

원저

調胃升清湯의 알코올 및 熱水 추출물이 지방세포 대사에 미치는 영향

• 이재은 · 김병우* · 권기록** · 임태진*** · 김동희****

* 상지대학교 한의과대학 내과학교실

** 상지대학교 한의과대학 침구학교실

*** 상지대학교 응용동물과학부

**** 연세대학교 원주의과대학 환경의생물학교실

Effects of *Chowiseungcheng-tang* Extracts on the Preadipocytes Proliferation in 3T3-L1 cell line, Lipolysis of Adipocytes in rat, and Localized Fat Accumulation by extraction methods

Jae-eun, Lee* · Byoung Woo, Kim* · Ki Rok, Kwon** · Tae Jin, Rhim*** · Dong Heui Kim****

* Department of Internal Medicine, Korean Medical College, Sangji University

** Department of Acup & Moxi, Korean Medical College, Sangji University

*** Devision of Animal resourses and life science, Sangji University

**** Department of Environmental Medical Biology, Wonju Medical College, Yonsei University

ABSTRACT

Objectives The purpose of this study is to investigate the effects of *Chowiseungcheng-tang* extracts on the preadipocytes proliferation in 3T3-L1 cell line, lipolysis of adipocytes in rat's epididymal adipocytes and localized fat accumulation of porcine by extraction methods(alcohol and water).

Methods Diminish preadipocytes proliferation and promote lipolysis of adipocytes do primary role to reduce obesity. So, we used 3T3-L1 mouse embryo fibroblasts(preadipocytes) and rat epididymal adipocytes from Sprague-Dawley rats to investigate the effects of *Chowiseungcheng-tang* extracts on the preadipocytes proliferation, lipolysis of adipocytes. They were treated with 0.01, 0.1, 1.0mg/ml *Chowiseungcheng-tang* alcohol and water extracts. And for the purpose of investigating the effects of *Chowiseungcheng-tang* alcohol and water extracts on the localized fat accumulation, we injected 0.1, 1.0, 10.0mg/ml *Chowiseungcheng-tang* extracts to porcine fat tissues and observed histological changes of them.

Results Following results were obtained from the preadipocytes proliferation and lipolysis of adipocytes and histological investigation of fat tissues.

1. *Chowiseungcheng-tang* extracts suppressed preadipocytes proliferation on the high dosage(especially 1.0mg/ml), and especially alcohol extracts had better effects.
2. The alcohol extracts of *Chowiseungcheng-tang* decreased the activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) on the concentrations of 0.1, 1.0mg/ml. Alcohol extracts had better effects than water extracts.
3. *Chowiseungcheng-tang* extracts increased lipolysis of adipocytes on the concentrations of 0.1, 1.0mg/ml, and especially on the concentration of 1.0mg/ml alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang* had better effect.
4. The water extract of *Chowiseungcheng-tang* had significant activity to the destruction of porcine fat cell membranes only on the concentration of 10.0mg/ml, but alcohol extracts of *Chowiseungcheng-tang* had it on all concentrations.

Conclusions The alcohol extracts of *Chowiseungcheng-tang* had much better effects on the preadipocytes proliferation, lipolysis of adipocytes and localized fat accumulation than water extracts

key words *Chowiseungcheng-tang*, Alcohol extracts, Water extracts, Preadipocytes, Proliferation, Adipocytes, Lipolysis, Fat tissues.

I. 緒論

비만이란 대사 장애로 인해 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 말하는 것으로, 칼로리 섭취가 신체활동과 성장에 필요한 에너지보다 초과되어 중성지방의 형태로 지방조직에 과잉 축적된 열량 불균형으로 일어난다¹⁾.

비만은 그 자체만으로도 용모손상(Disfigurement), 불편감(Discomfort), 비능률(Disability)을 비롯하여 질병(Disease), 죽음(Death) 등 소위 "5D 현상"을 초래하며²⁾, 고혈압, 동맥경화, 심근경색 등의 심장혈관계 질환, 신장장애, 당뇨병, 폐질환 등의 만성질환에 대한 빈도를 증가시키고 생리적 기능을 저하시킬 뿐만 아니라 일상생활을 위축시킨다는 것은 이미 알려진 사실이다³⁾.

이러한 비만에 대하여 미국의 경우 국립보건원(NIH)이 주축이 되어 1998년 비만의 진단과 치료에 필요한 지침을 제정하는 등 과학적 근거에 의거한 비만의 정확한 규명과 효율적인 치료전략을 마련하기 위해 국가차원의 노력을 경주하고 있고^{3,4)}, 우리나라에서도 1990년대부터 비만의 치료에 대한 사회적 관심이 높아지고 비만과 관련된 학회들이 생겨나면서, 비만에 관련된 연구들이 다양한 주제로 활발하게 진행되고 있다⁵⁾.

調胃升清湯은 太陰人의 食後痞滿 腿脚無力 中消善飢者⁶⁾에 사용되는 처방이나 그동안 신 등⁷⁾의 調胃升清湯 및 그 加味方이 비만마우스의 체중과 혈청 함량 변화에 미치는 영향 및 서 등⁸⁾의 비만 환자에 대한 調胃升清湯의 효과 및 부작용에 관한 임상적 관찰 등의 연구에서 볼 수 있듯이 비만 치료에 多用되었으며, 《東醫壽世保元》⁹⁾에 太陰人의 胃脘受寒表寒病 中 肺燥寒症에 사용되는 太陰調胃湯에 蘿菴子の 양을 줄이고 遠志, 天門冬, 酸棗仁, 龍眼肉 등 補心安神하는 安神藥類가 加味되어^{7,10)} 스트레스로 인한 폭식에 유효한 효과를 거둘 수 있으며, 특히 麻黃의 加減으로 적절한 체중 감소의 효과를 얻을 수 있는 처방이다^{8,10)}.

그러나 그동안 대부분 熱水 추출물의 형태로 실험에 사용되었고, 추출방식에 따른 調胃升清湯이 지방세포 대사에 미치는 영향에 관한 연구는 아직까지 이루어지지 않았다.

이에 저자는 調胃升清湯의 알코올 및 熱水 추출물이 지방세포의 분화와 분해에 미치는 영향을 비교 연구하였고, 돼지 복부 지방층에 추출액을 주입하여 국소 지방세포에 미치는 영향을 관찰하여 국소 비만 치료의 가능성 및 효과를 알아보려고 하였다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材料

1) 調胃升清湯 추출물의 조제

실험에 사용한 調胃升清湯의 약재는 한약재 수급 및 유통관리 규정¹¹⁾에 의거한 규격품을 사용하였고, 구성 약재와 용량은 Table 1과 같다. 알코올 추출물은 10貼 분량의 調胃升清湯 660g을 둥근 플라스크에 넣고 90% 알코올 2,000ml에 24시간 동안 방치한 후 rotary evaporator로 감압 농축하여 102.5g의 extract를 얻어 실험에 사용하였다. 熱水 추출물은 同量의 약재를 환류 냉각 장치가 설치된 둥근 플라스크에 넣고 3차 증류수 3,000ml를 가하여 3시간 동안 100℃로 가열한 후 rotary evaporator로 감압 농축하여 140.1g의 extract를 얻어 실험에 사용하였다.

(Table 1) The Contents of *Chowiseungcheng-tang*

韓藥名	生藥名	重量(g)/10貼基準
薏苡仁	<i>Semen Coicis</i>	120
乾栗	<i>Castaea Mollisima</i>	120
蘿菴子	<i>Semen Raphani</i>	60
麻黃	<i>Herba Ephedrae</i>	40
桔梗	<i>Radix Platycodi</i>	40
麥門冬	<i>Radix Ophiopogonis</i>	40
五味子	<i>Fructus Schisandrae</i>	40
石菖蒲	<i>Rhizoma Acori Graminei</i>	40
遠志	<i>Radix Polygalae</i>	40
天門冬	<i>Radix Asparagi</i>	40
酸棗仁	<i>Semen Ziziphi Spinosae</i>	40
龍眼肉	<i>Arillus Longan</i>	40
總量		660

2) 3T3-L1 지방세포 및 시약

3T3-L1 mouse embryo fibroblast(이하 3T3라 지칭함)는 American Type Culture Collection에서 구입하였고, Dulbecco's Modified Eagle Media(DMEM)와 bovine calf serum(BCS)은 GIBCO사(U.S.A.)로부터 구입하였다.

Fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin mixture 및 dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Cambrex 사(U.S.A.)로부터 구입하였다.

Insulin, isobutylmethylxanthine(IBMX), dexamethasone, amphotericin B, collagenase, bovine serum albumin(BSA) 등 세포배양에 사용된 기타 시약들과 생화학 분석에 사용된 시약들은 Sigma사(U.S.A.)로부터 구입하였다.

본 연구에 사용된 모든 화학물과 용매들은 세포 배양 또는 분석급 이상으로 사용하였다.

3) 동물

(주)오리엔트바이오로부터 구입한 6주령 수컷 Sprague-Dawley rat(200-250g)를 실험동물로 사용하였다. 본 실험실에서 사료와 물은 무제한 공급하였고, 사육실 온도는 20-25℃를 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 조절하였다.

4) 돼지의 지방 조직

풍부한 지방층을 가지고 있는 돼지의 복부 조직을 강원도 원주시 인근의 도축장의 협조를 얻어 도살 직후 잘라내어 사용 전 최대 4시간까지 냉장 보관하여 사용하였다.

2. 方法

1) 지방세포의 배양

3T3-L1 mouse embryo fibroblast는 Singh 등²²⁾의 방법에 따라 배양하였다. 즉, 3T3 세포들을 10% BCS를 포함한 DMEM 배지를 사용하여 8.5×10^3 cells/cm²가 되도록 60-mm culture dish에 분주한 다음 37℃ CO₂ incubator에서 배양하였다. 100% confluence에 도달(Day 0)하면, 3T3 세포들을 10% FBS, 1.7μM insulin, 0.5mM IBMX, 1μM dexamethasone을 포함한 DMEM 배지로 교체하고 3일 동안 배양하여 분화를 유도하였다. 調胃升清湯 alcohol 및 熱水 추출물이 지방세포의 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 1.0mg/ml, 0.1mg/ml, 그리고 0.01mg/ml 농도의 추출물이 포함된 분화 유도 배지로 3T3 세포들을 배양하였다. 분화 유도가 끝난 뒤 실험 종료 시(Day 10)까지 10% FBS과 167nM insulin이 포함된 DMEM 배지로 배양하였다. 세포배양액은 2일 간격으로 교체하였다.

2) 지방세포의 분화 측정

(1) Oil Red O 염색

調胃升清湯 추출물이 전지방세포로부터 지방세포로의

분화(지방합성)에 미치는 영향을 알아보기 위해 Negrel과 Dani의 방법²³⁾에 따라 Oil Red O 염색을 실시하였다. 즉, 실험 종료 시(day 10)에 세포를 phosphate buffer-ed saline(PBS)으로 세척한 다음 10% formaldehyde로 10분간 고정시켰다. 증류수로 세척하고 Oil Red O 염색용액으로 10-20분간 배양하였으며, 증류수로 세척한 다음 세포내 지방 축적을 관찰하였다.

(2) GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 활성

지방세포의 분화에 대한 탐침자로서 GPDH 활성을 측정하였다. 3T3 세포들이 100% confluence에 도달한 day 0에 추출물이 포함된 분화배지로 3일간 세포배양을 하였고, day 10에 culture dish로부터 세포를 분리하여 sonication 시켰고 원심 분리하여 상등액을 수거하였다. 상등액내의 GPDH 활성은 Wise와 Green의 방법²⁴⁾에 따라 spectrophotometer를 사용하여 340nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. GPDH 활성은 mU/min/mg protein으로 표시하며, 1mU 활성은 분당 1nmol의 NADH 산화와 동등한 값을 나타낸다(Fig. 1). 단백질 함량은 BSA를 표준시약으로 사용하여 Bradford 방법²⁵⁾에 따라 측정하였다.

3) 지방세포의 분해 측정

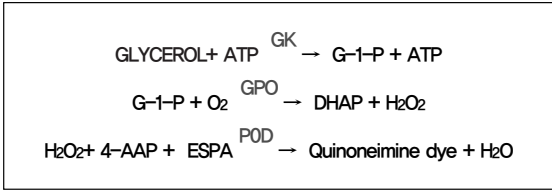
Rat의 성숙 지방세포에 알코올 및 熱水 추출된 調胃升清湯 추출물을 분사하여 분화된 지방세포의 지방 분해에 미치는 영향을 조사하였다. Rat 성숙 지방세포의 분리는 Rodbell¹⁶⁾ 방법을 수정한 Zalatan 등¹⁷⁾의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 수컷 Sprague-Dawley rat의 정소상체 지방조직을 떼어 내어 잘게 절단한 다음, collagenase(1mg/ml)와 BSA(10mg/ml)가 포함된 Krebs-Ringer 용액을 이용하여 37℃에서 1시간 분해시켰다. 분해된 조직액을 250 μm 여과 메쉬를 통해 여과시키고 250xg에서 10분간 원심 분리하여 전지방세포(pre-adipocyte)를 침전시켰다. 상등액에 위치한 지방세포 층을 수거하여 두 차례 세척을 한 다음, 지방세포수를 측정하였다. 50-ml conical tube에 5×10^5 cells/ml가 되도록 분주한 다음 37℃ CO₂ incubator에서 3시간 동안 배양하였다. 추출물이 지방분해에 미치는 효과를 조사하기 위해 처리시약과 함께 3시간 배양한 다음, free glycerol을 표준시약으로 사용하여 McGowan 등¹⁸⁾의 방법에 따라 배양액내 glycerol 함량을 측정하였다.

방출된 glycerol은 ATP의 존재 하에서 glycerol kinase에 의해 glycerol-1-phosphate로 전환되며, 이는

glycerol phosphate oxidase에 의해 dihydroxyacetone phosphate와 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 산화된다. 생성된 H₂O₂는 4-aminoantipyrine과 sodium N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)m-anisidine 존재하에서 peroxidase에 의해 자주색을 띠는 quinoneimine으로 전환된다. 따라서 생성된 quinoneimine에 의한 540nm에서의 흡광도의 증가는 배지 내에서의 glycerol 농도의 증가를 나타낸다.

4) 돼지 지방세포의 용해 측정

도살직후 채취한 지방 조직을 10% 포르말린 용액에 고정시킨 것과 0.9% NaCl 용액에 보관한 지방 조직을 비교 관찰하였다.



알코올 추출과 熱水 추출된 調胃升清湯 extract를 각각 농도별로 10.0, 1.0, 그리고 0.1mg/ml로 희석하여 1.0ml, 26gauge 주사기에 준비한 후 돼지의 지방층에 주입하였다. 바늘 깊이는 표적조직의 포화를 목적으로 돼지조직의 가장자리에 육안으로 확인하면서 주입하였다. 인산염완충액 식염수로 37℃에서 한 시간 동안 배양 후, 생검 검사물을 주입한 자리에서 추출하였다. 실험은 세 번 반복 시행하였다. 조직을 포르말데히드에 고착시키고 파라핀에 고

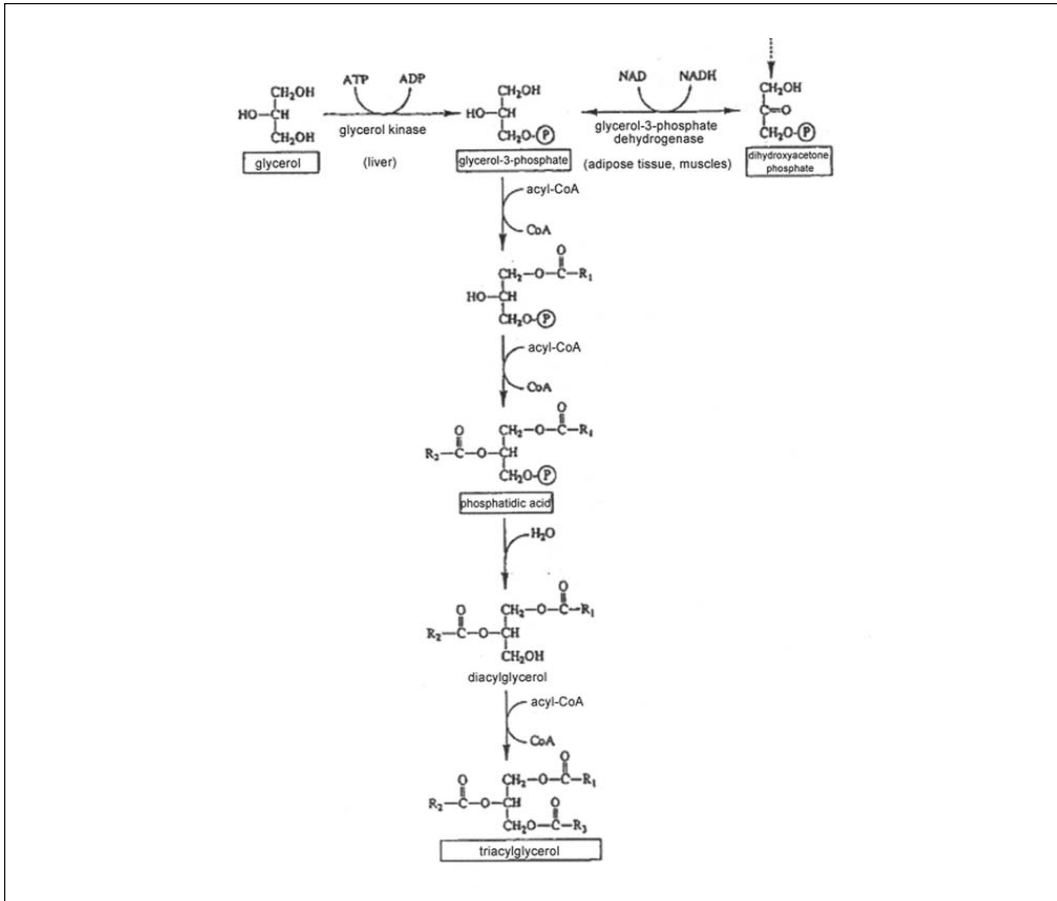


Fig.1. The pathway for lipid biosynthesis. Lipid biosynthesis occurs through sequential binding of the fatty acids activated as acyl-CoAs to glycerol-3-phosphate. In the liver, glycerol-3-phosphate is generated from glycerol by the action of glycerol kinase. However, due to the absence of glycerol kinase in the adipose tissue and muscles, glycerol-3-phosphate is generated from glucose by the way of dihydroxyacetone phosphate.

정시킨 후 Hematoxylin-Eosin 염색(H-E staining)을 실행하였다.

5) 통계 분석

처리시약의 농도별 지방세포 분화 및 지방세포 분화에 미치는 효과는 일원분산분석을 사용하여 조사하였으며, 평균값의 차이는 Duncan's multiple range test¹⁹⁾를 사용하여 p<0.05에서 유의성을 조사하였다.

III. 結果

1. 지방세포의 분화(proliferation)에 미치는 영향

1) 성숙 지방세포의 형성

3T3 미분화 지방세포(preadipocyte, Fig. 2 A)를 배양한 결과 배양 10일째에 성숙된 지방세포가 형성됨을 알 수 있었다(Fig. 2 B). 지방세포의 형성을 확인하기 위하여 세포질 내에 축적된 중성지방(triglyceride)을 염색하는 시약인 Oil Red O를 이용하여 세포 염색을 시행한 결과 성

숙 지방세포의 형성이 잘 되었음을 알 수 있었다(Fig. 2 C&D).

2) 농도별 분화에 미치는 영향

熱水 추출물은 대조군에 비하여 전 농도에서 차이를 나타내지 않고 비교적 광범위한 지방세포의 형성을 나타내는 것으로 관찰되었다(Fig. 3 C-E).

알코올 추출물은 대조군에 비하여 1.0mg/ml에서는 현저하게 분화를 억제하고 있었고, 0.1mg/ml의 농도에서는 약간의 억제를, 0.01mg/ml의 농도에서는 뚜렷한 차이를 나타내지 못하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3 F-H).

그리고, Oil Red O로 염색된 세포를 관찰한 결과 熱水 추출물은 1.0mg/ml의 농도에서, 알코올 추출물은 1.0mg/ml, 0.1mg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 지방세포의 분화를 억제하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

3) GPDH 활성화에 미치는 영향

지방합성은 dihydroxyacetone phosphate로부터 조효소로서 nicotinamide adenine dinucleotide

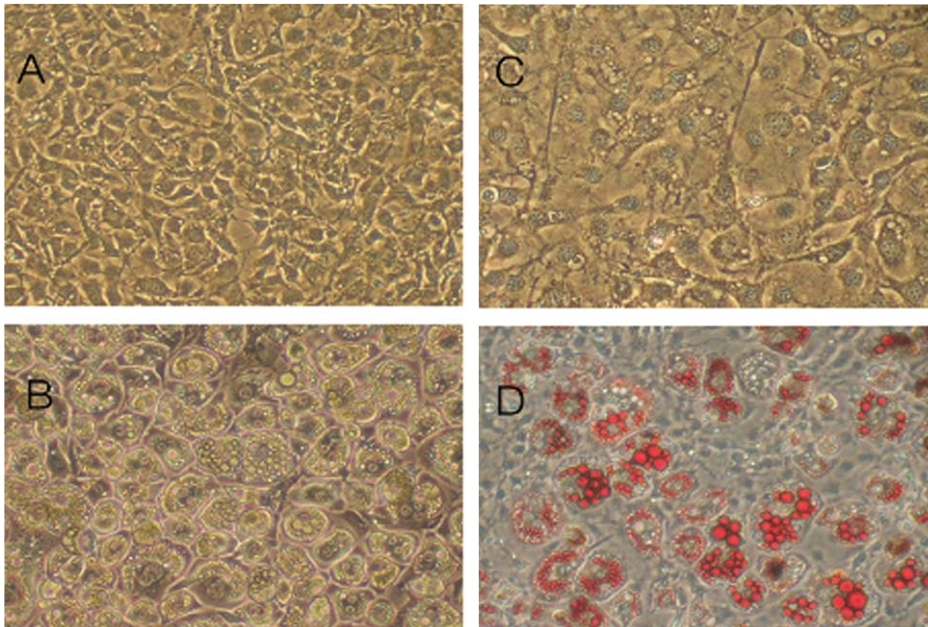


Fig. 2. Microscopic images of preadipocyte and adipocyte(×100)
 A: Undifferentiated cells
 B: Adipocytes induced to differentiation
 C: Undifferentiated cells stained with Oil Red O
 D: Differentiated cells stained with Oil Red O

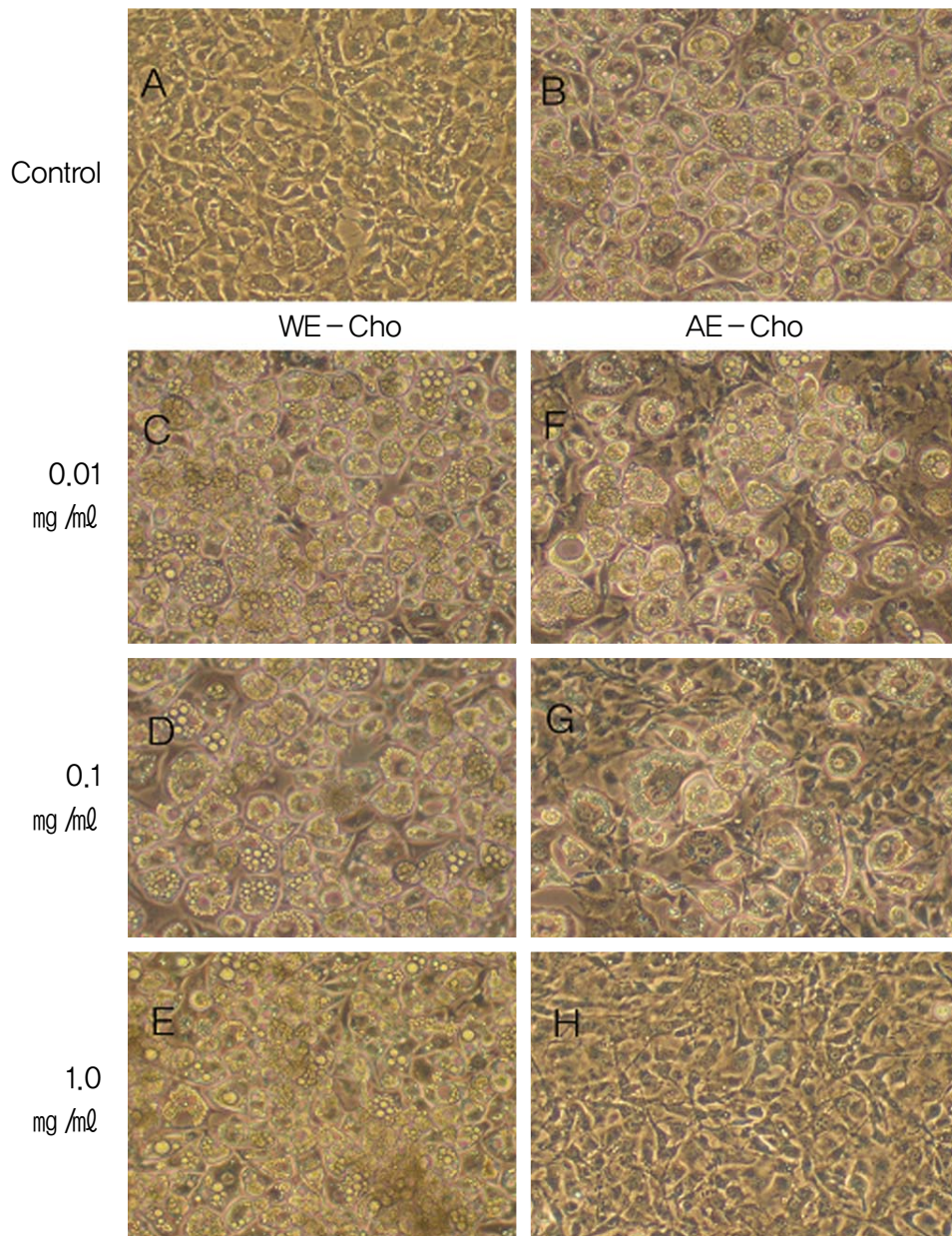


Fig. 3. The suppressed effects on the preadipocytes differentiation (×100).

- A : Undifferentiated cells
- B : Control was treated with 0.9% NaCl Solution adipocytes induced to differentiation
- C : 0.01mg /mL water extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated with 3T3preadipocytes
- D : 0.1mg /mL water extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated
- E : 1.0mg /mL water extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated
- F : 0.01mg /mL alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated
- G : 0.1mg /mL alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated
- H : 1.0mg /mL alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated

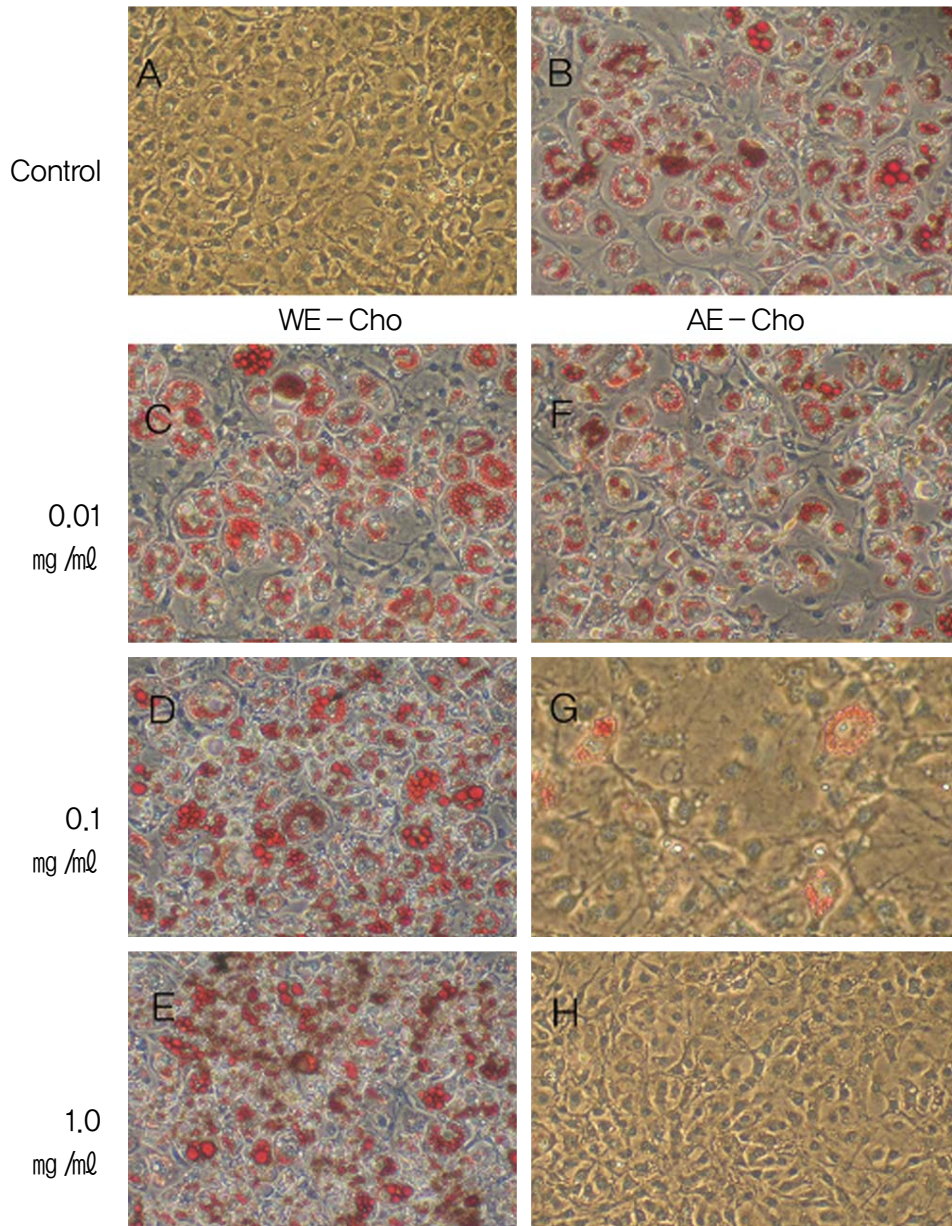


Fig. 4. The suppressed effects on the preadipocytes differentiation. All cells are stained with Oil Red O ($\times 100$).
 A : Undifferentiated cells
 B : Control was treated with 0.9% NaCl Solution
 C : 0.01mg /mL water extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated with 3T3 preadipocytes
 D : 0.1mg /mL water extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated
 E : 1.0mg /mL water extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated
 F : 0.01mg /mL alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated
 G : 0.1mg /mL alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated
 H : 1.0mg /mL alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang* was treated

hydrogen(NADH)을 사용하여 glycerol-3-phosphate 를 생성하는 효소인 glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) 활성을 측정함으로써 조사하였다. 미분화 3T3 지방세포가 성숙한 분화 지방세포로 전환됨에 따라 GPDH 효소 활성은 증가하게 된다.

본 실험에서는 調胃升清湯 알코올 추출물과 熱水 추출물이 전지방세포로부터 지방세포로의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 GPDH 활성을 측정하였다.

그 결과 추출물이 포함되지 않은 분화배지로 분화가 유도된 3T3 지방세포(Control)에서 GPDH 활성은 81.8 mU/min/mg protein으로 나타났다.

調胃升清湯 熱水 추출물의 첨가 농도에 따른 GPDH 활성은 0.1mg/ml 농도 이외에는 변화가 관찰되지 않았다. 즉, 熱水 추출물은 지방합성에 영향을 거의 미치지 못하였음을 알 수 있었다.

반면, 알코올 추출물은 0.01, 0.1 및 1.0mg/ml 농도 첨가에 따라 GPDH 활성은 각각 70.6, 43.0 및 22.5 mU/min/mg protein으로 감소하여(Table 2) 농도 의존적으로 GPDH 활성을 감소시켰고, 특히 0.1 및 1.0mg/ml 농도에서 대조군보다 유의한 억제를 나타내었다.

2. 지방세포의 분해(lipolysis)에 미치는 영향

(Table 2) The effects of *Chowiseungcheng-tang* extracts on glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) activity in 3T3 adipocytes.

Treatment	Concentration	GPDH activity ^{1,2} (mU/min/mg protein)
Control		81.8±4.7 ^{a,b}
WE-Cho	0.01mg/ml	80.1±2.9 ^{a,b,c}
WE-Cho	0.1mg/ml	68.8±7.5 ^c
WE-Cho	1.0mg/ml	69.8±3.3 ^{b,c}
AE-Cho	0.01mg/ml	70.6±5.4 ^b
AE-Cho	0.1mg/ml	43.0±6.5 ^c
AE-Cho	1.0mg/ml	22.5±4.2 ^c

1 Values are means±SD(n=2) from two separate experiments.

2 Means in a column with different superscript differ, P<0.05.

WE-Cho: Water extract of *Chowiseungcheng-tang*

AE-Cho: 90% alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang*

調胃升清湯 熱水 추출물과 알코올 추출물이 분화된 지방세포의 지방 분해에 미치는 영향은 glycerol 함량을 측정함으로써 조사하였다. 처리시약과 함께 세포를 배양한 뒤, 배양액을 채취하여 Free glycerol determination kit(Sigma, U.S.A. Co.)를 사용하여 측정하였다.

추출물이 포함되지 않은 배지(control)에서 성숙한 분화세포를 3시간 배양한 결과 방출된 glycerol 농도는 116.0μM/L이었다.

調胃升清湯 熱水 추출물이 지방분해에 미치는 효과는 0.01mg/ml 농도 에서는 대조군에 비해 유의적인 차이가 관찰되지 않았고, 0.1 및 1.0mg/ml 농도에서는 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 0.1과 1.0mg/ml의 glycerol 농도는 큰 차이가 없었다(Table 3).

알코올 추출물 역시 0.01mg/ml 농도에서는 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 그러나, 0.1 및 1.0mg/ml 농도 첨가에 따라 방출된 glycerol 농도는 각각 150.1과 212.5μM/L로 유의적으로 증가하여 알코올 추출물은 농도 의존적으로 지방분해를 촉진시킴을 알 수 있었다 (Table 3).

알코올 추출물과 熱水 추출물의 지방분해 효과를 비교 해 보면, 저농도(0.01 및 0.1mg/ml)에서는 방출되는

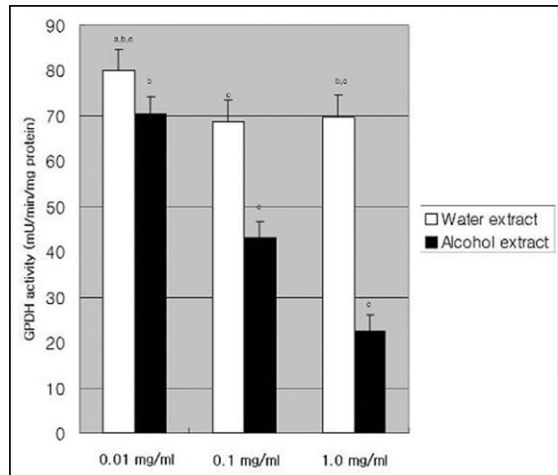


Fig. 5. The effects of *Chowiseungcheng-tang* extracts on glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) activity in 3T3 adipocytes. Cells were treated with 0.01, 0.1 and 1.0 mg/ml concentration for 72hrs. Results are the mean±SD(n=2), and analyzed by Duncan's multiple range test(p<0.05).

(Table 3) The effects of *Chowiseungcheng-tang* extracts on the glycerol release in rat epididymal adipocytes.

Treatment	Concentration	Glycerol ^{1,2} (μmole/L)
	Control	116.0±6.3 ^a
WE-Cho	0.0mg/ml	132.3±4.2 ^{a,b}
WE-Cho	0.1mg/ml	145.7±10.5 ^{b,c,d}
WE-Cho	1.0mg/ml	154.6±14.7 ^d
AE-Cho	0.0mg/ml	127.9±2.1 ^{a,b,c}
AE-Cho	0.1mg/ml	150.1±16.8 ^{c,d}
AE-Cho	1.0mg/ml	212.5±8.4 ^e

1 Values are means±SD(n=2) from two separate experiments.

2 Means in a column with different superscript differ, P<0.05.

WE-Cho : Water extract of *Chowiseungcheng-tang*

AE-Cho : 90% alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang*

glycerol 농도의 차이가 발견되지 않았지만, 1.0mg/ml의 농도에서는 알코올 추출물이 熱水 추출물에 비해 유의적으로 높게 관찰되어 고농도에서 알코올 추출물의 지방분해 효과가 더 높은 것으로 관찰되었다(Fig. 6).

3. 돼지 지방세포의 용해에 미치는 영향

調胃升清湯 알코올 및 熱水 추출물을 각각 10.0, 1.0, 그리고 0.1mg/ml의 농도로 하고, 대조군으로는 각각의 extract를 희석하는데 사용된 0.9% 생리식염수를 처치하여 돼지 지방세포의 용해에 미치는 영향을 관찰하였다.

그 결과 생리식염수의 처치도 지방세포에 약간의 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었다. 調胃升清湯 熱水 추출물은 0.1, 1.0mg/ml의 농도에서는 지방세포에 큰 손상을 야기하지 않는 것으로 관찰되었으나 10.0mg/ml의 농도에서는 광범위한 손상을 일으키는 것이 관찰되었다. 알코올 추출물에서는 전 농도에서 광범위한 세포막의 파괴를 동반한 세포사멸 작용이 일어나고 있음을 알 수 있었다. 따라서 신선한 지방세포에서 알코올 추출 調胃升清湯은 熱水 추출물에 비하여 지방세포 파괴 작용이 더욱 우수함을 알 수 있었다(Fig. 7).

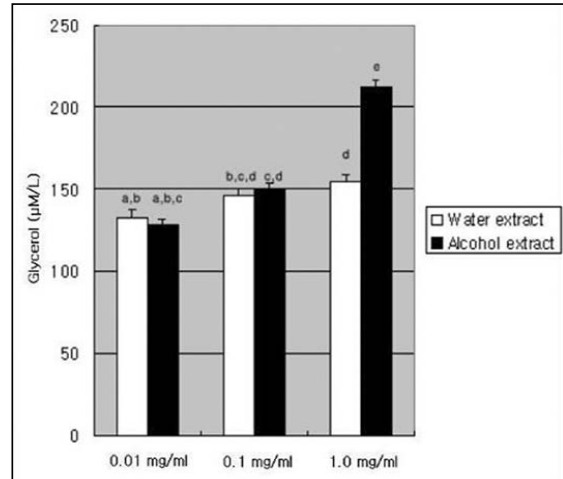


Fig.6. Lipolysis measured by glycerol release in epididymal adipocytes incubated with a range of concentrations of *Chowiseungcheng-tang* extracts. Results are the mean±SD(n=2), and analyzed by Duncan's multiple range test(p<0.05).

IV. 考 察

비만은 체지방이 과잉축적된 상태로 남성의 경우 체지방량이 체중의 25%이상, 여성의 경우 30%이상인 경우로 정의된다^{20,21}.

비만은 오늘날 전 세계 인구의 질병으로 되었으며, 체중증가는 당뇨병, 심장혈관계 질환, 골관절염과 일부 암의 증가와 같은 질병과의 관련성을 높여 비만의 치료에는 직접 또는 간접으로 높은 비용이 소요된다²².

최근에는 전향적 연구를 통해 복부 지방 축적과 사망률 증가의 인과관계가 확인되고 있어²³⁻²⁵ 특히 복부비만(내장 지방 비만)에 주목을 하고 있다. Reaven은 제 2형 당뇨병과 관상동맥 질환의 위험인자로 알려진 고혈압, 이상 지질혈증(혈중 중성지방치 상승, LDL 입자 구성의 변화, 혈중 HDL 콜레스테롤 수치 저하), 당불내성, PAI-1 상승, 비만(특히 상체비만) 등이 함께 발현하는 것은 인슐린 저항성과 관련이 있다고 주장하고 이를 X 증후군(Syndrome X)이라고 하였으며²⁶, 이후 인슐린 저항성 증후군²⁷, 대사 증후군²⁸ 등으로도 불려왔다. 복부 지방 축적과 인슐린 저항성이 밀접한 연관성을 보이는 것은 이후 많은 연구에서 확인되었고, 이는 복부 비만과 제 2형 당뇨병 및 관상동맥질

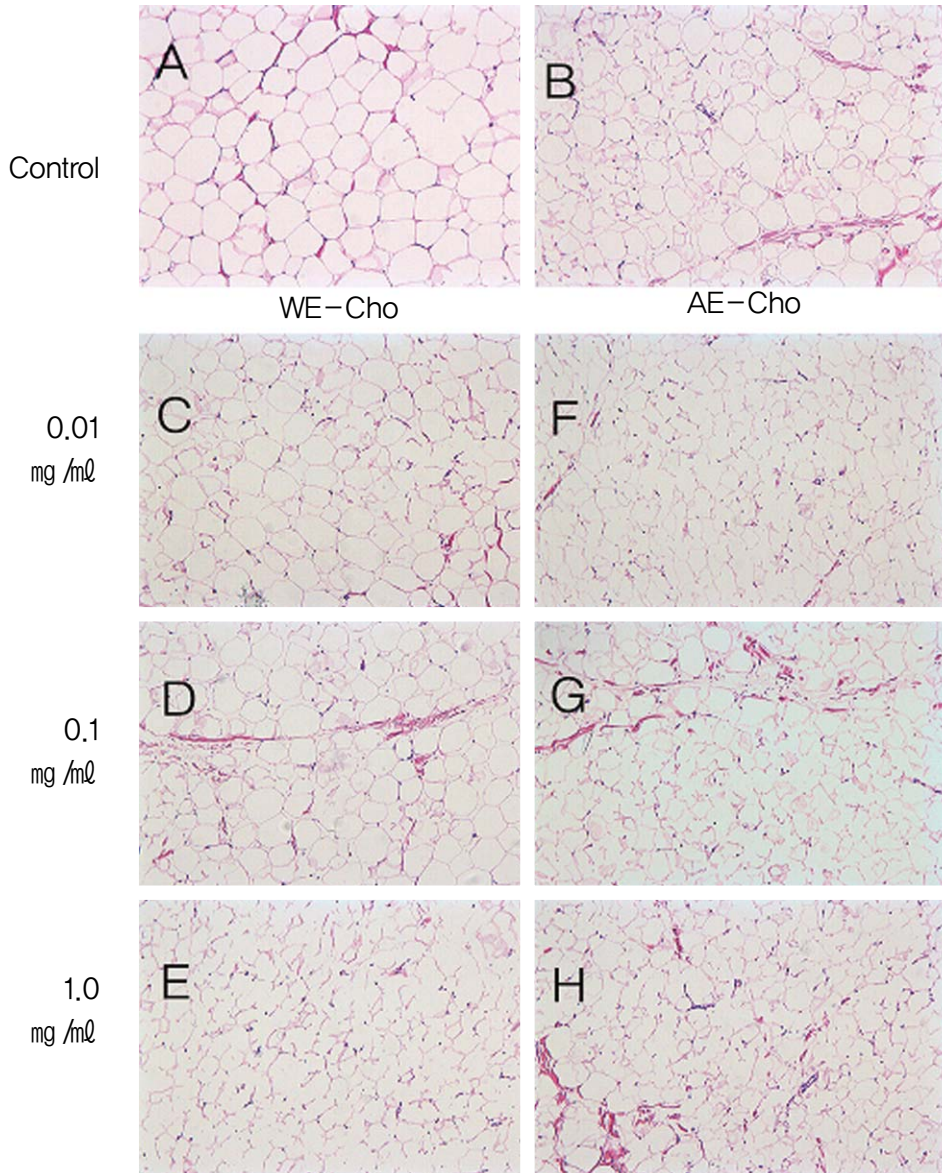


Fig.7. Microscopy images of porcine lipocytes treated with *Chowiseungcheng-tang* extracts depend on concentrations (x100).

- A : Normal fat tissues of porcine
- B : Control treated with 0.9% Normal Saline
- C : Treated with 0.01 mg/mL water extract of *Chowiseungcheng-tang*
- D : Treated with 0.1 mg/mL water extract of *Chowiseungcheng-tang*
- E : Treated with 1.0 mg/mL water extract of *Chowiseungcheng-tang*
- F : Treated with 0.01 mg/mL alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang*
- G : Treated with 0.1 mg/mL alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang*
- H : Treated with 1.0 mg/mL alcohol extract of *Chowiseungcheng-tang*

환을 있는 중요한 연결고리로 이해되고 있다²⁹⁾.

비만에 대하여 한의학에서는 《內經》³⁰⁾에서 “膈肉堅皮滿者肥”로 최초 언급된 이래 肥³⁰⁾, 肥人³⁰⁾, 肥白人³¹⁾, 肥疔症³²⁾, 肥疔病³²⁾ 등으로 표현되고 있으며, 기존 연구에 따르면 비만인의 대다수는 太陰人인 것으로 나타나고 있다³³⁾.

비만의 원인은 內的要因과 外的要因으로 크게 분류하는데, 內的要因은 氣虛의 虛證과 濕, 痰, 熱 등의 實證 및 內傷七情 등이고, 外的要因은 活動減少, 外感濕邪, 膏粱飲食의 過食 등이다¹⁾.

비만의 치료에는 虛證인 경우에는 健脾, 益氣, 補腎, 溫陽, 養陰하는 治法을 주로 응용하고, 實證인 경우에는 祛濕(化濕), 化痰(祛痰), 利水, 消導, 活血, 化痰, 通腑하는 治法이 주로 응용되며, 그 외에 疎肝利膽, 升降三焦하는 治法을 사용하는데, 그 중에서도 虛證인 경우에는 健脾法, 實證인 경우에는 祛濕除痰法이 주로 사용되고 있다³⁴⁾.

현재까지 비만의 한의학적 치료와 관련하여 신 등³⁵⁾은 비만의 치료에 관한 임상적 비교 연구에서 肥滿鍼의 효과를 피력했으며, 박 등³⁶⁾은 耳鍼治療의 체중감소효과에 대한 임상연구결과를 보고했고, 정 등³⁷⁾은 비만환자의 電鍼治療 임상례를 보고했으며, 김 등³⁸⁾은 비만 치료 및 예방에 대한 한약의 효능 연구에서 임상에서 많이 사용되는 體減輕行血薏苡仁湯, 體減輕補血安神湯, 肥減丸의 효과를 입증했으며, 최근에는 蒼朮, 薏苡仁, 麻黃, 蒼朮合薏苡仁, 麻黃合綠茶, 赤小豆, 熊膽, 牛黃, 山查, 蘿菔子 등의 藥鍼이 비만에 미치는 영향에 대한 연구 등 약침과 비만과의 관련성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다³⁹⁻⁴³⁾.

비만에 있어 藥鍼療法은 비만의 가장 대표적인 병리인 濕痰에 직접적인 주사요법을 사용함으로써 국소적인 셀룰라이트(cellulite : 피하에 정체되어 있는 지방, 수분 그리고 신진대사 배설물 등 복합적인 물질로 이루어져 있으며, 한의학적 병리에서의 濕痰과 비슷하다고 볼 수 있다⁴⁴⁾)의 제거 및 전신적인 증상에 대한 내과적인 치료를 할 수 있는 방법이다. 이는 약리이론과 경락이론의 병행이라는 장점을 갖고 있어 일관된 병리에 따른 치료지침을 제공할 수 있을 뿐 아니라 內服만으로도 치료해 오던 약물치료의 단순함을 극복하고 또 內服이 어려운 환자들에게까지 응용할 수 있어서 비만의 한의학적 치료방법을 다양화시킬 수 있을 것으로 생각되고 있다⁴⁴⁾.

본 연구에 사용된 調胃升清湯은 食後痞滿 腿脚無力 中消 善飢者⁶⁾에 사용되는 처방으로 《東醫壽世保元》⁹⁾에 太陰人의 胃脘受寒表寒病 중 肺燥寒症에 사용되는 太陰調胃湯에 蘿菔子の 양을 줄이고(2錢 → 1.5錢) 遠志, 天門冬, 酸棗仁,

龍眼肉 등 安神藥類를 加味한 것이다^{7,10)}. 天門冬은 清熱化痰 潤燥한다고 하는데 이때의 清熱은 虛熱을 다스리는 의미로 생각된다. 酸棗仁, 遠志, 龍眼肉은 安神시키는데, 遠志는 祛痰하면서 安神시키고, 酸棗仁은 心臟을 편안하게 하면서 安神시키고, 龍眼肉은 心臟을 補하면서 安神시킨다. 그리고 크게 보면 虛熱을 제거하는 것도 安神시킨다고 볼 수 있다¹⁰⁾. 즉, 이 처방은 이미 비만의 약물치료로 널리 응용되고 있는 太陰調胃湯에 安神과 發汗의 효과를 증강시킨 처방이라고 볼 수 있는데⁷⁾, 石菖蒲, 遠志, 酸棗仁, 龍眼肉 등의 補心安神하는 약물 구성으로 스트레스로 인한 폭식에 유효한 효과를 거둘 수 있으며, 특히 麻黃의 加減으로 적절한 체중 감소의 효과를 얻을 수 있으리라 사료된다^{8,10)}.

麻黃은 에페드라(ephedra)가 함유된 약용식물로 한의학에서는 강력한 發汗藥으로 腠理에서 營衛氣血이 운행하는 것을 發散하고 全身經絡을 通行하여 發汗하고 肺經壅塞을 宣通하니 營衛가 壅塞하여 無汗하기 쉬운 太陰人 체질에 쓰이는 약물이다^{8,45)}. 麻黃은 특히 음식섭취의 감소를 유발하고, 에너지 소비를 증가시켜 체중을 감소시키는 부가적인 효과가 있다고 보고되고 있다⁴⁶⁾.

이러한 효과를 가진 調胃升清湯과 비만에 관련하여 신 등⁷⁾은 調胃升清湯 및 그 加味方이 비만마우스의 체중과 혈청 함량 변화에 미치는 영향 연구에서 調胃升清湯과 調胃升清湯加味方의 체중감소효과 및 지질감소효과 등을 입증하였고, 서 등⁸⁾은 비만 환자에 대한 調胃升清湯의 효과 및 부작용에 관한 임상적 관찰 보고에서 특히 太陰人에게 調胃升清湯을 투여한 경우 효과적인 체중감량이 있었다는 등의 결과를 보이는 등 현재까지 연구 보고는 있어왔으나 소수에 그쳤으며, 더욱이 대부분 熱水 추출물의 형태로만 실험에 사용되었고 알코올 및 熱水 추출방식에 따른 調胃升清湯이 지방세포 대사에 미치는 영향에 관한 비교 연구는 아직까지 이루어지지 않았다.

따라서 저자는 본 연구에서 調胃升清湯의 알코올 및 熱水 추출물이 지방세포의 분화와 분해에 어떤 영향을 미치는지 비교 연구하여 보다 더 효과적인 치료를 위한 추출방식에 대하여 고찰해 보고자 했고, 추출액의 돼지 복부 지방층 주입으로 국소 지방세포에 미치는 영향을 관찰하여 실험에서 시행한 시술과 비슷한 방식이라 사료되는 약침요법의 국소 비만 치료 가능성 및 효과를 알아보려고 했다.

3T3 미분화 지방세포(preadipocyte, Fig. 2 A)를 배양한 결과 배양 10일째에 성숙된 지방세포가 형성됨을 알 수

있었다(Fig. 2 B). 지방세포의 형성을 확인하기 위하여 세포질 내에 축적된 중성지방(triglyceride)을 염색하는 시약인 Oil Red O를 이용하여 세포 염색을 시행한 결과 성숙 지방세포의 형성이 잘 되었음을 알 수 있었다(Fig. 2 C&D).

본 실험에 사용된 전지방세포(preadipocyte)인 3T3-L1 세포는 3T3 세포로부터 유래된 細胞柱로서 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있고, 적절한 조건 아래에서 배양하면 지방세포(adipocyte)로 분화하는 성질을 갖고 있어 지방세포의 대사과정은 물론 지방축적과 지방세포의 분화과정을 연구하는데 널리 사용되고 있다⁴⁷⁻⁵⁰.

調胃升清湯의 알코올 및 熱水 추출물이 지방세포의 분화에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여 농도별 분화에 미치는 영향과 GPDH 활성에 미치는 영향을 관찰해 보았다.

먼저 알코올 추출물과 熱水 추출된 調胃升清湯 extract를 각각 1.0mg/ml, 0.1mg/ml, 그리고 0.01mg/ml의 농도로 하여 3T3 지방전구세포의 분화 전 단계에서 배지에 처리한 후 농도별로 지방세포의 분화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 熱水 추출물은 대조군에 비하여 전 농도에서 차이를 나타내지 않고 비교적 광범위한 지방세포의 형성을 나타내는 것으로 관찰되었다(Fig. 3 C-E). 알코올 추출물은 대조군에 비하여 1.0mg/ml에서는 현저하게 분화를 억제하고 있었고, 0.1mg/ml의 농도에서는 약간의 억제를, 0.01mg/ml의 농도에서는 뚜렷한 차이를 나타내지 못하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3 F-H).

그리고, Oil Red O를 이용하여 세포 염색을 시행한 결과 熱水 추출물은 1.0mg/ml의 농도에서, 알코올 추출물은 1.0mg/ml, 0.1mg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 지방세포의 분화를 억제하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

이상의 결과를 종합해 보면 調胃升清湯 추출물은 고농도(특히 1.0mg/ml)에서 지방세포의 분화 기전에 작용하며, 熱水 추출물보다는 알코올 추출물의 분화억제 효과가 더욱 좋은 것으로 나타났다.

그리고, 調胃升清湯 알코올 및 熱水 추출물이 전지방세포로부터 지방세포로의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 GPDH 활성을 측정하였다. GPDH는 지방세포의 형성에 관여하는 중요한 효소로 미분화 3T3 지방세포가 성숙한 분화 지방세포로 전환됨에 따라 GPDH 효소 활성은 증가하게 된다.

調胃升清湯 熱水 추출물의 첨가 농도에 따른 GPDH 활성은 0.1mg/ml 농도 이외에는 변화가 관찰되지 않았다. 즉,

熱水 추출물은 지방합성에 영향을 거의 미치지 못하였음을 알 수 있었다. 반면, 알코올 추출물은 0.01, 0.1 및 1.0 mg/ml 농도 첨가에 따라 GPDH 활성은 각각 70.6, 43.0 및 22.5 mU/min/mg protein으로 감소하여(Table 2.) 농도 의존적으로 GPDH 활성을 감소시켰고, 특히 0.1 및 1.00mg/ml 농도에서 대조군보다 유의한 억제를 나타내었다.

調胃升清湯 알코올 및 熱水 추출물의 지방합성 억제효과를 비교해 보면, Fig. 5에서와 같이, 0.1 및 1.0mg/ml의 농도에서 알코올 추출물이 熱水 추출물에 비해 GPDH 활성을 각각 현저히 감소시켜 알코올 추출물이 熱水 추출물보다 지방합성을 현저히 억제시킴을 알 수 있었다.

調胃升清湯 알코올 및 熱水 추출물이 분화된 지방세포의 지방 분해에 미치는 영향은 glycerol 함량을 측정함으로써 조사하였다. 지방은 glycerol과 fatty acid로 분해되므로 glycerol의 함량이 많아지는 것은 지방세포의 분해가 증가되었음을 의미한다.

그 결과, 調胃升清湯 알코올 및 熱水 추출물 모두 0.1 및 1.0mg/ml 농도에서 방출된 glycerol 농도가 유의적으로 증가하여 지방분해를 촉진시켰음을 알 수 있었다(Table 3). 또한 1.0mg/ml의 농도에서는 알코올 추출물이 熱水 추출물에 비해 glycerol 농도가 유의적으로 높게 관찰되어 고농도에서 알코올 추출물의 지방분해 효과가 더 높은 것으로 관찰되었다(Fig. 6).

調胃升清湯 알코올 및 熱水 추출물이 돼지 지방세포의 용해에 미치는 영향을 알아보기 위해 알코올 추출물과 熱水 추출된 調胃升清湯 extract를 각각 농도별로 10.0, 1.0, 그리고 0.1mg/ml로 희석하여 1.0ml, 26gauge 주사기에 준비한 후 돼지의 지방층에 주입한 결과 調胃升清湯 熱水 추출물은 10.0mg/ml의 농도에서만 지방세포에 광범위한 손상을 일으켰으나, 調胃升清湯 알코올 추출물은 전 농도에서 광범위한 세포막의 파괴를 동반한 세포사멸 작용을 일으켰음을 알 수 있었다. 따라서 신선한 지방세포에서 調胃升清湯 알코올 추출물은 熱水 추출물에 비하여 지방세포 파괴 작용이 더욱 우수함을 알 수 있었다(Fig. 7).

이상 調胃升清湯 알코올 및 熱水 추출물이 지방세포의 분화, 분해에 미치는 영향 및 돼지 지방세포의 용해에 미치는 영향을 관찰해 본 결과 특히 調胃升清湯 알코올 추출물이 熱水 추출물에 비하여 일정한 효과를 나타내어 전반적으로 비만 치료에 더 큰 효과를 나타낼 것으로 보였다. 따라서 비만 치료제로서의 한약 복합제제의 추출 방식이 치료 효과에 큰 영향을 미칠 것이라 생각되는바 기존의 熱

水 추출방식보다 더 효율적인 추출방식의 개발이 필요하다고 사료된다. 또한 돼지 지방세포의 용해에 미치는 영향에 관한 결과에서 약침치료가 국소 비만 치료에 도움이 될 수 있을 것이라 미루어 짐작할 수 있었으며 앞으로 보다 더 심도 깊은 연구가 이루어져 특히 최근 문제시 되고 있는 대사증후군과 관련된 인슐린 저항성 발생의 중요한 요인인 복부 비만의 치료에 활용된다면 임상적으로 큰 도움이 될 것이라 생각된다.

V. 結論

調胃升清湯의 추출 방식에 따른 비만 치료 효과를 알아보기 위해 3T3-L1 세포(preadipocytes)와 rat의 정소상체 지방세포(adipocytes)를 이용하여 지방세포의 분화와 분해에 미치는 영향을 관찰하였고, 생체 지방세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 돼지의 지방조직에 처리한 후 조직학적 관찰을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 농도별 지방세포의 분화에 미치는 영향을 관찰해 본 결과 調胃升清湯 추출물은 고농도(특히 1.0mg/ml)에서 지방세포의 분화 기전에 작용하며, 熱水 추출물보다는 알코올 추출물의 분화억제 효과가 더욱 좋은 것으로 나타났다.
2. 調胃升清湯 알코올 추출물과 熱水 추출물의 지방합성 억제효과를 비교해 보면, 0.1 및 1.0mg/ml의 농도에서 알코올 추출물이 熱水 추출물에 비해 GPDH 활성을 각각 현저히 감소시켜 알코올 추출물이 熱水 추출물 보다 지방합성을 현저히 억제시킴을 알 수 있었다.
3. 調胃升清湯 알코올 추출물과 熱水 추출물 모두 0.1 및 1.0mg/ml 농도에서 방출된 glycerol 농도가 유의적으로 증가하여 지방분해를 촉진시켰음을 알 수 있었다. 또한 1.0mg/ml의 농도에서는 알코올 추출물이 熱水 추출물에 비해 glycerol 농도가 유의적으로 높게 관찰되어 고농도에서 알코올 추출물의 지방분해 효과가 더 높은 것으로 관찰되었다.
4. 調胃升清湯 추출물을 돼지의 지방층에 주입한 결과 調胃升清湯 熱水 추출물은 10.0mg/ml의 농도에서만

지방세포에 광범위한 손상을 일으켰으나, 調胃升清湯 알코올 추출물은 전 농도에서 광범위한 세포막의 파괴를 동반한 세포사멸 작용을 일으켰음을 알 수 있었다. 따라서 신선한 지방세포에서 調胃升清湯 알코올 추출물은 熱水 추출물에 비하여 지방세포 파괴 작용이 더욱 우수함을 알 수 있었다.

이상의 결과로 알코올 추출물이 熱水 추출물에 비하여 전반적으로 비만 치료에 더 큰 효과를 나타낼 것으로 생각되며, 향후 국소부위 비만 치료에 유효하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 參考文獻

1. 全國韓醫科大學 再活醫學科學教室. 東醫再活醫學科學. 서울: 書苑堂; 1995, p. 570-85.
2. Diehle HS, Darlynple W. Obesity and Digestive disorder and disease. Healthful living. New York: McGraw-Hill; 1973, p. 65-8.
3. National Heart, Lung, and Blood Institute in cooperation with The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. The Evidence Report: National Institute of Health, 1998: Available from URL: <http://www.nhlbi.nih.gov/guideline/obesity/ob.home.htm>
4. CDC(Centers for Disease Control and Prevention). Resource Guide for Nutrition and Physical Activity Interventions to Prevent Obesity and Other Chronic Diseases : Available from URL: <http://www.cdc.gov/hccphp/dnpa/sitemap.htm>
5. 탁양주, 이영성, 이진석, 강재현. 최근 국내 비만 연구의 경향: 1984년부터 2002년까지. 대한비만학회지. 2004;13(1):1-13.
6. 박인상. 東醫四象要訣. 서울: 소나무; 1992, p.156.
7. 李濟馬. 東醫壽世保元. 서울: 행림출판사; 1986, p. 7, 107-11, 123
8. 서동민, 이상훈, 이재동. 비만 환자에 대한 調胃升清

- 湯의 효과 및 부작용에 관한 임상적 관찰. 대한침구학회지. 2005;22(3):145-53.
9. 李濟馬. 東醫壽世保元. 서울: 행림출판사; 1986, p. 7, 107-11, 123.
 10. 류주열. 東醫四象醫學講座. 경기: 대성의학사; 2003, p. 631-8.
 11. 보건복지부. 한약재 수급 및 유통관리 규정 제 2조 2항 보건복지부고시 제 2006-69호. 2006.
 12. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Braga M, Yuan X, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: Nuclear translocation of androgen receptor complex with β -catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology*. 2006;147:141-54
 13. Negrel R, Dani C. Culture of adipose precursor cells and cells of clonal lines from animal white adipose tissue. In *Adipose Tissue Protocols*, G. Ailhaud(ed). Totowa, NJ: Human Press, Inc.; 2001, p 225-37.
 14. 안영성, 성낙술, 함인혜, 최호영. 부평의 면역 및 항암 활성 연구. 대한보초학회지. 2004;19(3):117-127.
 15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 1976;72:248-54.
 16. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem*. 1964;239:375-80.
 17. Zalatan F, Krause JA, Blask DE. Inhibition of isoproterenol-induced lipolysis in rat inguinal adipocytes in vitro by physiological melatonin via a receptor-mediated mechanism. *Endocrinology*. 2001;142:3783-90.
 18. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem*, 1983;29:538-42.
 19. Steel RGD, Torrie JH. *Principles and Procedures of Statistics*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1980, p. 187-8.
 20. 이광우. 비만증의 진단과 평가. 대한비만학회지. 1992;1(1):1-4.
 21. 대한비만학회. 임상 비만학(제2판). 서울: 고려의학; 2001, p. 19-28.
 22. 김영설. 비만증의 진단과 평가. 대한비만학회지 제 11권 부록 제 2호(대한비만학회 제 5회 연수강좌). 2002:3-8.
 23. Fontbonne A, Thibault N, Eschwège E, Ducimetière P. Body fat distribution and coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes mellitus: the Paris Prospective Study, 15-year follow up. *Diabetologia*. 1992;35:464-8.
 24. Folsom AR, Kaye SA, Sellers TA, Hong C-P, Cerhan JR, Potter JD, Prineas RJ. Body fat distribution and 5-year risk of death in older women. *Journal of the American Medical Association*. 1993;269:483-7.
 25. Kalmijn S, Curb JD, Rodriguez BL, Yano K, Abbott RD. The association of body weight and anthropometry with mortality in elderly men: The Honolulu Heart Program *International Journal of Obesity*. 1999;23:395-402
 26. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595-607.
 27. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin resistance syndrome (Syndrome X). *Diabetes*. 1992;41:715-22.
 28. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*. 1999;83:25F-9F.
 29. Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiological Reviews*. 1994;74:761-811.
 30. 王冰. 黃帝內經靈樞. 臺北: 臺灣中華書局; 1972, p. 155, 209.
 31. 李槌. 編註醫學入門. 서울: 大星文化社; 1990, p.(外

- 集卷一)278, p.(外集卷二)108.
32. 陳貴延. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京:中國醫藥科學技術出版社; 1991, p. 682-9.
 33. 김달래, 백태현. 四象體質과 肥滿의 상관성에 관한 임상적 연구. 사상의학회지. 1996;8(1):319-35.
 34. 조홍진, 김병덕. 肥滿症의 原因과 病機 및 治法에 관한 文獻的 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1992;1(2):61-71.
 35. 신현대, 김성수, 이응세. 肥滿의 治療에 關한 臨床的 比較 研究. 대한한학회지. 1992;13(2):63-73.
 36. 박상용, 이병열. 肥滿 治療에 대한 鍼灸 및 藥物治療의 臨床的 研究. 大田大學校 論文集 韓醫學編. 1994;2(2):163-85.
 37. 정선희, 남상수, 김용석, 이재동, 최도영, 고희균 등. 肥滿患者의 電鍼治療 臨床例. 대한침구학회지. 1999;16(3):39-56.
 38. 김연섭, 변성희, 서부일, 김상찬, 국 만, 조웅행. 비만 치료 및 예방에 대한 한약의 효능 연구(II). 대한본초학회지. 2000;15(1):73-82.
 39. 윤대환, 강자돈, 주준성, 채우석, 나창수. 高脂肪食餌로 誘發된 肥滿白鼠모델에서 蒼朮, 薏苡仁, 麻黃, 蒼朮合薏苡仁, 麻黃合綠茶 藥鍼이 血清脂質 및 肝機能에 미치는 影響. 제 3회 대한약침학회 학술대회 논문집. 2004;7(1):87-100.
 40. 지준환, 이준무. 赤小豆蒸溜藥鍼이 肥滿쥐의 脂質構成, 肝臟機能, 抗酸化效果 및 分子生物學的 特性에 미치는 影響. 대한약침학회지. 2005;8(2):67-82.
 41. 조희철, 이시형, 신조영, 김강산, 조남근, 권기록, 임태진. 熊膽과 牛黃藥鍼이 지방세포 대사에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007;24(4) :125-42.
 42. 정영표, 윤여충, 윤대환. 胃俞의 山査 藥鍼이 高脂肪食餌로 誘發된 肥滿白鼠에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2007;24(4):55-68.
 43. 강수우, 위통순, 윤대환. 脾俞에 대한 蘿蔔子 藥鍼이 고지방 식이로 유발된 肥滿白鼠에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007;24(5):113-25.
 44. 주집성, 채우석, 신미숙, 나창수. 肥滿 治療를 위한 經穴 및 藥物에 關한 考察. 대한경락경혈학회지. 2003;20(3):147-62.
 45. 김호철. 韓藥藥理學. 서울: 集文堂; 2001, p.63-6.
 46. Astrup A, Breum L, Toubro S, Hein P, Quaade F. Ephedrine and weight loss. Int J Obes Relat Metab Disord. 1992 Sep;16(9):715.
 47. Green H, Kehinde O. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. Cell. 1974;1:113-6
 48. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. Cell. 1974;3:127-33.
 49. 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.
 50. Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion. Cell. 1976;7:105-13.