

3T3-L1 cell에서 방풍통성산의 지방세포 분화 억제 효과 연구

차민경, 이진용, 김덕곤, 이경태*

경희대학교 한의과대학 소아과학 교실, *경희대학교 약학대학 약품생화학 교실

Effects of *Bangpoongtongsungsan* on Adipose Tissue and Hyperlipidemia of 3T3-L1 Induced Rats

Cha Min Kyung, Lee Jin Yong, Kim Deog Gon, Lee Kyung Tae*

Department of Pediatrics, college of Oriental Medicine, Kyunghee University

*Department of Biochemistry, College of Pharmacy, Kyunghee University

Objective : This experimental study was designed to determine the effects of BPT on obesity in vivo and in vitro.

Methods : in vitro , BPTn extracts of various concentration(50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$) were added in 3T3-L1 cell. Adipocyte differentiation was measured by Oil Red O staining and Morphological examination. The expression of C/EBP α and PPAR γ receptor was measured by western blot assay and RT-PCR. in vivo, Rats were orally administered BPT daily for consecutive four weeks before poloxamer-407 induced hyperlipidemic state. The rats were sacrificed 24 hrs later for poloxamer-407 treated and then serum triglyceride, total cholesterol were measured ; Rats were orally administered BPT daily for consecutive four weeks before triton WR-1339 induced hyperlipidemic state. The rats were sacrificed 40 hrs later for triton WR-1339 treated and then serum triglyceride, total cholesterol were measured ; Rats with obesity were induced by the high fat-diet for six weeks and then serum triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, hydroxy radical, superoxide dismutase activity were measured.

Results : In vitro, The 3T3-L1 cells' differentiation was significantly decreased by BPT. The expression of C/EBP α and C/EBP β was decreased by BPT. In vivo, BPT significantly reduced serum triglyceride, total cholesterol contents in poloxamer-407 treated rat. BPT significantly reduced serum triglyceride contents in Triton WR-1339 treated rat. Total cholesterol also reduced but did not show a significant change. BPT 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. BPT reduced blood lipid peroxide, hydroxy radical and increased superoxide dismutase(SOD) activity.

Key words : BPT, obesity, hyperlipidemia, adipocyte differentiation, C/EBP(CCAAT/enhancer binding protein)

접 수 : 2006년 7월 22일, 채택일자 : 2006년 8월 19일
교신저자 : 차민경, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방병원 한방소아과
(Tel. 019-9143-5939, E-mail: jivaka77@hotmail.com)

I. 緒 論

비만이란 잉여 에너지가 체내의 지방조직 내에 축적되어 대사장애를 유발하는 현상으로, 남자의 경우 체지방량이 체중의 25% 이상, 여자의 경우 30%이상인 경우로 정의되고 있고^{1,2)} 소아의 경우 남자는 15%이상, 여자는 20%이상 일 때 비만으로 간주한다³⁾.

비만한 사람은 질병에 대한 이환율이 높고 평균 여명도 감소된다. 비만과 수명 단축과의 연관성은 이미 히포크라테스 시기부터 밝혀진 바 있으며 비만이 고혈압, 당뇨병, 심혈관계 질환 등 만성 질환의 발생과 관련이 있다는 사실은 잘 알려져 있다^{4,5)}.

이러한 합병증의 문제 때문에 비만은 만성적인 질환으로 인식해야 하며, 현대 사회에서는 심각한 사회문제가 되기도 한다.⁶⁾ 소아 비만은 신체적인 건강문제뿐만 아니라 심리사회적인 문제를 동반할 수 있으므로^{1,7-9)} 보다 적극적인 치료가 필요하며, 이를 위해서는 비만의 기전에 대한 정확한 이해를 위한 연구가 필요하다.

防風通聖散에 대한 최초의 기록은 金代 劉河間의 <宣明方論>에 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 치료한다고 하였다¹⁵⁾.

오늘날에는 임상에서 肥滿症으로서 實證인 中風體質者에게 활용되고 있다¹⁷⁾.

아울러 肥滿 및 肥滿과 관련한 합병증에 대한 防風通聖散의 效能을 직간접적으로 확인하기 위한 실험적 연구도 여러 차례 시행되었으며, 안 등¹⁸⁾의 防風通聖散이 비만유도백서의 체중 및 지질대사에 미치는 영향, 김¹⁹⁾의 防風通聖散이 가토혈청 중 지질함량에 미치는 영향, 이 등²⁰⁾의 防風通聖散이 고혈압, 고지혈에 미치는 영향, 나²¹⁾의 심혈관계 및 신경계에 미치는 영향 등이 보고되었다. 그러나 기존의 防風通聖散과 관련한 연구들은 주로 지질함량 등에 미치는 효과 등의 비만 해소 정도의 결과만을 확인할 뿐이었으며, 한방처방이 지방세포분화과정 중의 유전자 발현에 미치는 영향, 지질 과산화대사물의 축적과 항산화효소활성 등의 세포 수준에서 비만에 미칠 수 있는 영향에 대해서는 연구된 바가 거의 없었다.

따라서 저자는 *in vitro* 실험을 통해 防風通聖散이 3T3-L1 전구지방세포주의 분화를 억제하는 효능이 있음을 확인하였고, 아울러 *in vivo* 실험을 통해 비만유도백서의 체중 및 혈중 지질과 지질과산화물생성을 억제하고 항산화효소활성을 촉진시킨다는 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. *In vitro*

1) 약물

본 실험에 사용한 防風通聖散의 한 첩 분량의 구성과 비율은 다음과 같고, 경희대학교 한의과대학 부속한방병원에서 구입하여 사용하였다(Table 1).

2) 검액의 조제

각 건조 시료 분량의 10배의 정제수를 넣고 100°C에서 4시간 동안 전탕하며 방풍통성산 추출물(BPT)을 얻은 뒤 증류농축장치(rotary evaporator)에서 감압 농축하고 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

3) 세포 배양

3T3-L1 세포 주는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 사용하였으며, 10% FBS, 100units/ml peni-

cline, 100µg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)을 함유한 DMEM 배지에서 5% CO₂를 함유하며 37°C를 유지하는 인큐베이터(incubator)에서 배양하였다.

4) 분화유도

2×10⁴cells/ml 의 3T3-L1 세포를 2일 동안 배양하여 plate 바닥에 꼭 찬 후 0.5mm 1-methyl-3-isobutylxanthine (MIX), 0.25µM dexamethasone, 10µg/ml insulin 이 함유된 DMEM 배지에 10-200µg/ml의 시료(DMSO 0.01%미만 함유)를 첨가하여 8일 동안 배양하였다.

5) 세포 독성 시험 (MTT assay)

세포를 2×10⁵cells/ml 농도로 조절한 후 0.1ml를 96 well plate에 이식하고 4시간 후 배지에 희석시킨 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 배양하였다. 각 시료는 DMSO에 용해시켜 사용하였으며 최종 DMSO의 농도가 0.01%를 넘지 않도록 하였다. 5mg/ml

Table 1. Prescription of *Bangpoongtongsungsan*

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
	total amount	63

농도로 PBS에 용해시킨 MTT용액 50 μ l를 첨가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후 상등 액을 제거하고 DMSO 100 μ l에 녹인 뒤 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 세포 성장 저해 실험 (Trypan blue assay)

세포 성장 저해는 trypan blue exclusion 실험법에 따랐다. 세포 용액(cell solution)을 제조하고 세포를 충분히 결정시킨 후 세포 용액(cell solution)과 trypan blue 용액을 1:1로 혼합하고 약 5분경과 후 혈구계산기(hemocytometer)로 죽은 세포와 전체 세포수를 측정하였다.

7) 세포내 중성지방(triglyceride) 측정

시료를 처리하여 배양한 세포를 PBS로 washing하여 Teflon policeman으로 떼어낸 후 extraction buffer (50mM Tris (pH 7.5), 1mM EDTA, and 1mM mercaptoethanol)로 현탁시켜 homogenization 하였다. 이중 chloroform-methanol (2:1, v/v) 로 중성지방(triglyceride)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 soln. 60분 염색시킨다. 60% propylene glycol과 증류수(Distilled Water)로 완전세척한 후 건조시켜 이소프로판(isopropanol)로 염료(dye)를 추출하여 510nm에서 광학밀도(optical density) 측정하였다.

9) Western blotting

시료를 처리한 세포들을 모아 원심분리(2000rpm, 4min)후 상등 액을 제거하고 PBS로 washing한 후 protease inhibitor cocktail을 함유한 ELB buffer (50mM HEPES pH 7.0, 250mM NaCl,

5mM 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. 상등 액을 Bradford 방법으로 정량하고 sample buffer 처리하여 SDS-PAGE를 이용하여 세포내 단백질을 분리하였다. 분리한 gel을 semi-dry system으로 100mA에서 1시간동안 nitrocellulose membrane에 transfer시킨 후 5% skim milk 용액에 하룻밤 blocking한 다음 4시간동안 다양한 primary antibody를 반응시키고 washing후 HRP(horseradish peroxidase)-conjugate된 secondary antibody를 1시간 동안 반응시킨 후 암실에서 ECL방법으로 X-ray film에 detection 하였다.

10) RT-PCR

시료를 처리한 세포들을 PBS로 washing한 후 Trizol reagent를 이용하여 얻어진 RNA에 MuLV reverse-transcriptase, 1mM dNTP, and 0.5 μ g을 넣어 cDNA를 만들었다. 사용된 primer는 다음과 같다. C/EBP α , (GenBankTM accession number NM007678), forward 5-AGG TGCTGGAGTTGACCAGT-3 and reverse 5-AGCCTAGAGATCCAGCGAC-3; PPAR γ , (GenBankTM accession number NM011146), forward 5-GGTGAAACTCTGGGAGATTC-3, reverse 5-CAACCATTTGGGTCAGCTCTT-3; leptin, (GenBankTM accession number NM008493), forward 5-CCAAAACCCTCATCAAGACC-3, reverse 5-CTCAAAGCCACCACCTCTGT-3; 이때 C/EBP α 와 PPAR γ 은 94°C, 1 min, 54°C, 1min, 72°C, 30sec, 25cycles 로 증폭시키고 Leptin과 β -actin은 94°C, 1min, 94°C, 1min, 57°C, 1min, 33cycles 로 증폭시켰다. 생성된

PCR products를 2.0% agarose gel에 전개시켜 UV detector로 확인하였다.

2. In vivo

1) 재료

(1) 실험동물

실험동물은 효창 사이언스로부터 분양받아 동물사의 일정한 조건(온도 : 20-26℃, 습도 : 40-60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)하에서 2주가량 충분하게 적응시켜 사육한 체중 130-150g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였고, 실험 시간 전 24시간 동안 물만 주고 절식하였다. 이때 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다.

(2) 실험약물

본 실험에 사용한 防風通聖散의 한 첩당 구성과 비율은 상기한 Table 1에서와 같다.

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.

3) 실험군의 분류 및 檢液의 投與

일반 식이와 물을 먹인 군을 정상군(Normal), 우지(beef tallow)를 첨가한 식이를 먹이고 防風通聖散 시료를 식이에 첨가하여 투여하지 않은 군을 대조군(Control)로 하고, 防風通聖散을 우지(beef tallow)를 첨가한 식이에 첨가하여 투여한 군을 BPT 군으로 하였는데, 사람의 복용량을 기준으로 계산하여 저 농도인 100mg/kg을 투여한 군을 BPT I, 고농도인 200mg/kg을

투여한 군을 BPT II라 하였다.

4) Poloxamer-407로 고지혈증의 유발

Wout등의 방법²²⁾에 따라 시료의 마지막 투여 일에 poloxamer-407(300mg/kg)을 ice bath에서 생리식염수에 용해하여 복강 내에 투여하고 24시간 후에 처사하였다.

5) Triton WR-1339로 고지혈증의 유발

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

6) 식이성 고지혈증의 유발

식이성 고지혈증의 유발은 우지(beef tallow)를 첨가한 식이시료를 6주간 사육하여 고지혈증을 유발하였다.

(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

A. 採血 및 血清分離

시료의 투입이 끝난 실험동물을 CO₂로 가법게 마취시키고 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하여 혈액의 일부는 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 지질함량의 측정, lipid peroxide, hydroxyl radical 함량 및 활성산소를 제거시키는 효소(Superoxide Dismutase) 활성의 측정에 사용하였다.

B. 중성지방(triglyceride)의 측정

McGowan 등의 방법²⁴⁾에 준하여 조제된 kit (AM 157S-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 즉, 빙냉상에서 효소시액(lipoprotein lipase 10800U, glycerol kinase 5.4U, peroxidase 135000U, L- α -glycero phosphooxidase 160U 함유)을 효소 시약 용해액[N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-amino-methane sulfonic acid 0.427g/dl 함유]에 용해한 후 시료 20 μ l에 조제한 효소시액 3.0ml 을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C 에서 10 분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 550nm 에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량 선에 준해 혈중 함량은 mg/dl로 표시하였다.

C. 총 콜레스테롤(Total cholesterol) 측정

Richmond 등의 효소법²⁵⁾에 의하여 조제된 kit(AM 202-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 즉, 빙냉상에서 효소시액(cholesterol esterase 20.5U/l, cholesterol oxidase 10.7U/l, sodium hydroxide 1.81g/l 함유)을 효소시약 용해액(potassium phosphate monobasic 13.6g/l, phenol 1.88g/l 함유)에 용해한 후 시료 20 μ l 에 조제한 효소시액 3.0ml 을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C 에서 5분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량 선에 준해 혈중 함량은 mg/dl로 표시하였다.

D. HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 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) 0.2ml를 가하고 잘 혼합한 후 실온에서 10분간 방치하고 3000rpm 에서 10 분간 원심 분리하였다. 그리고 그 상정 액을 0.1ml 취하여 효소시액 3.0ml와 잘 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation하여 시약 blank를 대

조로 파장 500nm에서 흡광도를 측정하였다. LDL-cholesterol의 함량측정은 Mainard등의 효소 법에 준하여 kit시약을 이용하여 측정하였으며, 표준 검량 선에 준해 그 함량을 mg/dl로 표시하였다.

E. 혈중 지질과산화물의 측정

Yagi 등의 방법²⁸⁾에 따라 혈청 20 μ l에 1/12N H₂SO₄ 4.0ml를 가하여 혼합하고 10% phosphotungstic acid 0.5ml를 가하여 실온에서 5분간 방치한 후 원심 분리하여 침전물인 혈청 단백질만 취해서 다시 1/12N H₂SO₄ 2.0ml와 10% phosphotungstic acid 0.3ml를 가하여 원심 분리하였다. 침전물만을 취하여 증류수 4.0 ml와 0.67% thiobarbituric acid와 acetic acid를 1:1로 혼합한 용액을 1.0ml를 가하고 95 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켜 실온에서 냉각 후 n-BuOH을 5.0ml를 첨가하여 3000rpm에서 15분간 원심분리한 후 생성된 홍색의 n-BuOH을 취해 spectrofluorometer를 사용하여(Ex : 515nm, Em : 553nm) 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로 tetraethoxy propane 0.5nmole을 같은 방법으로 반응시켜 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 혈청 lipid peroxide 함량을 산출하였다.

$$\cdot \text{Serum lipid peroxide} = (\text{sample의 흡광도} / \text{표준용액의 흡광도}) \times 25(\text{nmole/ml serum})$$

F. 혈중 Hydroxyl radical 측정

Kobatake 등의 방법²⁹⁾에 따라 혈청 34.8 μ l 에 0.54M NaCl, 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 10mM NaN₃, 7mM deoxyribose, 5mM ferrous ammonium sulfate 및 증류수로 333.3 μ l 가 되도록 첨가하여 vortex에서 잘 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 정지한다. 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 l를 가하여 water bath(100 $^{\circ}$ C)에서 30분간 가열한 후 실온에서 냉각한 다음 700 \times g에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 파장 532nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 의하여 hydroxyl radical(nmole / mg protein)의 함량을 정량하였다.

G. 혈중 활성산소를 제거시키는 효소

(Superoxide Dismutase) 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(3mM hydroxylamine/3mM hypoxanthine) 200 μ l 및 시약 B[7.5mU/ml xanthine oxidase(XO) with 0.1mM EDTA-2Na] 200 μ l를 넣고 vortex에서 잘 혼합한 다음, 37 $^{\circ}$ C water bath에서 40 분간 정치한다. 반응 액에 시약 C(300mg of sulfanilic acid/5.0mg N-1-naphthyl- ethylenediamine in 500ml of 16.7% acetic acid) 2.0ml를 넣어 잘 혼합하여 실온에서 20분 동안 정치한 다음 550nm에서 흡광도를 측

정하여 표준 검량 선에 준하여 혈청 중의 활성 산소를 제거시키는 효소(Superoxide Dismutase) 활성을 측정하였다. Cytochrome c의 환원을 50% 억제하는 양을 SOD의 1 unit로 정의 하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균치 \pm 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 ANOVA 분석을 거쳐 Duncan's multiple range test로 그 유의성을 나타내었다.

III. 結 果

1. In vitro

1) 세포 독성 시험(MTT assay)

BPT가 3T3-L1 전구지방세포의 세포독성에 미치는 영향을 조사하기위해 세포 독성 시험

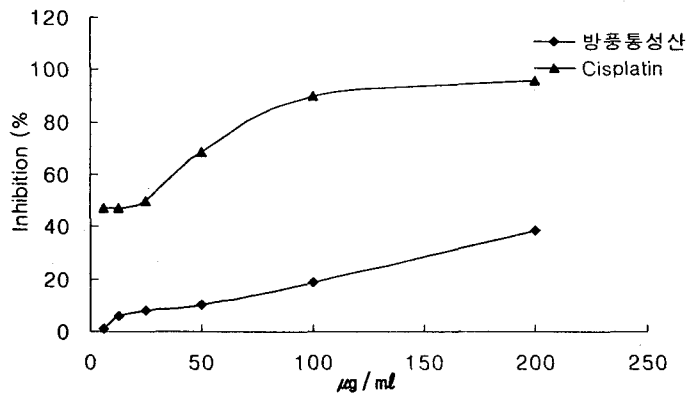


Fig. 1. Cytotoxic activity of BPT in 3T3-L1 preadipocyte cell growth in vitro. Cells were treated with various concentrations of BPT for 48h were analyzed for growth inhibition by MTT assay

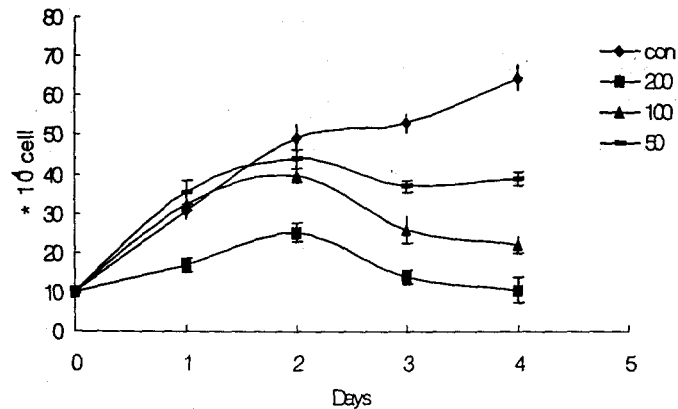


Fig. 2. Effect of BPT on cell growth of 3T3-L1 preadipocyte cells. The cells were treated with 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BPT under the experimental conditions described in Materials and Methods. At the indicated times, the viable cell number were determined by trypan blue exclusion

(MTT assay)을 시행하였다. BPT 처리농도의 증가에 따라 억제(inhibition) 정도도 증가하였으나 그 정도는 미미하였고, 최고 농도인 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 저 농도 cisplatin에 의한 세포독성보다 낮았다(Fig. 1).

2) 세포 성장 저해 실험(Trypan blue assay)

세포 성장 저해 실험(Trypan blue assay)을 통해 防風通聖散 투여가 3T3-L1 전구지방세포의 성장에 미치는 영향을 살펴본 결과, 대조군에 비해 防風通聖散을 투여한 군에서 농도 의존적으로 3T3-L1의 성장을 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

3) 지방세포분화 억제 효과

3T3-L1 전구지방세포의 Oil red O 염색 시 대조군의 경우 지방세포로의 분화를 촉진시켜 지방구를 많이 생성한 것을 볼 수 있으나 防風通聖散을 첨가한 경우 농도 의존적으로 지방구 생성이 감소되고, 지방세포로의 분화가 억제된 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3, 4).

4) 세포내 triglyceride 측정

3T3-L1 전구지방세포에 防風通聖散 추출물을 농도별로 첨가하였을 때, 세포내 중성지방(triglyceride) 축적량을 측정하였다. 그 결과 BPT 투여군의 중성지방(triglyceride) 축적량은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

5) Western blot assay 및 RT-PCR

지방세포의 분화과정에는 많은 외부자극과 복잡한 유전자 발현 조절과정을 통해 일어나므로 防風通聖散이 어떤 경로를 통하여 분화를 억제 하는지 살펴보았다. 분화에 있어 가장 중요한 전사인자중 하나인 C/EBP α 및 C/EBP β 단백질(protein)의 발현 정도는 BPT 처리 시에 현저히 감소함을 관찰하였다. 또한 C/EBP α 의 mRNA level도 현저히 감소함을 확인하였다.

C/EBP는 mPPAR γ 2 gene promotor를 활성화 시키는 것으로 알려져 있으며 발현정도를 살펴본 protein level에서 대조군(control)에 비해 현저히 감소되었다. 분화된 세포의 지표(marker)인 Glut4와 leptin secretion을 살펴본 결과 leptin

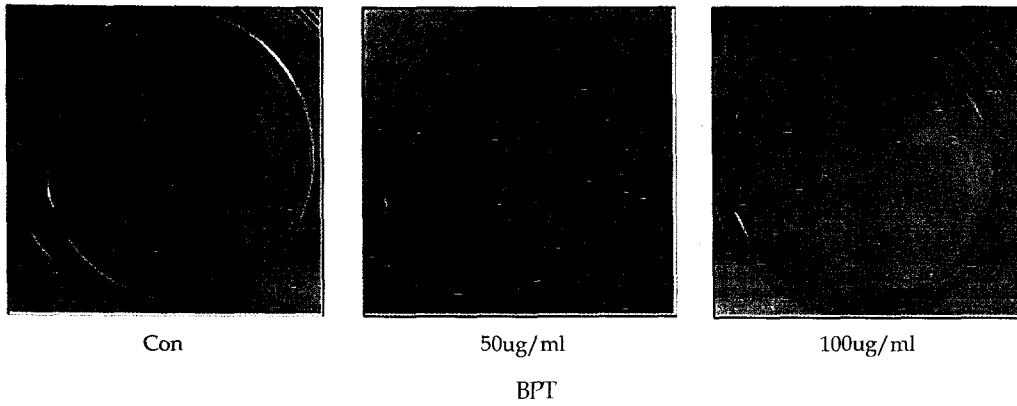


Fig. 3. Oil Red O staining of lipid droplets.

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.

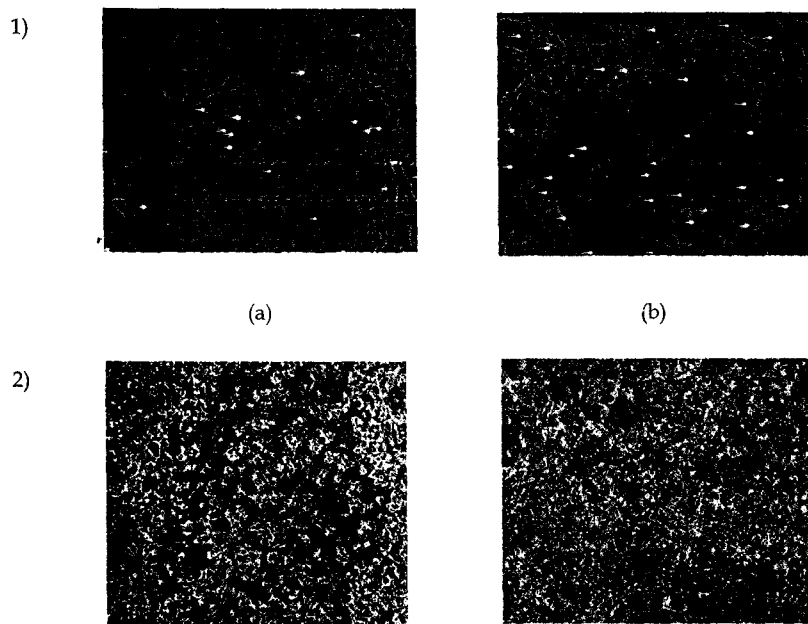


Fig. 4. Morphological examination of adipocyte differentiation influenced by BPT

(a) No additive; (b) BPT II

- 1) Morphological examination is inverted light 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

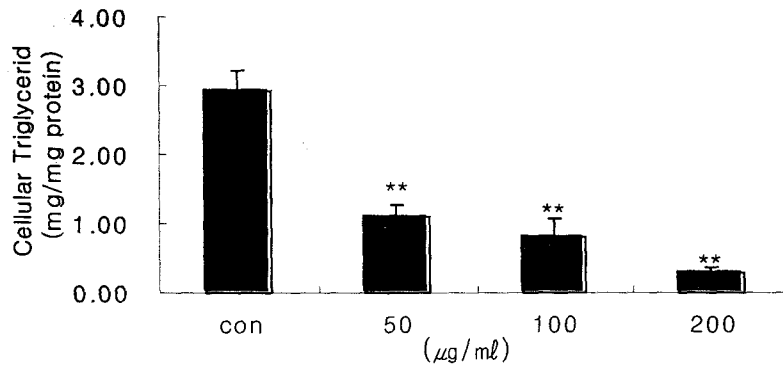


Fig. 5. Effect of BPT on triglyceride contents. Following the hormonal induction of differentiation, 3T3-L1 cells were treated for 8 days with BPT extract at the indicated concentrations. *P < 0.01 versus control/BPT, Data analyzed by student's t-test and reported as means ± S.D.(n=3)

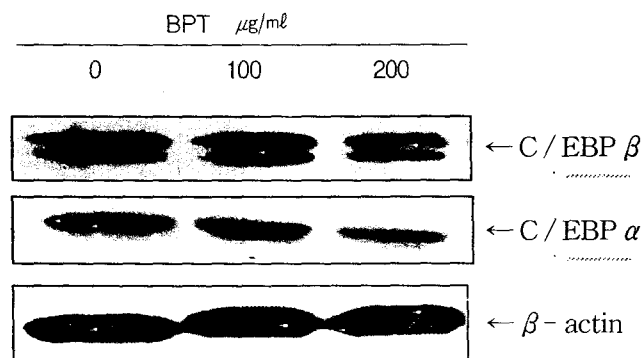


Fig. 6. Effects of BPT on C/EBP protein expression during the intermediate stage of adipocyte differentiation

발현은 BPT처리시 농도 의존적으로 감소됨을 보였고 Glut4의 세포막으로의 전좌(translocation)는 변화가 없었으며 인산화 된 IGF-1R의 발현에도 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 6, 7, 8).

2. In vivo

1) Poloxamer-407로 유발된 고지혈증에

대한 효과

Poloxamer-407 투여하였을 때 혈청 중성지방(triglyceride) 농도는 정상 군에 비해 현저히 증가되었다. 그러나 BPT군에서 유의한 감소를 보였으며, 그 효과는 농도 의존적이었다. Total cholesterol 농도는 BPT처리군에서 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 보였고 BPT II 군에 있어 15%정도의 유의한 감소를 보였다 (Table 2).

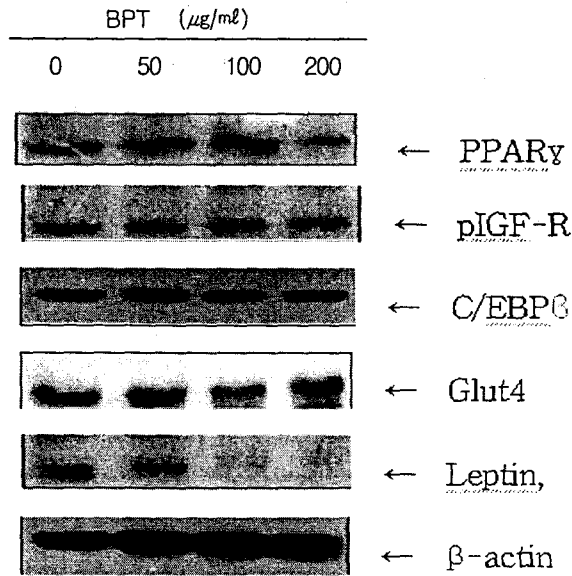


Fig. 7. Effects of BPT on protein expression during the terminal stage of adipocyte differentiation. 3T3-L1 cells were treated with BPT for 5 days. After treatment whole cell proteins were separated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, and then blotted with anti-PPAR γ , Leptin, pIGF-R.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

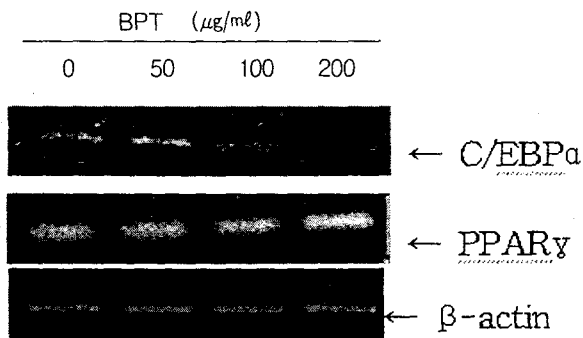


Fig. 8. Effects of BPT on mRNA expression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α and (B) peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ by RT-PCR analysis. Quantification of mRNA levels for C/EBP α and PPAR γ normalized against β -actin levels

Table 2. Effect of BPT extract 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
BPT I	100	984.7±69.8 ^b	753.9±60.3 ^{a,b}
BPT II	200	942.7±61.2 ^b	690.8±54.8 ^b

Rats were orally administered BPT 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 ± 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. (same superscript letter means difference is not significant.)

Table 3. Effect of BPT extract 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
BPT I	100	720.8±19.8 ^{a,b}	195.2±3.8 ^a
BPT II	200	641.3±40.8 ^c	176.5±23.6 ^a

Rats were orally administered BPT daily for consecutive four weeks before Triton WR-1339 induced hyperlipidemic state. The rats were sacrificed 40hrs 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. (same superscript letter means difference is not significant.)

Table 4. 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
BPT I	100	211.6±5.3 ^a	318.0±19.0 ^{a,b}	2.59±0.30 ^a
BPT 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.

2) Triton WR-1339로 유발된 고지혈증에 대한 효과

Triton WR-1339 투여하였을 때 혈청 중성지방(triglyceride) 농도는 BPT II 군에서 통계적으로 유의한 감소를 보였으며, Total cholesterol 농도는 고지혈증 유도군에 비해 BPT 군에서 약간의 감소 경향을 보였지만 유의하지는 않았다 (Table 3).

3) 식이성 비만 유도 흰쥐에 대한 防風通聖散의 효과

(1) 식이성 비만 유도 흰쥐의 체중에 대한 防風通聖散의 효과

식이성 고지혈증이 유발된 쥐에 있어 최종 몸무게는 340.3g으로 처음의 210.3에서 130g의 증가를 보인 반면 BPT 군에서는 106g의 증가를 보여 유의한 감소를 보였다. 반면 일별 체중증

Table 5. Effect of BPT extract on the adipose tissue mass of rats fed experimental diets

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

Table 6. Effect of BPT extract on the concentration of serum lipids in rats fed experimental diets

Treatment	Dose(mg/kg)	mg/dl	
		Triglyceride	LDL-cholesterol
Normal		93.2±11.3 ^d	49.3±4.27 ^d
Control		263.5±31.5 ^a	110.6±18.5 ^a
BPT I	100	234.7±19.8 ^{a,b}	93.5±9.23 ^{a,b,c}
BPT 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.

가는 약간의 감소만 보여 防風通聖散 투여에 의한 통계적인 차이를 보이지는 않았다(Table 4).

(2) 식이성 비만유도 흰쥐의 지방조직 감량 효과

고지혈증 유도군에 비해 防風通聖散 추출물을 함께 투여한 BPT군이 Epididymal fat 무게는 약간의 감소를 보였고, Visceral fat과 Peritoned fat 무게는 모두 농도 의존적으로 감소시켰는데 특히 BPT II군에서 28% 감소시켰으므로 통계적으로 유의하게 큰 차이를 보였다 (Table 5).

(3) 식이성 비만유도 흰쥐의 혈청 지질 감소에 대한 효과

防風通聖散 투여가 식이성 비만에 효과가 있는지 확인하기 위해서, 흰쥐의 혈청 triglyceride, LDL-cholesterol, total cholesterol, HDL-cholesterol에 영향을 주는지 관찰하였다. 식이로 투

여했을 때 혈중 중성지방(triglyceride)과 LDL-cholesterol의 수치는 시료의 농도에 따라 감소하는 경향을 보였고 BPTII군에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Table 6). Total cholesterol에 대한 HDL cholesterol의 비율은 고지혈증 유도 군에 비해 모든 군에서 약간의 증가를 보였으며 특히 BPTII 군에서는 유의한 증가를 보였다(Table 7).

(4) 식이성 비만유도 흰쥐의 혈중 지질 과산화물에 대한 효과

식이로 고지혈증을 유도한 군에 비해 시료 첨가 군이 혈중지질 과산화물의 생성을 약간 억제시켰고 BPTII군에서 통계적으로 유의하게 감소하였으며, superoxide dismutase activity도 BPT II군에서 유의적인 차이를 보였다. Hydroxy radical 생성량은 약간의 감소 경향은 보였으나 군 간의 유의한 차이는 없었다(Table 8).

Table 7. Effect of BPT extract 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
BPT I	100	98.8±7.45 ^a	30.2±2.33 ^{bc}	0.306±0.017 ^{bc}
BPT 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.(same superscript letter means difference is not significant.)

Table 8. Effect of BPT 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
BPT I	100	11.8±1.28 ^{ab}	6.04±0.99 ^a	2.56±0.41 ^{bc}
BPT 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.(same superscript letter means difference is not significant.)

IV. 考 察

최근 한약재제를 이용한 처방이 비만 및 지질대사에 미치는 영향에 대한 많은 실험적 연구가 이루어지고 있는데, 복합처방을 이용한 비만 관련 연구에는 防風通聖散¹⁸⁾ 이외에 太陰調胃湯³⁵⁾, 加味六君子湯³⁶⁾, 五苓散³⁷⁾, 二陳湯³⁸⁾, 車前子 玉米鬚 및 苦蔘 복합제제³⁹⁾ 등의 효과가 보고된 바 있으며 단일 약제를 이용한 비만 관련 연구로는 人蔘⁴⁰⁾, 芍藥씨 추출물⁴¹⁾, 大黃⁴²⁾, 山查⁴³⁾, 鹿茸⁴⁴⁾ 등이 보고된 바 있다. 지방세포분화와 관련된 연구로서는 白茯苓, 澤瀉 및 蒼朮⁴⁵⁾ 등에서 3T3-L1 세포를 통해 유효성이 보고된 바 있다. 고지혈증에서는 防風通聖散¹⁸⁻²⁰⁾ 외에 消風滌痰湯⁴⁶⁾, 加味四物湯 및 加味四君子湯⁴⁷⁾, 柴胡·芍藥·釣鉤藤의 복합제제⁴⁸⁾ 등에서 유효한 결과가 보고되었으며, 단일처방

으로는 桃仁⁴⁹⁾ 紅花⁵⁰⁾ 當歸⁵¹⁾ 등을 이용한 동물실험 연구가 있었다.

防風通聖散이 최초로 기재된 문헌은 金代 劉河間의 <宣明方論>으로, 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 氣滯滯 鬱陽 胃燥熱 風熱佛鬱 濕熱內鬱' '一切酒食毒 一切藥毒 雜病一體新久'라 하였다¹⁵⁾. 東醫寶鑑에서는 用藥篇에서는 防風通聖散에 대해 18劑중 輕劑로, 發散시키는 약이라 하고 火門에서는 火熱을 두루 치료하는 약이라 하였으며, 鼻淵, 鼻塞 淡滯이 盛한 증상 등의 淡으로 인한 질환, 中風, 破傷風, 등의 風으로 인한 질환, 傷寒 表證, 大頭瘟 등의 전염성 질환과 下焦熱을 비롯 癰疽, 癩疹, 大風瘡, 白癩瘡, 天布瘡, 疥癬, 丹毒 등의 피부병에도 두루 썼다⁵²⁾. 최근에도 防

風通聖散이 肥滿症으로서 實證인 中風體質者에게 활용되고 있으며¹⁶⁾, 그 외에 비만과 관련이 있는 질환의 효과로서 心血管系 및 神經系細胞 防禦效果²¹⁾, 家兔血清中 脂肪含量 低下效果¹⁷⁾, 고혈압 고지혈 저하효과¹⁸⁾, 불임치료효과⁵³⁾ 등이 보고된 바 있다. 임상적으로는 肥滿症으로서 實證인 中風體質者에게 활용된 예가 제시되고 있다¹⁷⁾.

따라서 防風通聖散은 脾胃實熱 및 腎實熱로 인한 實證 비만치료에 적합할 것임을 추론해볼 수 있다. 실제로도 防風通聖散이 肥滿 및 肥滿과 관련한 합병증에 대한 防風通聖散의 效能을 직간접적으로 확인하기 위한 실험적 연구도 여러 차례 시행되었는데, 안 등¹⁸⁾의 防風通聖散이 비만유도백서의 체중 및 지질대사에 미치는 영향, 김¹⁹⁾의 防風通聖散이 가토혈청중 지질함량에 미치는 영향, 이 등²⁰⁾의 防風通聖散이 고혈압, 고지혈에 미치는 영향, 나²¹⁾의 心血管系 및 神經系細胞 防禦效果 등이 있다. 그러나 기존의 防風通聖散과 관련한 연구들은 주로 지질함량 등에 대해 미치는 효과 등을 관찰하였으며, 한방처방이 지방세포분화과정 중의 유전자 발현에 미치는 영향, 지질 과산화대사물의 축적과 항산화효소활성 등의 세포 수준에서 비만에 미치는 영향에 대해서는 연구된 바가 없었다.

본 연구에서는 防風通聖散이 3T3-L1 지방세포의 분화에 미치는 영향을 *in vitro* 실험을 통해 관찰하여 세포단계에서의 비만억제 효과의 확인을 시도하였고, *in vivo* 실험을 통해 防風通聖散의 비만유도백서의 체중 및 혈중지질구성 및 지질과산화물과 항산화효소활성에 미치는 영향을 관찰하였다.

지방세포는 자신의 성장과 발달을 스스로 조절할 뿐 아니라 체내 에너지 항상성 유지를 위한 다양한 기능을 수행하며³⁴⁾, 지방조직의 성장은 크게 두 가지로, 첫째 지방크기가 증가되는

것, 둘째 새로운 지방세포가 전구지방세포로부터 분화되는 것이다⁵⁴⁾. 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 활성화 되어야 한다^{54,55)}. 이들 중 가장 잘 알려진 두 가지는 C/EBP family, PPAR γ 이고, 이들은 상호작용으로 지방세포분화를 촉진 시킨다⁵⁴⁻⁵⁶⁾.

In vitro 실험에서는 BPT이 지방세포분화에 미치는 영향을 microscopy와 Oil Red-O 염색을 통해 관찰한 결과 모든 농도에서 3T3-L1 지방구 생성을 억제하는 것을 확인하였고, 이는 농도 의존적이었다.

중성지방(triglyceride) 축적도 대조군에 비해 BPT 처리군이 농도 의존적으로 억제하는 효과를 보였다. 혈청 중의 중성지방(triglyceride)농도는 비만지수가 높을수록 증가하며, 지질대사 이상의 해명에 매우 중요한 역할을 하고 있어 비만증 유무의 주요한 판단 근거가 될 수 있다.⁴¹⁾ 이로 볼 때 防風通聖散의 처리가 세포내 중성지방(triglyceride) 축적을 억제하여, 비만억제에 대한 효과를 추측할 수 있다.

이에 防風通聖散의 지방세포 분화 억제의 경로를 추론하였다. 3T3-L1 전구지방세포주가 지방세포로 분화 하는 데는 많은 지방특이 유전자의 전사가 복합적으로 활성화되어야 하는데⁵⁴⁻⁵⁶⁾, 세포 분화에 있어 가장 중요한 전사인자 중 하나인 C/EBP α , C/EBP β protein의 발현 정도는 BPT 처리군에서 유의하게 감소하였고 C/EBP α 및 PPAR γ 의 mRNA level도 감소하였다. C/EBP α 의 발현은 지방전구세포에서는 관찰되지 않지만, 분화과정의 후반기에 지방 특이 유전자조절부위의 전사조절부위를 활성화시키

는 역할을 하며,³⁴⁾ 특히 그 중에서도 mPPAR γ 2 gene promotor를 활성화시키는 것으로 알려져 있는데 PPAR γ 의 발현은 protein level에서 BPT 처리군이 대조군에 비해 감소되었다. 분화된 세포의 marker인 Glut4와 leptin secretion을 살펴본 결과 Glut4의 세포막으로의 전좌(translocation)은 어느 정도 억제시키는 경향을 보였고, leptin 발현은 BPT 처리시 농도의존적으로 감소하였다. leptin은 영양상태에 비례하여 지방세포의 비만 유전자에서 생성 분비되어 비만을 억제하고 체중과 체지방량을 감소시키는 역할을 한다.⁴⁴⁾ 그러나 인산화된 IGF-1R의 발현에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

In vitro 분석(assay)을 종합하여 보면 防風通聖散은 3T3-L1 전구지방세포가 지방세포로 분화되는 과정을 억제하는 작용이 있으며, 그 기전은 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현 억제와 관련이 있는 것으로 사료된다.

In vivo 분석(assay)에서는 Triton WR-1339, Poloxamer-407은 세포의 lipase 활성을 억제하여 혈액 내 중성지방(triglyceride)와 LDL을 증가시키고 high molecular weight Apo B, free and ester-bound cholesterol, phospholipid, fatty acid 농도를 증가시키며 또한 세포내 중성지방(triglyceride) 축적을 증가시킨다⁵⁷⁻⁵⁹⁾. Poloxamer-407 투여로 고지혈증을 유발한 경우 BPT를 투여했을 때 중성지방(triglyceride) 및 total cholesterol 농도 모두 유의한 감소를 보였으며, BPTII에서 특히 현저한 감소를 보였다. Triton WR-1339 투여 시 혈청 triglyceride 농도는 BPTII군에서 통계적으로 유의한 감소를 보였으며, Total cholesterol 농도는 BPT 투여군에서 약간의 감소경향을 보였지만 유의적이지는 않았다.

식이성 고지혈증이 유발된 쥐에서는 대조군보다 BPT를 식이로 함께 투여한 경우에서 유의하게 체중증가가 낮았고, 이 체중증가 억제효과도

농도 의존적이었다.

식이성 비만유도 흰쥐의 지방조직 감량 효과를 확인한 결과도, BPT를 식이로 투여하였을 때 투여하지 않은 대조군에 비해 epididymal fat 무게는 약간 감소하였고 visceral fat과 peritoned fat 무게는 모두 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 BPTII투여군에서는 28% 감소 시킴으로서 통계적으로 유의하게 큰 차이를 보였다.

또한 BPT이 식이성 비만 흰쥐의 혈청 중성지방(triglyceride), LDL-cholesterol, total cholesterol, HDL-cholesterol에 대해 영향을 주는지 관찰하였는데, 시료를 식이로 함께 투여했을 때 혈중 중성지방(triglyceride)과 LDL-cholesterol의 수치는 시료의 농도가 높을수록 감소하는 경향을 보였고 BPTII 투여 시에 통계적으로 유의한 차이를 보였다. Total cholesterol에 대한 HDL cholesterol의 비율은 고지혈증 유도군에 비해 모든 군에서 약간의 증가를 보였고 이 또한 BPTII 투여군에서 유의한 증가를 보였다.

중성지방(triglyceride)는 glycerol에 3분자의 지방산이 ester와 결합한 것으로 중성지방이라고도 부른다. Chylomicron과 VLDL이라고 하는 lipoprotein의 주성분이고 생체의 에너지 저장과 운반에 관여한다⁶⁰⁾. lipoprotein 대사과정을 파악하는데 있어 중성지방(triglyceride)는 cholesterol과 더불어 유용한 지표이므로 지질대사이상을 검사하는데 우선적으로 선택되는 검사이다⁶¹⁾.

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^{60,61)}

HDL은 말초조직에서는 분해되지 않는 cholesterol을 간으로 운반하는 cholesterol 역전송계를 담당하는 lipoprotein으로 동맥경화의 방어 인자의 하나로 알려져 있다⁶⁰⁾. 임상적으로 HDL-cholesterol의 변동은 허혈성 심장질환의 발생 빈도와 역상관 관계가 있고, 당뇨병, 비만 등에서 낮아지고, 운동, 적당량의 알콜, 에스트로겐 등에 의해 상승하는 것으로 알려져 있다⁶¹⁾.

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

식이성 비만유도 흰쥐의 혈중 지질 과산화물에 대한 효과는 BPT 투여군에서 LDL 산화의 지표인 MDA 농도가 대조군에 비해 낮았고, 이는 BPT II 처리군에서 통계적으로 유의하였으며, 유의성은 없었지만 hydroxy radical 생성량도 약간의 감소 경향을 보였다. 또한 항산화효소인 SOD 활성치는 BPT 투여군에서 높아지는 결과를 보였고 이는 BPTII 처리군에서 유의하였다.

활성산소물질(ROS)는 세포의 노화나 흡연, 자외선 환경오염에 노출 시 증가되며 특히 비만, 인슐린 저항성 등의 원인에 의해서도 영향을 받게 된다. ROS에 대한 세포내 방어기전은 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD) 등에 의해 이루어진다⁶²⁾. 본 연구에서 BPT의 투여가 SOD 활성을 높이는 효과가 있음을 확인하였으며 이는 防風通聖散의 투여가 비만으로 인한 지질대사이상과 과산화물의 축적을 예방하고 치료하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

In vivo 실험의 결과를 종합해보면, BPT의 투여는 식이성 고지혈증 유발 흰쥐의 혈액에서 triglyceride, LDL-cholesterol를 모두 감소시키는 효과가 있었으며, HTR(HDL-cholesterol/Total-cholesterol)

은 증가시켰으며 농도의존적이었다. 또한 혈중 지질 과산화물을 감소시키고, SOD의 활성을 촉진시켰으며 hydroxy radical 생성량도 감소시켰다.

본 실험의 결과로 미루어 볼 때 防風通聖散은 식이성으로 유발된 비만과 고지혈증의 예방과 치료에 효과가 있다고 사료된다.

V. 結 論

防風通聖散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.

I. *in vitro*

1. 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 억제 및, 지방구 생성 감소에 유의한 효과가 있었다.
2. C/EBP α , C/EBP β 의 억제에 있어서는 BPT II에서 유의한 차이가 있었다.

II. *in vivo*

1. Poloxamer-407 투여군에서 대조군에 비해 BPT를 식이에 함께 투여한 경우 혈청 triglyceride와 total Cholesterol 농도는 유의하게 감소하였다.
2. Triton WR-1339를 투여한 군에서는 대조군에 비해 防風通聖散을 식이에 함께 투여

한 경우 혈청 triglyceride는, BPTII 투여군에서 유의한 감소가 있었다.

Total Cholesterol 농도는 감소경향을 보였다.

- 3.식이성 고지혈증 유발군에서 BPT는 체중 증가량의 유의성 있는 억제 및 지방조직 감량효과가 있었다.
4. 혈중 Triglyceride, LDL-cholesterol, 지질 과산화물을 감소시키는 효과가 있었고 HDL-cholesterol 및 HTR(HDL-cholesterol/Total-cholesterol)를 증가시켰다.
- 5.식이성 고지혈증 유발군에서 superoxide 및 dismutase activity 는 BPTII 투여군에서 유의한 차이를 보였고, hydroxy radical 생성은 감소하는 경향이 보였다

參考文獻

1. 대한비만학회. 임상비만학. 서울:고려의학. 1995: 171, 191, 129, 205, 249, 417-37.
2. 과학백과사전 종합출판사. 동의학사전. 서울: 도서출판까지. 1998:414.
3. 의학교육연수원. 가정의학. 서울:서울대학교출판부. 2001:1013.
4. 박혜순, 조홍준, 김영식, 김철준. 성인의 비만과 관련된 질환. 가정의학회지. 992;13(4):344-53.
5. 이흥구. 비만과 관련된 질환. 한국영양학회지. 1990;23(5):341-6.
6. 김기수, 이기업, 송영기, 홍성관, 박중열, 김철희. 내분비질환의 진단과 치료. 서울:한국의학. 1999: 356.
7. 박혜순. 소아 및 청소년 비만의 정신역동. 대한비만학회지. 2000;9(3):55-9.
8. 대한임상의학연구소. 임상병리검사편람. 서울:

의학문화사. 1992:158, 162, 173, 223, 224, 231, 246.

9. WHO. Preventing and managing the Global epidemic of obesity. Geneva : Report of WHO consultation on obesity. 1997:60-1.
10. 中醫研究院 中醫症狀鑑別診斷學. 北京:人民衛生出版社. 1987:43.
11. 馬元臺, 張隱庵. 黃帝內經素問. 서울:성보사. 1975:224-330.
12. 陣士鐸. 石室秘錄. 서울:행림서원. 1982:76.
13. 李東垣. 東垣醫書十種, 脾胃論. 서울:대성문화사. 1983:70.
14. 李梴. 編註醫學入門. 서울:대성문화사. 1984: 108.
15. 劉河間. 宣明方論. 卷十. 서울:녹강출판사. 1988:768.
16. 허수영. 비만의 동서의학적 고찰과 치료. 대한한방재활의학회지. 1997;7(1):272-86.
17. 조기호. 한방처방의 동서의학적 해석방법론. 서울:고려의학. 1999:218.
18. 안정미, 김성수, 신현대. 방풍통성산이 비만 유도백서의 체중 및 지질대사에 미치는 영향. 경희의학. 1993;9(1):69-82.
19. 김수억. 방풍통성산이 가토혈청중 지질함량에 미치는 영향. 경희약대논문집. 1977;5:63-8.
20. 이남훈, 신길선, 조기호, 김영석, 배형섭, 이경섭. 방풍통성산이 고혈압 고지혈에 미치는 영향. 경희의학. 1991;7(1):101-9.
21. 나영철. 加味防風通聖散의 心血管系 및 神經系 細胞 防禦效果에 對한 研究. 大田大學校 大學院 박사논문. 2004.
22. Wout ZG, Pec EA, Maggiore JA, Williams RH, Palichara 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, Ca²⁺ 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.
 31. Troiano RP, Flegal KM, Kyczmarski RJ. Overweight prevalence and trends for children and adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1995;149:1085-91.
 32. Freedman DS, Srinivasan SR, Valdez RA, Williamson DF, Berenson GS. Secular increases in relative weight and adiposity among children over two decades: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*. 1997;99:420-6.
 33. 강윤주, 홍창호, 홍영진. 서울 시내 초, 중, 고 학생들의 최근 18년간(1976-1996) 비만도 변화추이 및 비만의 증가 양상. *한국 영양학회지*. 1993;30:832-9.
 34. 김재범, 박지영. 지방세포분화와 지방세포 분비물질들의 기능. *대한내분비학회지*. 2002;17(1):1-9.
 35. 이기주, 김경요, 전병훈. 태음조위탕이 백서의 비만증 및 유도비만세포에 미치는 효과. *대한동의병리학회지*. 1996;10(1):88-98.
 36. 蘇俊魯. 복합생약제 가미육군자탕이 3T3-L1 세포의 증식과 분화에 미치는 영향. *又石大學校 論文集*. 1992;14(1):281-298.
 37. 이상봉, 금동호, 이명중. 오령산이 비만유도 흰쥐의 체중 및 혈청지질에 미치는 영향. *한방재활학회지*. 1997;7(1):101-119.
 38. 김기형. 二陳湯加味方이 肥滿에 미치는 實驗的 研究 : 지질대사, 혈압, 뇌혈류량을 중심으로. *東新大學校 大學院 박사학위논문*. 2005.
 39. 변성희, 김상찬. 3종의 한약이 비만유도 흰쥐의 생화학적 변화에 미치는 영향. *동의병리학회지*. 2001;15(2):311-8.
 40. 김신일. 인삼이 고지방식이에 의한 비만유도 Rat에서 지방축적에 미치는 영향. *고려인삼학회지*. 1986;10:167.

41. 이정민, 최상원, 조성희, 이순재. 작약씨 추출물이 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화제와 지질과산화에 미치는 영향. 한국영양학회지. 2003;36(8):793-800.
42. 배정환, 이종수, 김성수, 신현대. 대황이 비만 유도 백서의 체중과 부고환 지방조직 변화에 미치는 영향에 대한 연구. 한방재활의학회지. 1998;8(2):62-76.
43. 고평재, 송용선. 산사추출액이 백서 비만모형에 미치는 영향. 원광대학교 논문집. 1998;8(1):1-8.
44. 전찬일, 김덕근, 이진용. 녹용이 흰쥐의 비만 억제에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2005;26(1):148-60.
45. 은재순, 홍종성, 소준노. 3T3-L1 세포의 증식 및 분화에 미치는 백복령, 택사 및 창출의 영향. 생약학회지. 1993;24(2):131-9.
46. 朴致相, 朴昌國. 疏風滌痰湯이 高脂血症에 미치는 影響. 濟韓東醫學術院 論文集. 1997; 2:144-55.
47. 辛吉祚, 曹基湖, 金永錫, 裴亨燮, 李京燮. 加味四物湯 및 加味四君子湯이 高脂血症 및 高血壓에 미치는 影響. 慶熙醫學. 1993;9(3): 283-95.
48. 조영환, 노환성, 박형섭, 박건구, 고우영. 고지혈증 랫트를 이용한 시호, 작약, 조구등의 항고지혈 효과. 응용약물학회지. 1997;5(1):43-7
49. 최문범. 桃仁이 家兔의 高脂血症에 미치는 影響. 경산대학교 대학원 석사학위논문. 1995.
50. 정승현. 紅花가 高Cholesterol 食餌에 의한 家兔의 高脂血症에 미치는 影響. 동국대학교 대학원 석사학위논문. 1995.
51. 정명현, 임종훈, 오형수. 한국당귀엑스가 흰쥐의 실험적 고지혈증에 미치는 영향. 생약학회지. 1998;29(4):300-11.
52. 허준. 동의보감. 서울:법인문화사. 1999:591, 593, 731, 960, 965, 988, 1020, 1106, 1121, 1387, 1413, 1466, 1468, 1469, 1494, 1717.
53. 宣熙仲. 不妊症과 防風通聖散. 月刊 醫藥情報. 1986;3(1):126-7.
54. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding Adipocyte Differentiation. Physiological Reviews. 1998;18(3):783-801.
55. Marcin K, Per B, Lars S. and Ulf S. Impact of obesity on metabolism in men and women. J. Clin. Invest. 1983;72:1150.
56. Hirsch J., and J. L. Knittle. Cellularity of Obese and nonobese human adipose tissue. Federation Proc. 1970;29:1516-21.
57. Ross E. A. Thomas A. W., Susan J. B., Renee A. V., and Ruth S. W. Relation of weight Orss to change in serum lipids and lipoproteins in obese women. Am J Clin Nutr. 1995;62:350-7.
58. Green H and Kehinde O. Sublines of mouse 3T3 cells hat accumulate lipid. Cell 1:113-116, 1974.
59. Hayashi H, Shitara M, Yamasaki F. The origin of lipid accumulated in the liver lysosomes after administration of triton WR-1339. J Biochem. 1982;92:1585-90.
60. 김현주, 김철환, 김기천, 전인석, 서홍관. 식이 섭취양상과 혈중 콜레스테롤치와의 관계. 가정의학회지. 1996;17(10):861-8.
61. A. K. Mokdad., M. K. Serdula., W. H. Dietz. The Spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. J. American Medical Association, 1999;282(2):1519-22.