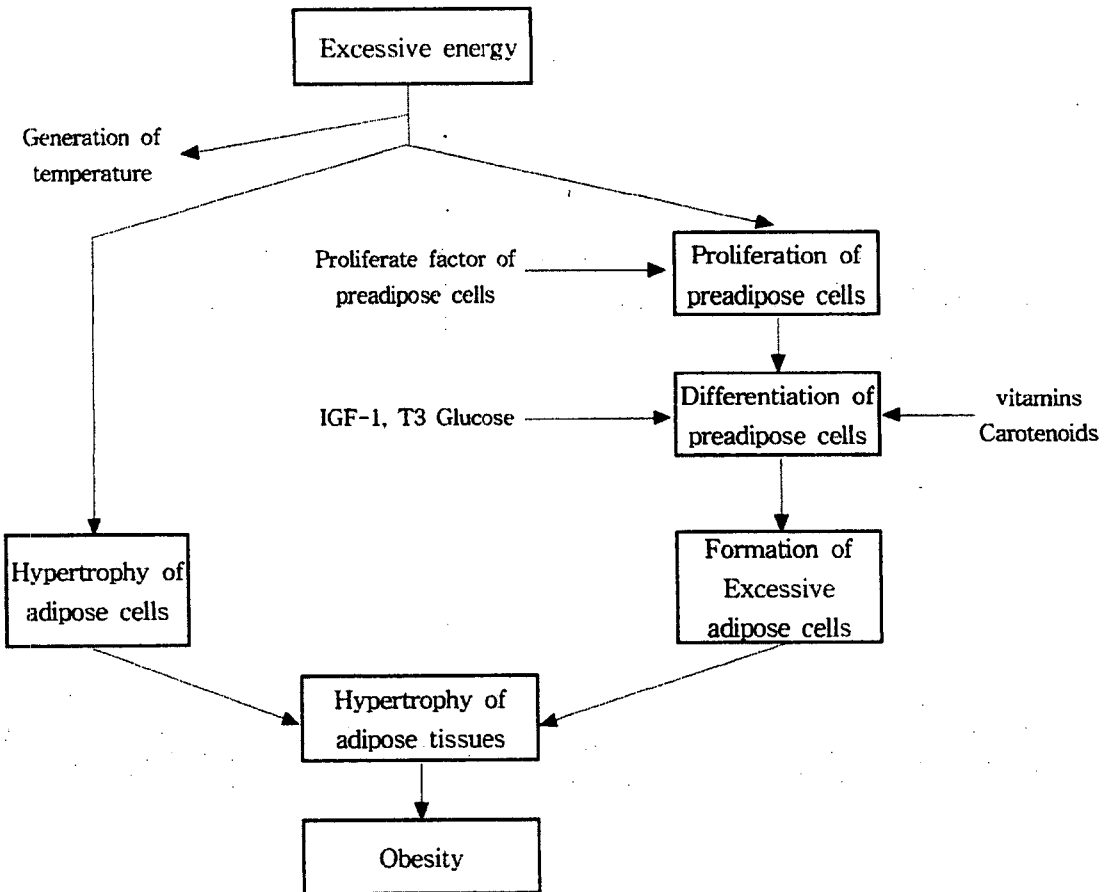


Fig. 5. Control points of adipose cells or tissues

V. 요약

1. 前脂肪細胞인 未分化 狀態의 3T3-L1 細胞의 增殖에 대한 黃芩藥鍼製劑들의 影響을 實驗한 結果 前脂肪細胞의 增殖을 직접 抑制하는데 이들 藥鍼製劑가 有效하게 作用하리라는 點을 시사하고 있다.

2. 黃芩水液稀釋製劑에서 $\times 1000$ 群은 低濃度와 高濃度에서 相反된 結果를 얻었는데, 低濃度에서는 細胞의 增殖을 促進시키는 促進劑의 效果를 보이고 있고 高濃度에서는 正反對인 細胞의 增殖을 抑制시키는 抑制劑로 作用되었다.

3. 黃芩水液製劑(HG)의 경우 低濃度인 $1\mu\text{l}$ 에서 부터 p-value가 $<0.01(**)$ 로 3T3-L1 細胞의 增殖抑制에 有意성은 높았으나 細胞毒性이 强하게 나타나고 있다고 생각되어지며 複合注射劑는 $200\mu\text{l}$ 농도에서 黃芩水液製劑의 경우 보다 더 强한 細胞毒性을 나타내고 있다고 推測되어진다.

4. 黃芩藥鍼製劑들이 脂肪細胞의 形成過程에서 前脂肪細胞로 增殖하는 段階 또는 分化段階를 抑制할 수 있다면 脂肪組織의 肥大를 豫防하고 肥滿을 治療하는데 應用할 수 있을 것이라 생각되어 진다.

감사의 말

본 研究는 보건복지부의 研究事業에서 支援를 받아 수행된 것으로 이에 感謝드리며, 또한 이 研究를 보조해준 김영순씨와 SRB assay에 관한 助言을 해준 박갑주박사에게 感謝드린다.

참고문헌

1. Green H, Kehinde O. Sublines of mouse

3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*. 1974;1:113-116

2. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974;3:127-133

3. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*. 1975;5:19-27

4. Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion. *Cell*. 1976;7:105-113

5. Serrero G, Khoo JC. An in vitro model to study adipose differentiation in serum free medium. *Anal. Biochem*. 1981;120:351-359

6. Mackall JC, Student AK, Polakes SE, Lane MD. Induction of lipogenesis during differentiation in a "preadipocyte" cell line. *J. Biol. Chem*. 1976;251:6462-6464

7. Coleman RA, Reed BC, Mackall JC, Student AK, Lane MD, Bell RM. Selective changes in microsomal enzymes of triglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem*. 1978;253:7256-7261

8. Wise LS, Green H. Studies of lipoprotein lipase during the adipose conversion. *Cell*. 1978;13:233-242

9. Spooner PM, Chernick SS, Garrison MM, Scow RO. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem*. 1979;254:10021-10029

10. Student AK, Hsu RY, Lane MD. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J.*

- Biol. Chem. 1980:225:4745-4750
11. Rubin CS, Lai E, Rosen OM. Acquisition of increased hormone sensitivity during in vitro adipocyte development. J. Biol. Chem. 1977:252:3554-3557
 12. Sato M, Hiragun A. Demonstration of 1-alpha, 25-dihydroxyvitamine D3 a receptor-like molecule in ST13 and 3T3-L1 preadipocytes and its inhibitory effects on preadipocyte differentiation. J. Cell. Physiol. 1988:135:545-550
 13. Kawada T, Aoki N, Kamei Y, Maeshige K, Nishiu S, Sugimoto E. Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation from preadipocytes to adipocytes of 3T3-L1 cells. Comp. Biochem. Physiol. 1990:96A(2):323-326
 14. Shimizu Y, Shimizu N, Fujiki H, Sugimura T. Distinct inhibitory effects of dihydroteleocidin B and the phorbol ester tumor promoters on the adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. Cancer Res. 1983:43:4974-4979
 15. Harrison SA, Buxton JM, Clancy BM, Czech MP. Evidence that erythroid-type glucose transporter intrinsic activity is modulated by cadmium treatment of mouse 3T3-L1 cells. J. Biol. Chem. 1991:266:19438-19449
 16. Gamou S, Shimizu Y, Shimizu N. Adipocytes. In Methods in molecular biology. Animal cell culture. 1990:5:197-207
 17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods. 1983:65:55-63
 18. Rubin CS, Hirsch A, Fung C, Rosen OM. Development of hormone receptors and hormone responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. J. Biol. Chem. 1978:253:7570-7578
 19. Schmidt W, Poll-Jordan G, Loffler G. Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP. J. Biol. Chem. 1990:265:15489-15495
 20. 李時珍. 本草綱目, 北京, 人民衛生, 1977:780-783
 21. 고병섭, 김호경, 안상우 주혜정, 마진열, 전원경, 강은정, 최민선, 윤수영, 김영순, 한약침의 제제에 관한 연구(1997), 보건복지부 연구보고서, P.19-42
 22. Alley, M. C., Scudiro, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. I., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R., Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, Cancer Res. 1988:48:589
 23. Skehan, P., Strong, R., Scudiero D. A., Monks, A., McMahon, J., Vistica, A. D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R., New colorimetric cytotoxicity assay for Anticancer-Drug Screening, J. Natl. Cancer Inst. 1990:82:1107
 24. 金井成行, 織田眞智子, 中西由香, 唐方, 阿部博子. 오-گون인, 바이칼레인의生體膜에對する檢討, 和漢醫藥學雜誌 1997:14:66-68
 25. 章國鎮. 生藥誌 1980:34:169
 26. 한국한의학회연구소 임상연구부편. 동종요법과 체질의학. 서울, 한국한의학회연구소, 1995:34-38

27. Watanabe, K. Inhibitory effects of baicalein and wogonin on the growth of B16 melanoma cells. *Acta Medica Kinki University*, 1996;21:377-385
28. 杉本悦郎, 建康・營養に關與する細胞機能の生化學的研究, *日本農藝化學會誌*, 1994;68(8):1199-1205