

防風通聖散加味方이 肥滿誘導 白鼠와 脂肪細胞 分化에 미치는 影響

안홍식, 이진용, 김덕곤

경희대학교 한의과대학 소아과학교실

Anti-obestic Effects of *Bangpoongtongsungsankamibang*(BTSK) in 3T3-L1 preadipocyte cells and the Lipid Metabolism of Obesity induced Rats

Ahn Hong Sik, Lee Jin Yong, Kim Deog Gon

Department of Pediatrics, college of Oriental Medicine, Kyunghee University

Objective : This experimental study was designed to determine the anti-obestic effects of *Bangpoongtongsungsankamibang*(BTSK).

Methods : *In vitro*, BTSK extracts of various concentration (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added in 3T3-L1 cell. Adipocyte differentiation was measured by Oil Red O staining and morphological examination. The protein and mRNA expression of C/EBP α and PPAR γ receptor was measured by western blot assay and RT-PCR. *In vivo*, BTSK extracts of various concentration (100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were orally administered to induced hyperlipidemic rats by poloxamer-407 for consecutive four weeks and serum triglyceride, total cholesterol were measured. This method applied to induced hyperlipidemic rats by triton WR-1339, too. Obesity induced rats by the high fat-diet for six weeks were orally administered BTSK extracts of various concentration (100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and serum triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, HDL- cholesterol, hydroxy radical, superoxide dismutase activity were measured.

Results :

I. *In vitro*

1. The 3T3-L1 cells' differentiation was significantly decreased by BTSK.
2. The expression of C/EBP α and PPAR γ was significantly decreased by BTSK.

II. *In vivo*

1. BTSK significantly reduced serum triglyceride, total cholesterol contents in poloxamer-407 treated rat.

2. BTKS significantly reduced serum triglyceride contents in Triton WR-1339 treated rat. But Total cholesterol did not show a significant change.
3. BTKS significantly reduced body weight gain of rat and adipose tissue mass of rats and serum triglyceride, LDL-cholesterol contents and significantly increased HDL-cholesterol, HTR(HDL-cholesterol/Total-cholesterol) in rats with obesity induced by the high fat-diet.
4. BTKS reduced blood lipid peroxide, hydroxy radical and increased superoxide dismutase(SOD) activity.

Key words: BTKS, 3T3-L1 cells, C/EBP α , PPAR γ , triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, hydroxy radical, SOD

접 수 : 2006년 3월 31일, 채택일자: 2006년 4월 22일

교신저자 : 안홍식, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방병원 한방소아과
(Tel. 02-548-0380, E-mail: hsiks@soaworld.com)

I. 緒 論

비만이란 에너지의 섭취가 에너지의 소비량보다 초과 시에 잉여 에너지가 체내의 지방 조직 내에 축적되어 대사 장애를 유발하는 현상으로, 남자의 경우 체지방량이 체중의 25% 이상, 여자의 경우 30%이상인 경우로 정의되고 있고^{1,2)}, 소아의 경우 남자는 15%이상, 여자는 20%이상일 때 비만으로 간주 한다³⁾.

최근 10년간의 추세를 보면 비만은 선진국만의 질병이 아니고, 대부분의 개발도상국가에서도 그 유병율은 급등하고 있는 것으로 보고되고 있고⁴⁾, 비만이 고혈압, 당뇨병, 심혈관계 질환 등 만성 질환의 발생과 관련이 있다는 사실은 잘 알려져 있다⁵⁾. 비만은 성인이 되어 형성되기도 하나 대부분 식습관이 형성되는 소아의 비만이나 체중과다가 성인이 되어서도 지속되며, 이는 여러 퇴행성질환의 원인이 될 뿐 아니라 고인슐린혈증, 고지혈증과 고혈압 같은 성인병이 많이 나타난다¹⁾. 또한 소아 비만은 신체적인 건강문제뿐만 아니라 심리사회적인 문제를 동반할 수 있으므로^{6,7)} 보다 적극

적인 치료가 필요하다.

한의학에서 비만은 肥, 肥人, 肥貴人, 肥胖 등으로 표현하였는데⁸⁾, <黃帝內經> <素問通評虛實論>에서는 “肥貴人即膏粱之疾也”라 하고 素問 奇病論에는 “人必數食甘味而多肥也”라 하여 膏粱珍味와 甘味の 음식을 많이 먹어서 생긴다 하였고⁹⁾, 그 밖에 여러 종류의 문헌에서 先天稟賦, 飲食失調, 久臥久坐, 活動減少, 外感濕邪, 內傷七情 등으로 氣虛, 氣滯, 痰濁, 水濕, 血瘀 등이 유발되어 肥滿이 발생한다고 하였다. 治法으로는 補氣健脾, 化濕利水, 祛痰, 通腑消導, 活血通絡 등이 있다¹⁰⁻¹²⁾.

防風通聖散은 金代 劉河間的 <宣明方論>에 최초로 기재된 방제로 一切 風熱과 飢飽勞役의 內外諸邪에 손상되어 氣血이 鬱滯하고 表裏와 三焦가 俱實한 증을 치료할 목적으로 立方되었으며¹³⁾, 최근의 여러 문헌에서 防風通聖散이 肥滿症으로서 實證인 中風體質者에게 활용된 예가 제시되고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾.

또한 肥滿에 대한 防風通聖散의 效能을 검증하기 위한 실험적 연구들은 여러 차례 시행되었는데, 김¹⁷⁾의 가토혈청중 지질함량에 미

치는 영향, 이 등¹⁸⁾의 고혈압, 고지혈에 미치는 영향, 안 등¹⁹⁾의 비만유도백서의 체중 및 지질 대사에 미치는 영향 등이 보고되었다. 그러나 기존의 연구들은 주로 지질함량 등에 대해 미치는 효과를 확인할 뿐이었으며, 비만에 대한 지방세포분화과정 중의 유전자 발현에 미치는 영향과 지질 과산화대사물의 축적과 항산화효소활성에 미치는 영향에 대해서는 연구된 바가 거의 없었다.

이에 저자는 防風通聖散에 淸熱消痰, 軟堅散結, 利水消腫의 효능으로 水腫脹滿을 치료하는 효능이 있는 海帶^{20,21)}를 加한 防風通聖散加味方을 이용하여, 3T3-L1 전구지방세포주의 분화를 억제하고, 비만유도 백서의 체중 및 혈중지질을 감소시키며 지질과산화물생성을 억제하고 항산화효소활성을 촉진시킨다는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. In vitro

1) 실험 약물

본 실험에 사용한 防風通聖散加味方 한 첩의 구성과 비율은 다음과 같고, 경희대학교 한의과대학 부속한방병원(서울, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다.

2) 검액의 조제

각 건조 시료 분량의 10 배의 정제수를 넣고 100℃에서 4시간 동안 열수 추출하여 여과한 다음 rotary evaporator에서 감압 농축하고 -20℃에서 보관하며 실험에 사용하였다.

Table 1. Prescription of *Bangpoongtongsungskamibarig*

Herb Name	Scientific Name	Amount(g)
滑石	Talcum	7
甘草	Glycyrrhizae Radix	5
薄荷	Menthae Folium	2
石膏	Cypsum Fibrosum	3
黄芩	Scutellariae Radix	3
桔梗	Platycodi Radix	3
川芎	Cnidii Rhizoma	2
當歸	Angelicae gigantis Radix	2
赤芍藥	Aeoniae Radix	2
大黃	Rhei Undulati Rhizoma	2
麻黃	Ephedrae Herba	2
連翹	Forsythiae Fructus	2
芒硝	Sodii Sulfas	2
防風	Sileris Radix	2
荊芥	Nepetae Herba	2
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	2
梔子	Gardeniae Fructus	2
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	6
海帶	Laminaria japonica Aresch	12
total amount		63

3) 세포 배양

Murine 3T3-L1 preadipocytes 는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 사용하였으며, 10% FBS, 100 units/ml penicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin을 함유한 DMEM 배지에서 5% CO₂ 를 함유하며 37°C 를 유지하는 incubator에서 배양하였다.

4) 분화유도

2×10^4 cells/ml 의 3T3-L1 세포를 2일동안 배양하여 plate 바닥에 꼭 찬 후 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (MIX), 0.25 μM dexamethasone, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin 이 함유된 DMEM 배지에 10-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시료(DMSO 0.01%미만 함유)를 첨가하여 8일 동안 배양하였다.

5) 세포 독성 시험 (MTT assay)

세포를 2×10^5 cells/ml 농도로 조절한 후 0.1 ml를 96 well plate에 이식하고 4시간 후 배지에 희석시킨 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 각 시료는 DMSO에 용해시켜 사용하였으며 최종 DMSO의 농도가 0.1%를 넘지 않도록 하였다. 5 mg/ml 농도로 PBS에 용해시킨 MTT용액 50 μl 를 첨가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후 상등액을 제거하고 DMSO 100 μl 에 녹인 뒤 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 세포 성장 저해 실험 (Trypan blue assay)

세포 성장 저해는 trypan blue exclusion 실험법에 따랐다.

7) 세포내 triglyceride 측정

시료를 처리하여 배양한 세포를 PBS로 washing하여 teflon policeman으로 떼어낸 후

extraction buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, and 1 mM mercaptoethanol)로 현탁시켜 homogenation 하였다. 이중 chloroform-methanol (2:1, v/v) 로 triglyceride (TG)를 추출하여 Triglyceride Test Kit를 사용하여 정량하였다.

8) Oil red O staining

세포를 모아 PBS로 세척한 다음 10% formalin으로 20분 고정 시킨 후 100% propylene glycol로 3분 처리하여 oil red O solution으로 60분 염색시킨다. 60% propylene glycol과 D.W 로 완전세척 한 후 건조시켜 isopropanol 로 dye 를 추출하여 510nm 에서 OD를 측정하였다.

9) Western blotting

시료를 처리한 세포들을 모아 원심분리 (2,000 rpm, 4 min) 후 상등액을 제거하고 PBS로 washing한 후 protease inhibitor cocktail을 함유한 ELB buffer (50 mM HEPES pH 7.0, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM dithiothreitol, 5 mM NaF, 0.5 mM Na orthovanadate)에 현탁시켜 세포를 용해시킨 후 700g에서 5분간 원심 분리하여 세포의 불순물을 제거하였다. 상등액을 Bradford 방법으로 정량하고 sample buffer 처리하여 SDS-PAGE를 이용하여 세포내 단백질을 분리하였다. 분리한 gel을 semi-dry system으로 100 mA에서 1시간동안 nitrocellulose membrane에 transfer시킨 후 5% skim milk 용액에 하룻밤 blocking한 다음 4시간동안 다양한 primary antibody를 반응시키고 washing후 HRP (horseradish peroxidase)-conjugate된 secondary antibody를 1시간동안 반응시킨 후

암실에서 ECL방법으로 X-ray film에 detection 하였다.

10) RT-PCR

시료를 처리한 세포들을 PBS로 washing 한 후 Trizol reagent를 이용하여 얻어진 RNA에 MuLV reverse-transcriptase, 1 mM dNTP, and 0.5 μ g을 넣어 cDNA를 만들었다. 사용된 primer는 다음과 같다. C/EBP α , (GenBankTM accession number NM007678), forward 5-AGGTGCTGGAGTTGACCAGT-3 and reverse 5-AGCCTAGAGATCCAGCGAC-3; PPAR γ , (GenBankTM accession number NM011146), forward 5-GGTGAAACTCTGGGAGATTC-3, reverse 5-CAACCA-TTGGGTCAGCTCTT-3; leptin, (GenBankTM accession number NM008493), forward 5-CCAAAACCCTCATCAAGACC-3, reverse 5-CTCAAGCCACCACCTCTGT-3; 이때 C/EBP α 와 PPAR γ 은 94°C, 1 min, 54°C, 1 min, 72°C, 30 sec, 25 cycles 로 증폭시키고 Leptin과 β -actin은 94°C, 1 min, 94°C, 1 min, 57°C, 1 min, 33 cycles 로 증폭시켰다. 생성된 PCR products를 2.0% agarose gel에 전개시켜 UV detector로 확인하였다.

2. In vivo

1) 材料

(1) 실험동물

실험동물은 효창사이언스로부터 분양받아 동물사의 일정한 조건(온도 : 20-26°C, 습도 : 40-60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)하에서 2주 가량 충분히 적응시켜 사육한 체중 130-150 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였고, 실험 시작 전 24시간 동안 물만

주고 절식하였다. 이때 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다.

2) 검액의 조제

각 건조 시료 분량의 10 배의 정제수를 넣고 100°C에서 4시간 동안 열수 추출하여 여과한 다음 rotary evaporator에서 감압 농축하고 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

3) 실험군의 분류 및 檢液의 投與

일반 식이와 물을 먹인 군을 정상군(Normal), beef tallow(牛脂)를 첨가한 식이를 먹인 군을 대조군(Control)로 하고, 防風通聖散加味方을 beef tallow(牛脂)를 첨가한 식이에 첨가하여 투여한 군을 BTSK 군으로 하였는데, 사람의 복용량을 기준으로 계산하여 저농도인 100 mg/kg을 투여한 군을 BTSK I, 고농도인 200 mg/kg을 투여한 군을 BTSK II라 하였다.

4) Poloxamer-407로 유발된 고지혈증에 미치는 효과

Wout 등의 방법²²⁾에 따라 시료의 마지막 투여일에 poloxamer-407(300 mg/kg)을 ice bath에서 생리식염수에 용해하여 복강내에 투여하고 24시간 후에 처사하였다.

5) Triton WR-1339로 유발된 고지혈증에 미치는 영향

Kusama 등의 방법²³⁾에 준하여 Triton WR-1339 투여 16시간 전부터 절식시킨 후 Triton WR-1339 200 mg/kg을 꼬리정맥에 주사하여 고지혈증을 유발 시킨 후 40시간 후에 CO₂ gas로 마취하여 채혈하였다.

6) 식이성 고지혈증유발 흰쥐에 미치는 영향
식이성 고지혈증의 유발은 beef tallow(牛脂)를 첨가한 식이시료를 6주간 사육하여 고지혈증을 유발하였다(Table 2).

(1) 體重測定

체중은 실험 개시 후 매주 7주간 7회를 전자저울 (Sartorius, U6100D, Germany)로 측정하였다.

(2) 血液學的 分析

① 採血 및 血清分離

시료의 투입이 끝난 실험동물을 CO₂로 가볍게 마취시키고 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하여 혈액의 일부는 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 지질함량의 측정, lipid peroxide, hydroxyl radical 함량 및 superoxide dismutase 활성의 측정에 사용하였다.

② 중성지방(triglyceride)의 함량 측정

McGowan 등의 방법²⁴⁾에 준하여 조제된 kit (AM 157S-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 즉, 빙냉상에서 효소시약 (lipoprotein lipase 10800 U, glycerol kinase 5.4 U, peroxidase 135,000 U, L- α -glycero phosphooxidase 160 U 함유)을 효소시약 용해액[N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminomethane sulfonic acid 0.427 g/dl 함유]에 용해한 후 시료 20 μ l에 조제한 효소시액 3.0 ml 을 첨가한 후 37°C에서 10 분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 550nm 에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선에 준해 혈중 함량은 mg/dl로 표시하였다.

③ Total cholesterol 함량 측정

Richmond 등의 효소법²⁵⁾에 의하여 조제된 kit (AM 202-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 즉, 빙냉상에서 효소시약 (cholesterol es-

Table 2. Composition of experimental diets(g/kg diet)

Ingredients	N	HF
Casein	200	200
DL-methionine	3	3
Corn start	150	150
Sucrose	500	345
Cellulose	50	50
Corn oil	50	-
Beef tallow	-	205
Salt mixture	35	35
Vitamine mixture	10	10
Choline bitartrate	2	2

Cellulose: Sigma Co. LTD., USA 2) Mineral mixture based on the pattern of Rogers and Haper(1965) contain the following(g/kg diet): calcium phosphate dibasic 500.0, sodium chloride 74.0, potassium citrate monohydrate 220.0, potassium sulfate 52.0, magnesium oxide 24.0, magnesium carbonate 3.5, ferric citrate 6.0, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose, finely powered make 1,000 3) Vitamin mixture(g/kg diet): thiamine HCl 0.6, biotin 0.02, riboflavin 0.6, cyanocobalamine 0.001, pyridoxine HCl 0.7, retinyl acetate 0.8, nicotinic acid 3.0, DL-tocopherol 3.8, Ca-pantothenate 1.6, 7-dehydrocholesterol 0.0025, folic acid 0.2, methionine 0.005, sucrose, finely powered make 1,000

terase 20.5 U/l, cholesterol oxidase 10.7 U/l, sodium hydroxide 1.81 g/l 함유)을 효소시약 용해액(potassium phosphate mono-basic 13.6 g/l, phenol 1.88 g/l 함유)에 용해한 후 시료 20 μ l 에 조제한 효소시약 3.0 ml 을 첨가한 후 37°C 에서 5 분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 500nm 에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선에 준해 혈중 함량은 mg/dl로 표시하였다.

④ HDL-, LDL-cholesterol 함량 측정

HDL-cholesterol의 함량 측정은 Nakayama 등의 효소법^{26,27)}에 의하여 조제된 kit(AM 203-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 즉, 혈청 20 μ l에 침강시약(dextran sulfate 0.1%, magnesium chloride 0.1M 함유) 0.2 ml를 가하고 잘 혼합한 후 실온에서 10분간 방치하고 3000rpm 에서 10 분간 원심 분리하였다. 그리고 그 상정액을 0.1 ml 취하여 효소시약 3.0 ml와 잘 혼합하여 37°C에서 5분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 500nm에서 흡광도를 측정하였다. LDL-cholesterol의 함량측정은 Mainard등의 효소법에 준하여 kit시약을 이용하여 측정하였으며, 표준 검량선에 준해 그 함량을 mg/dl로 표시하였다.

⑤ 혈중 지질과산화물의 함량 측정

Yagi 등의 방법²⁸⁾에 따라 혈청 20 μ l에 1/12N H₂SO₄ 4.0 ml를 가하여 혼합하고 10% phosphotungstic acid 0.5 ml를 가하여 실온에서 5분간 방치한 후 원심분리하여 침전물인 혈청단백질만 취해서 다시 1/12N H₂SO₄ 2.0 ml와 10% phosphotungstic acid 0.3 ml를 가하여 원심 분리하였다. 침전물만을 취하여 증류수 4.0 ml와 0.67% thiobarbituric acid와 acetic acid를 1:1로 혼합한 용액을 1.0 ml를

가하고 95°C에서 60분간 반응시켜 실온에서 냉각 후 n-BuOH을 5.0 ml를 첨가하여 3000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 생성된 홍색의 n-BuOH을 취해 spectrofluorometer를 사용하여(Ex : 515nm, Em : 553nm) 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로 tetraethoxy propane 0.5 nmole을 같은 방법으로 반응시켜 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 혈청 lipid peroxide 함량을 산출하였다.

Serum lipid peroxide = (sample의 흡광도/표준용액의 흡광도)×25(nmole/ml serum)

⑥ 혈중 hydroxyl radical 함량 측정

Kobatake 등의 방법²⁹⁾에 따라 혈청 34.8 μ l 에 0.54M NaCl, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 10mM NaN₃, 7mM deoxyribose, 5 mM ferrous ammonium sulfate 및 증류수로서 333.3 μ l 가 되도록 첨가하여 vortex에서 잘 혼합하여 37°C 에서 15 분간 정치한다. 혈청 67 μ l 를 취하고 여기에 8.1% sodium dodecyl sulfate 75 μ l, 20% acetic acid 500 μ l 및 재증류수 25 μ l를 넣어 혼합한 다음, 여기에 다시 1.2% thiobarbituric acid 333 μ l 를 가하여 water bath (100°C)에서 30 분간 가열한 후 실온에서 냉각한 다음 700×g 에서 5 분간 원심분리하여 얻은 상층액을 파장 532nm 에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 의하여 hydroxyl radical (nmole / mg protein)의 함량을 정량하였다.

⑦ 혈중 superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

Oyanagui의 방법³⁰⁾에 따라 정량하였다. 혈청을 potassium phosphate buffer로써 100배 희석하여 그 중의 100 μ l를 시험관에 넣고 여기에 증류수 500 μ l, 시약 A (3 mM hy-

droxylamine / 3 mM hypoxanthine) 200 μ l 및 시약 B[7.5 mU/ml xanthine oxidase(XO) with 0.1 mM EDTA-2Na] 200 μ l를 넣고 vortex에서 잘 혼합한 다음, 37°C water bath에서 40 분간 정치한다. 반응액에 시약 C (300 mg of sulfanilic acid/5.0 mg N-1-naphthyl-ethylenediamine in 500 ml of 16.7% acetic acid) 2.0 ml 를 넣어 잘 혼합하여 실온에서 20분 동안 정치한 다음 550nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 준하여 혈청 중의 superoxide dismutase 활성을 측정하였다. Cytochrome c의 환원을 50% 억제하는 양을 SOD의 1 unit로 정의 하였다.

7) 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 그 유의성을 나타내었다.

Ⅲ. 成 績

1. *In vitro*

1. 세포 독성 시험 (MTT assay)

防風通聖散加味方 추출물이 3T3-L1 전구 지방세포의 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 防風通聖散加味方 처리농도의 증가에 따라 inhibition 정도도 증가하였으나 그 정도는 미미하였고, 최고 농도인 200 μ g/ml에서도 저농도 cisplatin에 의한 세포독성보다 매우 낮았다(Fig. 1).

2. 세포 성장 저해 실험 (Trypan blue assay)

Trypan blue assay를 통해 防風通聖散加味方 투여가 3T3-L1 전구지방세포의 성장에 미치는 영향을 살펴본 결과, 대조군에 비해 防風通聖散加味方을 투여한 군에서 농도 의존

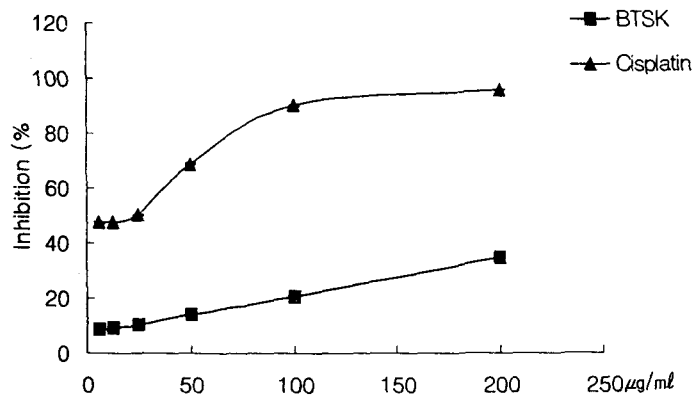


Fig. 1 Cytotoxic activity of BTSK on 3T3-L1 preadipocyte cell growth *in vitro*. Cells treated of 48h with various concentrations of BTSK were analyzed for growth inhibition by MTT assay.

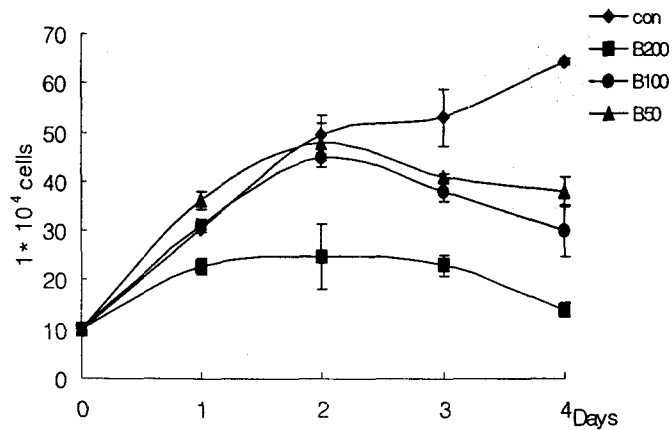


Fig. 2 Effect of BTSK on cell growth of 3T3-L1 preadipocyte cells. The cells were treated with 50, 100, 200 µg/ml BTSK under the experimental conditions described in Materials and Methods. At the indicated times, the viable cell number were determined by trypan blue dye exclusion.

적으로 3T3-L1의 성장을 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

3. 지방세포분화 억제 효과

3T3-L1 전구지방세포의 Oil Red O 염색시 대조군의 경우 지방세포로의 분화를 촉진시켜

지방구를 많이 생성한 것을 볼 수 있으나 防風通聖散加味方을 첨가한 경우 첨가시 농도 의존적으로 지방구생성이 감소되고, 지방세포로의 분화가 억제된 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3, 4).

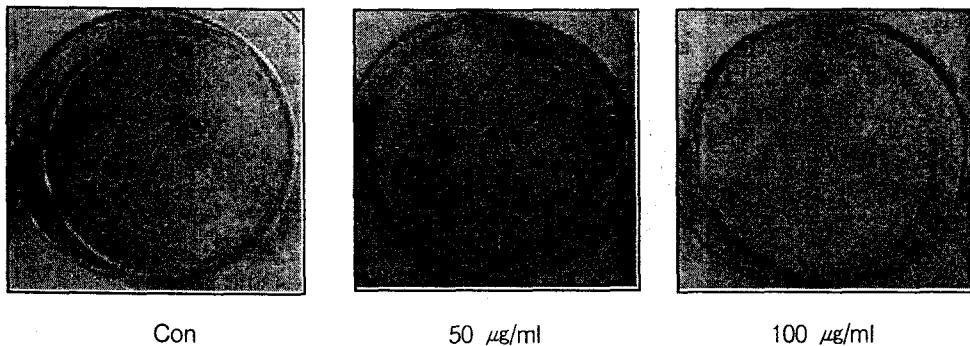


Fig. 3 Oil Red O staining of lipid droplets.

Following the hormonal induction of differentiation, 3T3-L1 cells were treated for eight days. The cells were fixed with 10% formalin and then stained with Oil Red O.

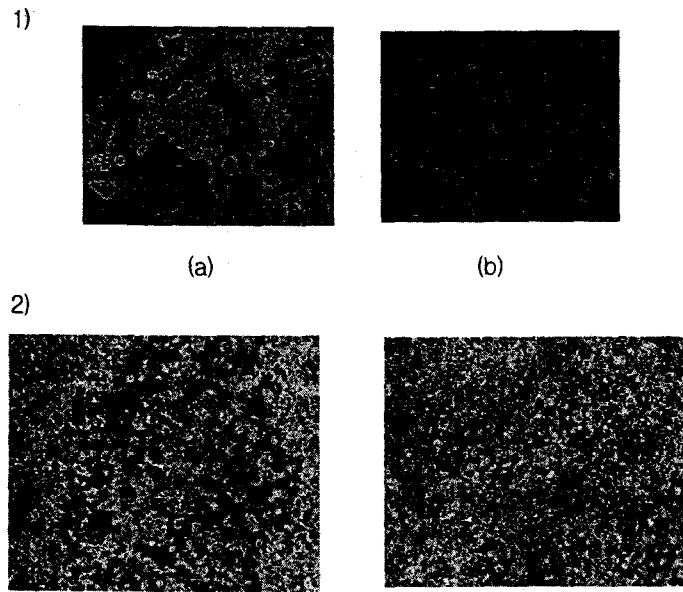


Fig. 4 Examination of adipocyte differentiation influenced by BTSK (a) No additive; (b) 200 µg/ml BTSK

- 1) Morphological change under reverse microscopy (x400)
- 2) Oil Red O staining. Differentiated adipocytes with accumulation of round-shaped fat vesicles can be distinguished from the undifferentiated cells by either morphology or staining.

4. 세포내 triglyceride 측정
 3T3-L1 전구지방세포에 防風通聖散加味 方을 농도별로 첨가하였을 때, 세포내 축적량 을 살펴보았다. 그 결과 防風通聖散加味 方을 투여한 군의 축적량은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

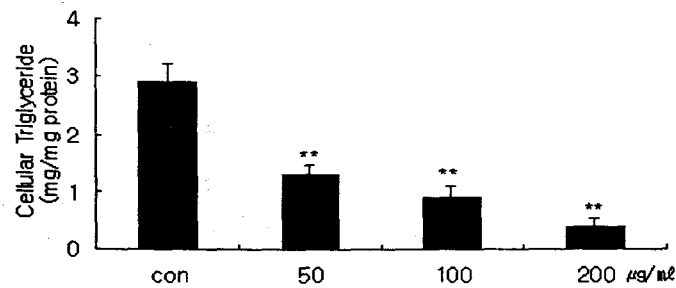


Fig. 5 Effect of BTSK on TG contents. Following the hormonal induction of differentiation, 3T3-L1 cells were treated for 8 days with BTSK at the indicated concentrations. ** P < 0.01 versus control/BTSK. Data analyzed by student's *t* test and reported as means ± S.D.(n=3)

5. Western Blot assay 및 RT-PCR

지방세포의 분화과정에는 많은 외부자극과 복잡한 유전자 발현 조절과정을 통해 일어나므로 防風通聖散加味方이 어떤 경로를 통하여 분화를 억제 하는지 살펴보았다. 분화에 있어 가장 중요한 전사인자중 하나인 C/EBP α , β

protein 의 발현 정도는 防風通聖散加味方을 처리하였을 때 현저히 감소함을 관찰하였다. 또한 C/EBP α 의 mRNA level도 현저히 감소함을 확인하였다. C/EBP는 mPPAR γ 2 gene promotor를 활성화 시키는 것으로 알려져 있으므로 PPAR γ 의 발현정도를 살펴본 결과

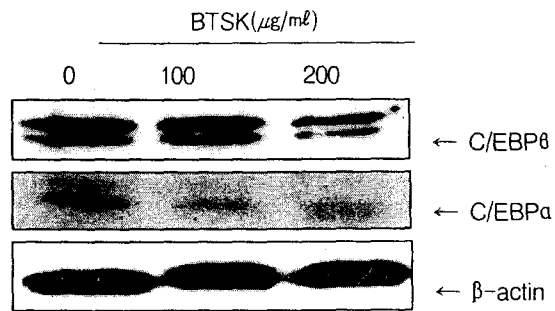


Fig. 6 Effects of BTSK on C/EBP protein expression during the intermediate stage of adipocyte differentiation.

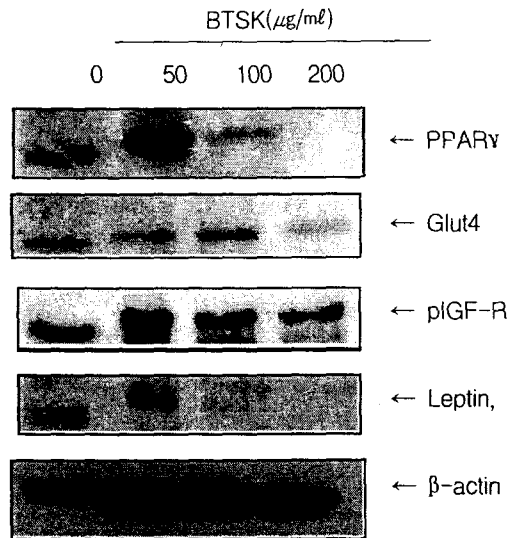


Fig. 7 Effects of BTSK on protein expression during the terminal stage of adipocyte differentiation. 3T3-L1 cells were treated with BTSK at the indicated concentrations for 5 days. After treatment whole cell proteins were separated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, and then blotted with anti-PPAR γ , Leptin, pIGF-R. The amount of β -actin was measured as an house keeping gene.

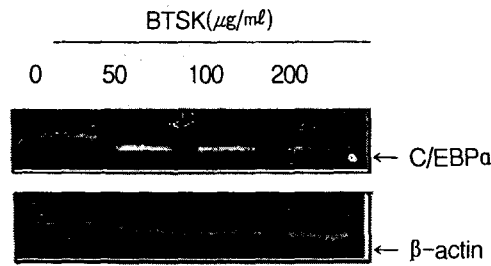


Fig. 8 Effects of BTSK on mRNA expression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α by RT-PCR analysis. Quantification of mRNA levels for C/EBP α , PPAR γ normalized against β -actin levels.

protein level 수준에서 control 에 비해 현저히 감소시켰다. 분화된 세포의 marker인 Glut 4와 leptin secretion을 살펴본 결과 Glut4의 세포막으로의 translocation은 어느 정도 억제시키는 경향을 보였고 leptin 발현은 防風通聖散加味方 처리시 농도 의존적으로 감소됨을 보였다. 그러나 인산화된 IGF-1R의 발현에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 6, 7, 8).

2. In vivo

1) Poloxamer-407로 유발된 고지혈증에 대한 효과

Poloxamer-407 투여하였을때 혈청 triglyceride 농도는 정상군에 비해 현저히 증가 되었다. 그러나 防風通聖散加味方을 투여한 군에 있어서는 유의한 감소를 보였으며, 그 효과는 농도 의존적이었다. Total cholesterol 농도는 고지혈증 유도군에 비해 防風通聖散加味方 처리군에서 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 보였고 200 mg/kg 처리군에 있어 15% 정도의 유의한 감소를 보였다(Table 3).

Table 3. Effect of BTSK on the serum lipid levels in poloxamer-407 treated rat.

Treatment	Dose (mg/kg)	Triglyceride	T-cholesterol
		mg/dl	
Normal		94.7±11.6 ^c	66.8±9.27 ^c
Poloxamer-407		1407.3±160.9 ^a	810.6±87.9 ^a
BTSK I	100	984.7±69.8 ^b	753.9±60.3 ^{ab}
BTSK II	200	942.7±61.2 ^b	690.8±54.8 ^b

Rats were orally administered BTSK daily for consecutive four weeks before poloxamer-407 induced hyperlipidemic state. The rats were sacrificed 24 hrs later for poloxamer-407 treated. Values are represent mean \pm S.D.(n=9). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

2) Triton WR-1339로 유발된 고지혈증에 대한 효과

Triton WR-1339 투여하였을때 혈청 tri-glyceride 농도는 防風通聖散加味方 추출물을 투여한 군 중 200 mg/kg의 농도로 처리한 군에서 통계적으로 유의한감소를 보였으며, Total cholesterol농도는 고지혈증 유도군에 비해 防風通聖散加味方을 투여한 군에서 약간의 감소경향을 보였지만 유의하지는 않았다 (Table 4).

3) 식이성 비만유도 흰쥐에 대한 防風通聖散加味方의 효과

(1) 식이성 비만유도 흰쥐의 체중에 대한 防風通聖散加味方의 효과

식이성 고지혈증이 유발된 쥐에 있어 최종 몸무게는 340.3 g으로 처음의 210.3에서 130 g의 증가를 보인 반면 防風通聖散加味方을 식이로 같이 투여한 군에서는 106 g의 증가를 보여 유의한 감소를 보였다. 반면 일별 체중증가는 약간의 감소만 보여 防風通聖散加味方 투여에 의한 통계적인 차이를 보이지는 않았다 (Table 5).

Table 4. Effect of BTSK on the serum lipid levels in Triton WR-1339 treated rat.

Treatment	Dose (mg/kg)	Triglyceride	T-cholesterol
		mg/dl	
Normal		99.2±20.7 ^d	69.8±10.4 ^b
Triton WR-1339		753.6±29.5 ^a	210.6±34.2 ^a
BTSK I	100	720.8±19.8 ^{a,b}	195.2±3.8 ^a
BTSK II	200	641.3±40.8 ^c	176.5±23.6 ^a

Rats were orally administered BTSK daily for consecutive four weeks before triton WR-1339 induced hyperlipidemic state. The rats were sacrificed 40 hrs later for triton WR-1339 treated. Values are represent mean ± S.D.(n=9). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 5. Body weight gain of rat fed experimental diet for six weeks.

Treatment	Dose (mg/kg)	Initial body weight	Final body weight	Body weight gain
		(g)	(g)	(g/day)
Normal		200.7±4.6 ^b	259.3±11.7 ^c	1.46±0.37 ^b
Control		210.3±5.4 ^a	340.3±18.1 ^a	2.88±0.30 ^a
BTSK I	100	211.6±5.3 ^a	318.0±19.0 ^{a,b}	2.59±0.30 ^a
BTSK II	200	207.8±3.2 ^{a,b}	313.6±15.2 ^{a,b}	2.37±0.41 ^a

Values are represent mean ± S.D.(n=9). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 6. Effect of BTSK on the adipose tissue mass of rats fed experimental diets.

Treatment	Dose (mg/kg)	Epididymal fat	Visceral fat	Peritoned fat
		g/100g body weight		
Normal		1.63±0.27 ^b	2.46±0.30 ^d	1.36±0.23 ^e
Control		2.17±0.31 ^a	4.03±0.37 ^a	2.47±0.18 ^a
BTSK I	100	2.00±0.15 ^{ab}	3.62±0.28 ^{ab}	2.12±0.17 ^{bc}
BTSK II	200	1.81±0.25 ^{ab}	3.07±0.29 ^c	1.76±0.15 ^d

Levels of tissue mass were calculated as a weight per unit body weight. Values are represent mean ± S.D.(n=9). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

(2) 식이성 비만유도 흰쥐의 지방조직 감량 효과

고지혈증 유도군에 비해 防風通聖散加味方 추출물을 식이로 함께 투여한 군이 epididymal fat 무게는 약간의 감소를 보였고, visceral fat 과 peritoned fat 무게는 모두 농도 의존적으로 감소시켰는데 특히 防風通聖散加味方 추출물을 200 mg/kg 투여한 BTSK II 군에서 28% 감소시켰으므로 통계적으로 유의하게 큰 차이를 보였다(Table 6).

(3) 식이성 비만유도 흰쥐의 혈청 지질 감소에 대한 효과

防風通聖散加味方 투여가 식이성 비만에 효

과가 있는지 확인하기 위해서, 흰쥐의 혈청 triglyceride, LDL-cholesterol, total cholesterol, HDL-cholesterol 에 영향을 주는지 관찰하였다. 식이로 투여했을때 혈중 triglyceride와 LDL-cholesterol의 수치는 방풍통성산가미방의 농도에 따라 감소하는 경향을 보였고 200 mg/kg 투여한 BTSK II 군에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Table 7). Total cholesterol 에 대한 HDL cholesterol의 비율은 고지혈증 유도군에 비해 모든군 에서 약간의 증가를 보였으며, 특히 200 mg/kg 투여군에서 유의한 증가를 보였다(Table 8).

Table 7. Effect of BTKS on the total cholesterol, HDL-cholesterol and HTR of experimental diet.

Treatment	Dose (mg/kg)	Total cholesterol	HDL-cholesterol	HTR
		mg/dl		
Normal		79.6±9.55 ^b	39.6±2.48 ^a	0.497±0.113 ^a
Control		93.2±10.6 ^{ab}	23.4±3.10 ^d	0.251±0.018 ^c
BTSK I	100	98.8±7.45 ^a	30.2±2.33 ^{bc}	0.306±0.017 ^{bc}
BTSK II	200	96.2±9.96 ^a	33.8±3.17 ^b	0.351±0.020 ^b

Values are represent mean ± S.D.(n=9). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 8. Effect of BTSK on the concentration of serum lipids in rats fed experimental diets.

Treatment	Dose (mg/kg)	Triglyceride	LDL-cholesterol
		mg/dl	
Normal		93.2±11.3 ^d	49.3±4.27 ^d
Control		263.5±31.5 ^a	110.6±18.5 ^a
BTSK I	100	234.7±19.8 ^{ab}	93.5±9.23 ^{abc}
BTSK II	200	189.2±15.9 ^c	77.2±8.25 ^c

Values are represent mean ± S.D.(n=9). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

(4) 식이성 비만유도 흰쥐의 혈중 지질 과산화물에 대한 효과

식이로 고지혈증을 유도한 군에 비해 시료 첨가 군이 혈중지질 과산화물의 생성을 약간 억제 시켰고 防風通聖散加味方 200 mg/kg로 투여한 BTSK II 군에서 통계적으로 유의하게 감소하였으며, superoxide dismutase 활성도 200mg/kg로 투여한 BTSK II군에서 유의한 차이를 보였다. Hydroxy radical 생성량은 약간의 감소 경향은 보였으나, BTSK II 군이 대조군에 비해 유의적 차이를 보인 이외에 군간의 유의한 차이는 없었다(Table 9).

IV. 考 察

비만은 선진국에서는 가장 흔한 영양질환으로 최근 우리나라에서도 생활수준의 향상과 경제성장과 더불어 식생활의 서구화로 비만의 유병율이 증가하고 있다³⁾. 1990년대 중반부터 5차례의 National Health and Nutrition Examination Surveys을 포함한 많은 연구에서 소아에서 비만 증가를 보고하고 있고³¹⁾, 그 체중 증가 추세는 매년 0.2kg/y를 보이고 있다³²⁾. 또한 우리나라 서울 시내 초, 중, 고교학생들을 대상으로 비만의 빈도를 조사한 연구에서

Table 9. Effect of BTSK on the blood lipid peroxide, hydroxy radical and superoxide dismutase activity in rat fed experimental diet

Treatment	Dose (mg/kg)	LPO	Hydroxy radical	SOD
		(MDA nmole/ml)	(nmol/mg protein)	(u/ml)
Normal		7.8±1.21 ^c	2.56±0.93 ^b	3.97±0.21 ^a
Control		13.4±2.31 ^a	6.50±1.12 ^a	2.17±0.30 ^c
BTSK I	100	11.8±1.28 ^{ab}	6.04±0.99 ^a	2.56±0.41 ^{bc}
BTSK II	200	9.4±1.63 ^{bc}	4.92±0.76 ^a	2.78±0.23 ^b

Values are represent mean ± S.D.(n=9). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

1984년 남아의 비만증 빈도가 9%에서 1992년에는 17.2%로 증가하였고, 여아에서는 7%에서 14.3%로 8년 만에 2배 이상 증가되었다³³⁾.

과다한 지방세포의 분화와 불균형적인 에너지의 과잉공급에 의해 유발되는 비만은 최근 WHO에서 단순한 외형상의 문제가 아니라 질병의 하나로 규정하였다. 비만아는 성인이 되어서 비로소 증상이 나타나는 퇴행성 심혈관계 질환이 이미 진행되고 있고¹⁾, 비만은 고혈압, 고지혈증, 동맥경화, 심장질환 및 인슐린 비 의존형 제2형 당뇨병 (Non insulin Dependent Diabetes Mellitus; NIDDM)과 같은 성인성 질환을 유도하는 가장 중요한 위험인자중 하나이다^{1,5,34)}. 또한 날씬함을 추구하는 사회에서 비만은 신체적인 건강문제뿐만 아니라 심리사회적인 문제를 동반할 수 있는데, 비만 아동들은 둔하고, 게으르고, 의지가 없는 등 외형에 관한 것 뿐만 아니라 행동 및 능력 면에서도 부정적인 편견을 받게 되어 열등감을 갖거나 심리적으로 위축될 수 있어^{6,7)} 보다 적극적인 치료가 필요하다.

韓醫學에서 肥滿에 대한 최초의 기록은 <黃帝內經>에 나타나 있는데 <素問 通評虛實論>에는 “肥貴人即膏粱之疾也”, <靈樞逆順肥瘦篇>에는 “年質壯大 氣血充盈 膚革堅固…肥人也…貪于取與”라고 하였다⁹⁾. 그 원인으로 <素問 奇病論>에서는 “人必數食甘味而多肥也 肥者 令人多熱”⁹⁾, 朱³⁵⁾ 등은 “肥人氣虛生寒 寒生濕 濕生痰 故肥多寒濕”, 張³⁶⁾은 “肥人多氣虛之證 然肥人多濕多滯 故之逆 多有不利”, 陳¹¹⁾은 “肥人多痰乃氣虛”, 江部³⁷⁾는 虛實로 분류하여 虛症은 주로 脾虛이며, 實症은 胃熱 肝鬱 水濕 痰飲 食積 血瘀라고 하였다. 그 治法으로 陳¹¹⁾은 補氣治痰, 王³⁸⁾은 健脾, 中醫症狀鑑別診斷學⁸⁾에서는 痰濕內蘊肥胖은 祛痰化濕, 氣虛肥胖은 補氣健

脾를, 江部³⁷⁾는 虛症은 實脾利水, 實證에는 燥濕化痰, 清熱利濕, 消積和胃, 疏肝解鬱, 活血祛瘀해야 한다고 하였다.

최근 비만 및 지질대사에 미치는 영향에 대한 많은 실험적 연구가 이루어지고 있는데, 복합처방을 이용한 연구에는 이 등³⁹⁾은 太陰調胃湯이 白鼠의 비만증 및 비만유도세포에 미치는 효과를 연구하였고, 김¹⁷⁾은 防風通聖散이 가토혈청중 지질함량에 미치는 영향, 이 등¹⁸⁾은 防風通聖散이 고혈압, 고지혈에 미치는 영향, 안¹⁹⁾ 등은 防風通聖散이 비만유도백서의 체중 및 지질대사에 미치는 영향 등을 연구하였다. 또한 단일 약물을 이용한 연구로 이 등⁴⁰⁾은 작약씨 추출물이 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화제와 지질과산화에 미치는 영향을 연구한바 있다.

防風通聖散은 金代 劉河間의 <宣明方論>에 최초로 기재되었고 一切 風熱과 飢飽 勞役의 內外諸邪에 손상되어 氣血이 鬱滯하고 表裏와 三焦가 俱實한 증을 치료할 목적으로 立方되었으며, 그 적응증은 一切 風熱燥濕 四時傷寒 內外諸邪 所傷 氣血佛鬱 氣壅滯 鬱陽胃燥熱 風熱佛鬱 濕熱內鬱 一切의 酒食毒 一切藥毒 雜病一體新久라 하였다¹³⁾. 최근의 여러 문헌에서 防風通聖散이 肥滿症으로서 實證인 中風體質者에게 활용된 예가 제시되고 있는데¹⁴⁻¹⁶⁾, 孟¹⁴⁾은 防風通聖散의 主治를 ‘肥滿한 卒中體質者로 늘 얼굴이 붉고 변비경향이며 脈은 매우 긴장이 좋으며 腹厚 또한 충실하고 緊滿한 자라 한 것 등이 그것이다.

海帶는 性味が 寒鹹滑하고, 清熱消痰, 軟堅散結, 利水消腫의 효능이 있어, 癭瘤와 瘰癧를 치료하고 더불어 水腫脹滿과 濕熱脚氣 등의 증에도 이용된다. 약리학적으로 그 주성분은 다당류성분인 alginic acid 32%와 lami-

narin, mannitol, 무기염 등을 함유하는데, 주 성분인 alginic acid는 3T3-L1 세포의 분화를 억제하고 지질강화 효과가 있다고 보고되어 있다⁴¹⁾.

이에 風熱燥 三者를 치료하는 總劑로서, 脾胃實熱 및 腎實熱이 원인이 되어 多食滯 肥健壯 消穀善飢 面色紅潤 口乾舌燥 大便秘結 舌紅苔薄黃 脈弦有力 등이 임상증상으로 나타나는 實證 비만치료에 응용되는 防風通聖散에 清熱消痰, 軟堅散結, 利水消腫의 효능으로 水腫脹滿을 치료하는 효능이 있는 海帶를 가하여, 이 처방이 3T3-L1 지방세포의 분화에 미치는 영향을 *in vitro* 실험을 통해 관찰하고, *in vivo* 실험을 통해 이 처방이 비만유발백서의 체중 및 혈중지질 구성 및 지질과산화물과 항산화효소활성에 미치는 영향을 관찰하였다.

지방세포는 자신의 성장과 발달을 스스로 조절할 뿐 아니라 체내 에너지 항상성 유지를 위한 다양한 기능을 수행하는데³⁴⁾, 지방조직의 성장은 크게 두가지로, 첫째 지방크기가 증가되는 것, 둘째 새로운 지방세포가 전구지방세포로부터 분화되는 것이다⁴²⁾. 태생기 mesodermal 기원인 stem cell에서 유래되는 전구지방세포, 근육 및 관절세포의 근원은 모두 같다. 이런 전구지방세포에서 형태학적으로나 생화학적으로 완벽히 성숙된 지방세포로 분화되는 과정에는 지방세포 유전자의 조절부위에 중요한 전사활성 인자가 활성화되어야 한다^{42,43)}. 이들 중 가장 잘 알려진 두가지는 C/EBP family, PPAR γ 이고, 이들은 상호작용으로 지방세포분화를 촉진시킨다⁴²⁻⁴⁴⁾.

In vitro 실험에서는 3T3-L1 전구지방세포를 배양하여 분화배지 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (MIX), 0.25 μ M dexamethasone, 10 μ g/ml insulin 이 함유된 DMEM

배지에 10-200 μ g/ml의 시료 (DMSO 0.01%미만 함유)를 첨가하여 8일동안 배양하여 분화를 현미경으로 확인하고, 防風通聖散加味方 (50, 100, 200 μ g/ml)을 첨가하여 처리한 경우에서의 분화 유도 또한 확인하였다. 防風通聖散加味方이 지방세포분화에 미치는 영향을 microscopy와 Oil Red-O 염색을 통해 관찰한 결과 모든 농도에서 3T3-L1 지방구 생성을 억제하는 것을 확인하였고, 이는 농도의존적이었다.

Triglyceride 축적도 대조군에 비해 防風通聖散加味方 처리군이 농도의존적으로 감소하였다. Triglyceride는 cholesterol과 더불어 지질대사이상을 검사하는데 유용한 지표로 우선적으로 선택되는 검사 중하나이며, 비만, 고지혈증, 지방간, 동맥경화 등의 성인병과 큰 관련성을 갖는다⁴⁵⁾. 이로 볼 때 防風通聖散加味方의 처리가 세포내 triglyceride 축적을 억제하여, 비만억제에 효과가 있음을 알수 있다.

또한 防風通聖散加味方이 어떤 경로를 통하여 지방세포 분화를 억제 하는지 살펴 보았다. 3T3-L1 전구지방세포주가 지방세포로 분화하는데는 많은 지방특이 유전자의 전사가 복합적으로 활성화되어야 하는데⁴²⁻⁴⁴⁾, 분화에 있어 가장 중요한 전사인자중 하나인 C/EBP α 및 β protein 의 발현 정도는 防風通聖散加味方을 처리하였을 때 현저히 감소하였고 C/EBP α 의 mRNA level도 현저히 감소하였다. C/EBP α 는 지방전구세포에서는 발현이 관찰되지는 않지만, 분화과정의 후반기에 발현이 촉진되어 지방세포 분화관련 유전자들의 발현을 조절한다. 즉 지방 특이 유전자조절부위의 전사조절부위를 활성화시키는 역할을 한다³⁴⁾. 특히 그중에서도 C/EBP는 mPPAR γ 2 gene promotor를 활성화 시키는 것으로 알려져 있는데 PPAR γ 의 발현정도는 protein level 수준에서 防風通聖散加味方 처리군이 대조군에

비해 현저히 감소되었다. 분화된 세포의 marker인 Glut4와 leptin 분비 살펴본 결과 Glut4의 세포막으로의 translocation은 어느 정도 억제시키는 경향을 보였고 leptin 발현은 防風通聖散加味方 처리시 농도의존적으로 현저히 감소하였다. 그러나 인산화된 IGF-1 수용체의 발현에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

In vitro 실험 결과를 종합하여 보면 防風通聖散加味方の 처리는 3T3-L1 전구지방세포가 지방세포로 분화하는 것을 억제한다는 것을 확인할 수 있었고, 그 기전은 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현 억제와 관련이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

In vivo 실험에서는 防風通聖散加味方이 식이성 비만유도 흰쥐의 체중, 지방조직의 비율, 혈청 지질 및 지질 과산화물 감소에 미치는 영향을 통해, 防風通聖散加味方이 비만에 대해 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

우선 예비연구로 Poloxamer-407과 Triton WR-1339로 각각 인위적인 고콜레스테롤혈증을 유발킨 경우에 防風通聖散加味方을 농도별로 처리한 군에서의 triglyceride 농도와 total cholesterol 농도 변화를 관찰하였다. Poloxamer-407 투여하여 고지혈증의 유발한 경우 防風通聖散加味方을 투여했을 때 triglyceride 및 total cholesterol 농도 모두 유의한 감소를 보였으며, 고농도의 防風通聖散加味方の 투여시에 감소 효과는 컸다. Triton WR-1339 투여시에는 혈청 triglyceride 농도는 防風通聖散加味方 200 mg/kg 처리한 고농도군에서 통계적으로 유의한 감소를 보였으며, total cholesterol 농도는 고지혈증 유도군에 비해 防風通聖散加味方 투여군에서 약간의 감소경향을 보였지만 유의적이지는 않았다. 인위적인 고콜레스테롤혈증을 유발하기 위한 방법으로 사용된 Triton WR-1339 Poloxamer-407

는 세포의 lipase 활성을 억제하여 혈액내 triglyceride 와 LDL을 증가시키고 high molecular weight Apo B, free 및 ester-bound cholesterol, phospholipid, fatty 농도를 증가시키며 또한 세포내 triglyceride 축적이 증가된다고 하였다⁴⁵⁻⁴⁷.

Triglyceride는 glycerol에 3분자의 지방산이 ester와 결합한 것으로 중성지방이라고도 부른다. chylomicron과 VLDL이라고 하는 lipoprotein의 주성분이고 생체의 에너지 저장과 운반에 관여한다⁴⁸. lipoprotein 대사과정을 파악하는데 있어 triglyceride는 cholesterol과 더불어 유용한 지표이므로 지질대사이상을 검사하는데 우선적으로 선택되는 검사이다⁴⁹.

Cholesterol은 세포막의 구성성분이며, 각종 steroid hormone을 비롯한 hormone 생산의 원료나 담즙산의 전구체로서 중요한 물질이다. 혈청 cholesterol 측정의 가장 큰 임상적인 의미는 고 cholesterol 혈증이 동맥경화증의 가장 좋은 위험신호가 된다는 것이며, 혈청 총 cholesterol과 관상동맥질환의 발생과는 상관성이 있기 때문에 중요시 되고 있다^{48,49}.

HDL(High Density Lipoprotein)은 말초조직에서는 분해되지 않는 cholesterol을 간으로 운반하는 cholesterol 역전송계를 담당하는 lipoprotein으로 동맥경화의 방어인자의 하나로 알려져 있다⁴⁸. 임상적으로 HDL-cholesterol의 변동은 허혈성 심장질환의 발생빈도와 역상관계가 있고, 당뇨병, 비만 등에서 낮아지고, 운동, 적당량의 알콜, 에스트로젠 등에 의해 상승하는 것으로 알려져 있다⁴⁹.

외인성 고지혈증을 유발시키는 방법으로 cornoil 및 beef tallow같은 유지를 대량 투여하여 장관에서의 지방흡수 억제 또는 lipoprotein lipase 활성에 기인하는 triglyceride 분해 촉진 효과의 검색에 사용되며 비교적 용이한

방법으로 알려져 있는데 본 연구에서도 beef tallow(牛脂)를 첨가한 식이시료를 6주간 사육하여 고지혈증을 유발하였다.

식이성 고지혈증이 유발된 쥐에서는 대조군보다 防風通聖散加味方을 식이로 함께 투여한 경우에서 유의하게 체중이 덜 증가하였고, 이 체중증가 억제효과도 농도 의존적이었다.

식이성 비만유도 흰쥐의 지방조직 감량 효과를 확인한 결과도, 防風通聖散加味方을 식이로 투여하였을 때 투여하지 않은 대조군에 비해 epididymal fat 무게는 약간의 감소를 보였고 visceral fat과 peritoned fat 무게는 모두 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 防風通聖散加味方 200 mg/kg 투여한 군에서는 28% 감소시킴으로서 통계적으로 유의하게 큰 차이를 보였다.

또한 防風通聖散加味方이 식이성 비만 흰쥐의 혈청 triglyceride, LDL-cholesterol, total cholesterol, HDL-cholesterol에 대해 영향을 주는지 관찰하였는데, 시료를 식이로 함께 투여했을 때 혈중 triglyceride와 LDL-cholesterol의 수치는 시료의 농도가 높을수록 감소하는 경향을 보였고 200 mg/kg 투여 시에 통계적으로 유의한 차이를 보였다. Total cholesterol 에 대한 HDL cholesterol의 비율은 고지혈증 유도군에 비해 모든군에서 약간의 증가를 보였고 이 또한 200 mg/kg의 농도로 투여한 고농도 투여군에서 유의한 증가를 보였다.

식이성 고지혈증 유발 쥐에서 防風通聖散加味方을 식이로 함께 투여한 경우, 체중증가를 억제하고 지방조직 구성비율을 감소시키는 효과가 있었는데 이는 지질대사의 개선과 관련이 있었으며, 다시 말해 防風通聖散加味方의 투여는 약물의 농도 의존적으로 지질대사를 개선하여 비만을 억제한다고 할 수 있다.

식이성 비만유도 흰쥐의 혈중 지질 과산화물에 대한 효과는 防風通聖散加味方 투여군에서 LDL 산화의 지표인 MDA 농도가 대조군에 비해 낮았고 이는 고농도처리군에서 통계적으로 유의하였으며, 유의성은 없었지만 hydroxy radical 생성량도 약간의 감소 경향을 보였다. 또한 항산화계 효소인 SOD 활성치는 防風通聖散加味方 투여군에서 높아지는 결과를 보였고 이는 고농도 처리군에서 유의하였다.

활성산소물질(Reactive oxygen species, ROS)는 세포의 노화나 흡연, 자외선 환경오염에 노출이 증가되고 특히 비만, 인슐린 저항성 등의 원인에 의해 그 생성속도가 증가된다고 알려져 있고, ROS에 대한 세포내 방어 기전은 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD) 등에 의해 이루어진다⁵⁰⁾. 본 연구에서 防風通聖散加味方의 투여가 SOD 활성을 높이는 효과를 가지고 있음을 확인하였고, 이는 防風通聖散加味方의 투여가 비만으로 인한 지질대사이상과 과산화물의 축적을 예방하고 치료하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

In vivo 실험의 결과를 종합해보면, 防風通聖散加味方의 투여는 식이성 고지혈증 유발 흰쥐의 혈액에서 Triglyceride, LDL-cholesterol를 모두 감소시키는 효과가 있었으며, HTR(HDL-cholesterol/Total-cholesterol)은 증가시켰고, 그것은 농도 의존적이었다. 또한 혈중 지질 과산화물을 감소시키고, SOD의 활성을 촉진시켰으며 hydroxy radical 생성량도 감소시켰다.

V. 結 論

防風通聖散加味方이 *In vitro*에서 3T3-L1 전구지방세포의 분화에 대해 미치는 영향과 C/EBP, PPAR γ 의 발현에 미치는 영향, 그리고 *In vivo*에서 비만 유도 흰쥐의 체중, 혈액학적 변화 및 지질과산화물, 항산화효소계인 SOD활성에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 防風通聖散加味方 투여는 3T3-L1 전구 지방세포의 지방세포로의 분화를 억제하였고, 지방구 생성도 감소시켰다.
2. 防風通聖散加味方 투여의 지방세포 분화 억제는 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현 억제에 유의하였다.
3. Poloxamer-407을 투여하였을 때 대조군에 비해 防風通聖散加味方을 식이에 함께 투여한 경우 혈청 triglyceride 및 Total Cholesterol은 농도의존적으로 유의하게 감소하였다.
4. Triton WR-1339을 투여한 경우 투여하였을 때 대조군에 비해 防風通聖散加味方을 식이에 함께 투여한 경우 혈청 triglyceride 농도는, 防風通聖散加味方 고농도 투여군에서 유의한 감소를 보였으며, Total cholesterol 농도는 감소경향만을 보였다.
5. 防風通聖散加味方의 투여는 식이성 고지혈증 유발 흰쥐의 체중증가량의 유의성 있는 감소 및 지방조직 감량효과가 있었으며, 혈액에서 Triglyceride, LDL-cholesterol을 감소시키는 효과가 있었고, HDL-cholesterol 및 HTR(HDL-cholesterol/Total-cholesterol)를 증가시켰다.

6. 防風通聖散加味方의 투여는 식이성 고지혈증 유발 흰쥐의 혈중 지질 과산화물을 감소시키고, SOD의 활성을 촉진시켰으며, hydroxy radical 생성량도 감소시켰다.

參考文獻

1. 대한비만학회. 임상비만학. 1판. 서울:고려의학. 1995:171,191,205.
2. 과학백과사전 종합출판사. 동의학사전. 서울:도서출판까지. 1998:414.
3. 의학교육연수원. 가정의학. 개정판. 서울:서울대학교출판부. 2001:1013.
4. Popkins BM, Doak CM. The obesity prevalence is a worldwide phenomenon. Nutrition Reviews. 1998;56:106-14.
5. Aviva M, Jennifer S, Eugenie H et al. The Disease Burden Associated With Overweight and Obesity. JAMA. 1999; 282:1523-29.
6. WHO. Preventing and managing the Global epidemic of obesity. Geneva: Report of WHO consultation on obesity. 1997:60-1.
7. 박혜순. 소아 및 청소년 비만의 정신역동. 대한비만학회지. 2000;9(3):55-9.
8. 중의연구원. 중의증상감별진단학. 북경:인민위생출판사. 1987:43.
9. 마원대, 장은암. 황제내경소문. 서울:정보사. 1975:224-330.
10. 이천. 편주의학입문. 서울:대성문화사. 1984: 108.

11. 진사택. 석실비록. 서울:행림서원. 1982:76.
12. 이동원. 동원의서 십중 비위론. 서울:대성문화사. 1983:70.
13. 유완소. 선명방론 권십. 서울:녹강출판사. 1988:768.
14. 맹화섭. 동의처방대전. 서울:수문사. 1969:225.
15. 안훈영. 한방처방과 임상응용. 태북:태북의학원. 1999:61.
16. 조기호. 한방처방의 동서의학적 해석방법론. 서울:고려의학. 1999:218.
17. 김수익. 방풍통성산이 가토혈청중 지질함량에 미치는 영향. 경희약대논문집. 1977:5:63-8.
18. 이남훈, 신길선, 조기호, 김영석, 배형섭, 이경섭. 방풍통성산이 고혈압 고지혈에 미치는 영향. 경희의학. 1991;7(1):101-9.
19. 안정미, 김성수, 신현대. 방풍통성산이 비만유도백서의 체중 및 지질대사에 미치는 영향. 경희의학. 1993;9(1):69-82.
20. 신민교. 임상본초학. 5판. 서울:영림사. 1997:748-9.
21. 한의학대학본초학편집위원회. 본초학. 서울:영림사. 2004:510-1.
22. Wout ZG, Pec EA, Maggiore JA, Williams RH, Palicharla P, Johnston TP. Poloxamer 407-mediated changes in plasma cholesterol and triglycerides following intraperitoneal injection to rats. Parenter Sci Technol. 1992;46(6):192-200.
23. Kusama H, Nishiyama M, Ikeda S. Pharmacological investigation of bezafibrate, a hypolipidemic agent (1). Effects of bezafibrate on normal and experimental hyperlipidemia in rats. Nippon Yakurigaku Zasshi. 1988;92(3):175-80.
24. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. Clin Chem. 1983;29:538.
25. Richmond W. Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow analysis. Clin Chem. 1976;22:1579.
26. Noma A, Nakayama KN, Kota M, Okabe H. Simultaneous determination of serum cholesterol in high and low density lipoprotein with use of heparin, Ca^{2+} and an anion exchange resin. Clin Chem. 1978;24:1504.
27. Noma A, Okabe H, Nakayama KN, Ueno Y, Shinohara H. Improved method for simultaneous determination of cholesterol in high-and low-density lipoproteins. Clin Chem. 1979;25:1480-1.
28. Yagi K. Lipid peroxides and human disease. Chemistry and Physics of Lipids. 1987;45:337.
29. Kobatake Y, Saito M, Kuroda K, Kobayashi S, Innami S. Influence of fish consumption on serum lipid and lipid peroxide concentrations in middle aged subjects. J Japan Soc Nutr & Food Sci. 1987;40:103.
30. Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of Kit for superoxide dismutase activity. Anal Biochem. 1984;42:290.