

원저

추출방식에 따른 防風通聖散이 지방세포 대사에 미치는 영향

이상민* · 김병우* · 권기록** · 임태진*** · 김동희****

* 상지대학교 한의과대학 내과학교실

** 상지대학교 한의과대학 침구학교실

*** 상지대학교 응용동물과학부

**** 연세대학교 원주의과대학 환경의생물학교실

The Effect of *Bangpungtongsung-san* Extracts on Adipocyte Metabolism

Sang Min, 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

*** Division of Animal resources and life science, Sangji University

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

ABSTRACT

- Objective** The purpose of this study is to investigate the effects of *Bangpungtongsung-san* extracts on the preadipocytes proliferation, of 3T3-L1 cell line. lipolysis of adipocytes in rat's epididymis and localized fat accumulation of porcine by extraction methods(alcohol and water).
- Methods** Diminish 3T3-L1 proliferation and lipogenesis do primary role to reduce obesity. So, 3T3-L1 preadipocyte and adipocytes were performed on cell cultures, and using Sprague-Dawley rats for the lipogenesis, and treated with 0.01-1 mg/ml *Bangpungtongsung-san* Extracts depend on concentrations. Porcine skin including fat tissue after treated *Bangpungtongsung-san* Extracts by means of the dosage dependent variation are investigated the histologic changes after injection of these extracts.
- Results** Following results were obtained from the 3T3-L1 preadipocyte proliferation and lipolysis of adipocyte in rats and histologic investigation of fat tissue.
1. *Bangpungtongsung-san* extracts were showed the effect of decreased preadipocyte proliferation on the high dosage(1.0mg/ml).
 2. *Bangpungtongsung-san* extracts were showed the effect of decreased the activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) on the high dosage(1.0mg/ml) and Specially, alcohol extract of *Bangpungtongsung-san* was clear as time goes by high concentration.
 3. *Bangpungtongsung-san* extracts were showed tries to compare the effect of lipolysis, alcohol extract of *Bangpungtongsung-san* on the high dosage(1.0mg/ml) was observed the effect is higher than water extract.
 4. Investigated the histological changes in porcine fat tissue after treated *Bangpungtongsung-san* extracts, we knew that water extract of *Bangpungtongsung-san* was showed the effect of lipolysis on the high dosage(10.0mg/ml) and alcohol extract of *Bangpungtongsung-san* was showed significant activity to the lysis of cell membranes in all concentration.
- Conclusion** These results suggest that *Bangpungtongsung-san* extracts efficiently induces diminish proliferation of preadipocyte and lipolysis in adipose tissue.

key words *Bangpungtongsung-san*, alcohol extract, Water extracts, 3T3-L1 preadipocyte, adipocytes, lipolysis, Fat tissues.

I. 緒論

비만(obesity)이란 대사장애로 인해 체내에 지방이 과잉 축적된 상태로 칼로리 섭취가 신체활동과 성장에 필요한 에너지보다 초과되어 열량 불균형으로 일어나는 현상¹⁾으로 체내의 지방이 남자는 체중의 25%이상, 여자는 체중의 30%이상인 경우를 말한다²⁾. 2005년 국민건강 영양조사에 의하면 20세 이상의 성인 중 31%가 비만이며, 남성의 경우 35.2%, 여성의 경우 28.3%가 비만으로 보고되고 있다³⁾.

비만의 병인으로는 유전, 가족이나 사회적 습관, 기초대사율과 신체활동의 저하, 칼로리 섭취의 증가, 환경적 요인, 약물, 심리적요인, 등이 있고, 그 외에 심리적 요인으로 우울증, 불안, 불쾌감 등이 비만증을 악화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴⁾.

국내에서는 비만의 치료 및 연구와 관련하여 문헌고찰⁵⁻⁸⁾과 단미제^{9,10)}, 복합방¹¹⁻¹³⁾의 한약을 이용한 약물요법이나 이침¹⁴⁾, 전침¹⁵⁾, 약침^{16,17)}등의 연구가 이루어지고 있으며, 유전자관련 연구¹⁸⁾와 행동수정요법¹⁹⁾, 정신요법²⁰⁾등이 연구되어지고 있으며, 국소비만치료 연구도 북부위주로 시작되고 있는 단계이다.

防風通聖散은 金代 劉河間의《宣明方論》에 최초로 收載된 방제로서 一切의 風熱과 飢飽勞役의 內外諸邪에 損傷되어 氣血이 沸鬱하고 表裏와 三焦가 俱實한 證을 治療할 목적으로 立方되었다²¹⁾.

2000년 이후 비만 치료관련 발표된 논문의 處方과 本草를 조사한 바에 의하면 四象處方 및 體減薏苡仁湯, 防風通聖散 순으로 자주 처방되는 것으로 나타나 이와 같은 결과는 비만치료에도 많이 사용되고 있음을 시사한다²²⁾.

肥滿 및 肥滿과 관련한 합병증에 대한 防風通聖散의 效能을 직간접적으로 확인하기 위한 실험적 연구는 여러 차례 시행되어, 安²³⁾의 防風通聖散이 비만유도백서의 체중 및 지질대사에 미치는 영향, 黃²⁴⁾의 防風通聖散이 고지방사료 식이로 유발된 비만 생쥐에서 비만유전자 및 관련인자에 미치는 영향, 申²⁵⁾의 防風通聖散이 白鼠의 肥滿症 및 肥滿細胞에 미치는 影響 등 다양하게 연구되어져 왔다. 그러나, 아직 防風通聖散의 추출방식에 따른 비만치료에 대한 효과의 차이를 검증한 연구는 부족한 실정이다.

이에 저자는 防風通聖散이 藥物의 추출방식에 따라서는 어떻게 효과가 달라지는가를 알아보고, 국소비만치료제로

서 적절한지 가능성을 알아보고자 3T3-L1(이하 3T3라 함) 지방세포를 이용하여 지방세포의 분화능 억제효과와 rat의 성숙지방세포의 분해에 미치는 영향을 관찰하였고, 돼지의 지방조직에서 조직학적 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材料

1) 防風通聖散 추출물의 조제

실험에 사용한 防風通聖散은 한약재 수급 및 유통관리 규정²⁶⁾에 의거한 규격품을 사용하였다(Table 1). 추출방식에 따른 효능을 비교 평가하기 위하여 알코올 추출물과 熱水 추출물을 조제하였다.

알코올 추출물은 10貼 분량의 防風通聖散 510g을 둥근 플라스크에 넣고 90% 알코올 2,000ml에 24시간동안 방치한 후 rotary evaporator로 감압 농축하여 102.5g의 extract를 얻어 실험에 사용하였다.

熱水 추출물은 동량의 藥材를 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.

2) 3T3 지방세포 및 시약

3T3-L1 mouse embryo fibroblast는 American Type Culture Collection(U.S.A.)에서 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 sulfoxide는 Cambrex사(U.S.A.)로부터 구입하였다. Insulin, isobutylmethylxanthine(I BMX), 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 rat를 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 실험에 사용하였다.

(Table 1) The Contents of Bangpungtongsung-san

韓藥名	生藥名	Dose(g)/1貼基準
滑石	Talcum	7
甘草	Glycyrrhizae Radix	5
石膏	Cypsum Fibrosum	3
黃芩	Scutellariae Radix	3
桔梗	Platycodi Radix	3
防風	Sileris Radix	2
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
薄荷	Menthae Folium	2
連翹	Forsythiae Fructus	2
芒硝	Sodii Sulfas	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		51g

2. 方法

1) 지방전구세포의 배양

3T3 mouse embryo fibroblast는 Singh 등²⁷⁾의 방법에 따라 배양하였다. 즉, 3T3 세포들은 10% BCS를 포함한 DMEM 배지를 사용하여 8.5×10^3 cells/cm²이 되도록 60-mm culture dish에 분주한 다음 37℃ CO₂

incubator에서 배양하였다. 100%confluence에 도달 (Day 0)하면, 3T3 세포들은 10% FBS, 1.7 μM insulin, 0.5mM IBMX, 1μM dexamethasone을 포함한 DMEM 배지로 교체하고 3일 동안 배양하여 분화를 유도하였다. 防風通聖散 알코올 및 熱水 추출물이 지방전구세포의 배양에 미치는 효과를 조사하기 위해 0.01, 0.1, 1.0mg/ml 농도의 추출물이 포함된 분화 유도 배지로 배양하였다. 분화 유도가 끝난 뒤 실험 종료 시(Day 10)까지 10% FBS와 167nM insulin이 포함된 DMEM 배지로 배양하였다. 세포배양액은 2일 간격으로 교체하였다.

2) 지방세포의 분화측정

① Oil Red O 염색

防風通聖散 추출물이 전지방세포로부터 지방세포로의 분화(지방합성)에 미치는 영향은 Negrel 과 Dani의 방법²⁸⁾에 따라 Oil Red O 염색을 실시하였다. 즉, 실험 종료시 (day 10)에 세포를 phosphate-buffered 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 glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH)

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.

상등액 내의 전지방세포로부터 지방세포로의 분화에 미치는 영향은 지방 생성 및 GPDH 활성을 측정함으로써 조사하였다. 분화 과정 동안 防風通聖散 추출물을 처리하고 세포를 배양한 뒤 plate로부터 세포를 분리한 다음, sonication 시키고 원심 분리하여 상등액을 수거하였다. 상등액내의 GPDH 활성은 Wise와 Green의 방법²⁹⁾에 따라 spectrophotometer(U.S.A.)를 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 방법³⁰⁾에 따라 측정하였다.

3) 지방세포의 분해측정

rat의 성숙 지방세포의 분리는 Rodbell 방법³¹⁾을 수정한 Zalatan 등의 방법³²⁾에 따라 실시하였다. 즉, 수컷 Sprague-Dawley(200-250g) rat으로부터 정소상체 지방조직을 떼어내어 잘게 절단한 다음, collagenase(1.0 mg/ml)와 BSA(10mg/ml)가 포함된 Krebs-Ringer 용액을 이용하여 37°C에서 1시간 분해시켰다. 분해된 조직액을 250 μm 여과 메쉬를 통해 여과시키고 250xg에서 10분간 원심 분리하여 전지방세포를 침전시켰다. 상등액에 위치한 지방세포층을 수거하여 두 차례 세척을 한 다음, 지방세포수를 측정하였다. 50-ml conical tube에 5×10⁶ cells/ml이 되도록 분주한 다음 37°C CO₂ incubator에서 3시간 동안 배양하였다. 추출물이 지방분해에 미치는 효과를 조사하기 위해 처리시약과 함께 3시간 배양한 다음, free

glycerol을 표준시약으로 사용하여 McGowan 등의 방법³³⁾에 따라 배양액 내 glycerol 함량을 측정하였다.

4) 돼지 지방세포의 용해에 미치는 영향

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

熱水 및 알코올 추출 防風通聖散 extract를 각각 농도 별로 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°C에서 한 시간 동안 배양 후, 생검 검사물을 주입한 자리에서 추출하였다. 실험은 세 번 반복 시행

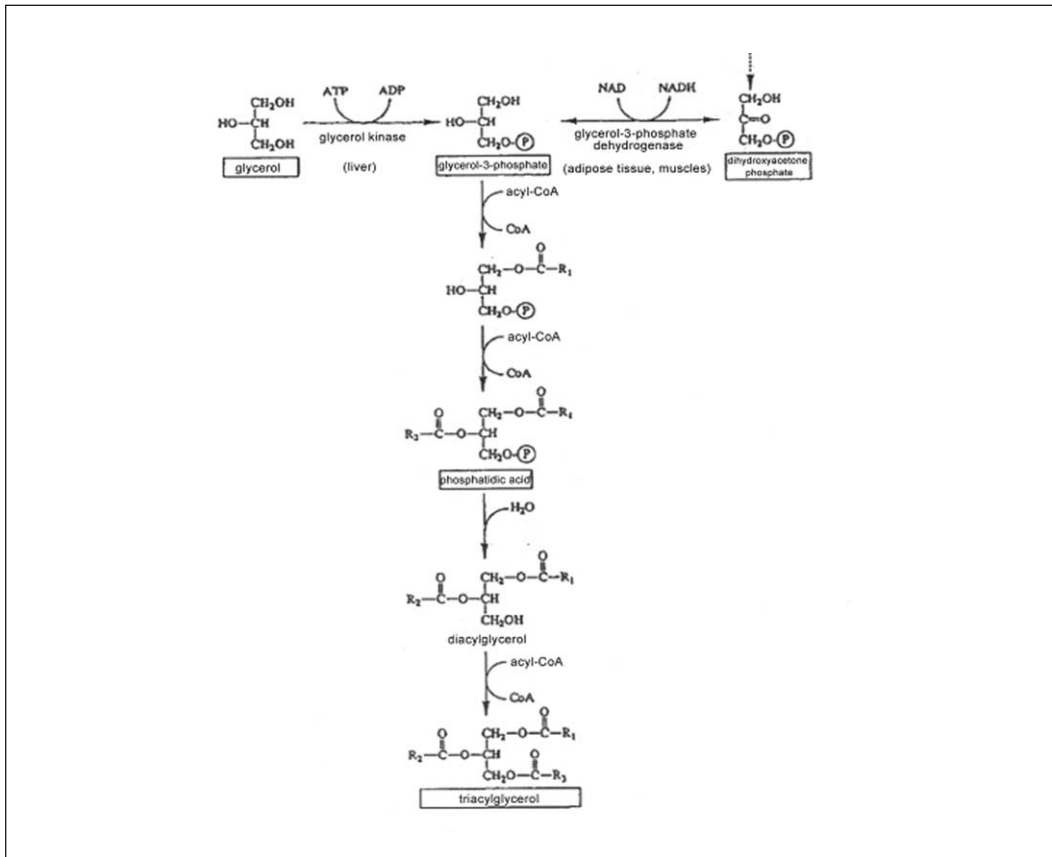


Fig. 1. The pathway for lipid biosynthesis. Lipid biosynthesis occurs through sequential binding of the fatty acids activated as acyl-CoAs to glycerol-3-phosphate. In the liver, glycerol-3-phosphate is generated from glycerol by the action of glycerol kinase. However, due to the absence of glycerol kinase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

하였다. 조직을 포름알데히드에 고착시키고 파라핀에 고정시킨 후 Hematoxylin-Eosin 염색(H-E staining)을 실행하였다.

5) 통계 분석

처리시약의 농도별 지방합성 및 지방분해에 미치는 효과는 일원분산분석을 사용하여 조사하였으며, 평균값의 차이는 Duncan's multiple range test³⁴⁾를 사용하여 $p < 0.05$ 에서 유의성을 조사하였다.

III. 結果

1. 지방세포의 분화에 미치는 영향

1) 성숙지방세포의 형성

3T3 미분화 지방세포(pre-adipocyte, Fig. 2 A)를 배양한 결과 배양 10일째에 성숙된 지방세포(adipocyte)가 형성됨을 알 수 있었다(Fig. 2 B). 지방세포의 형성을 확인하

기 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).

2) 농도별 분화에 미치는 영향

熱水 추출물은 대조군에 비하여 0.1mg/ml, 그리고 0.01 mg/ml 농도에서는 큰 차이를 나타내지 않았고 비교적 광범위한 지방세포를 형성하였으며 1.0mg/ml 농도에서 약간의 분화 억제를 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).

Oil Red O를 이용하여 세포 염색을 시행한 결과 역시 熱水 추출물은 1.0mg/ml의 농도에서, 알코올 추출물은 전 농도에서 대조군에 비하여 지방세포의 분화를 억제하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4 A-H).

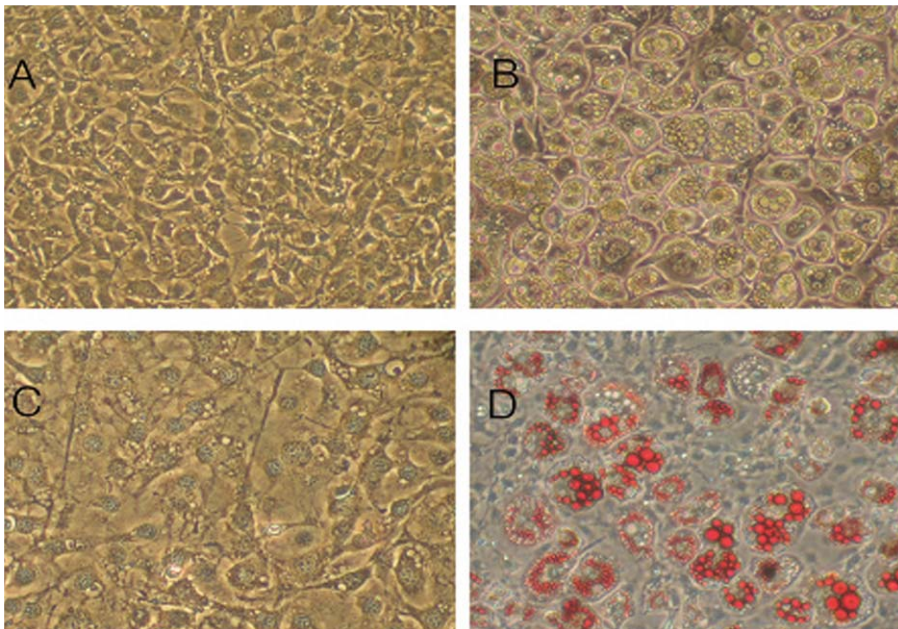


Fig. 2. Light microscopic image of preadipocyte and adipocyte($\times 100$).

- A: Undifferentiated cell
- B: Adipocyte induced to differentiation
- C: Undifferentiated cell stained with Oil Red O
- D: Differentiated cell

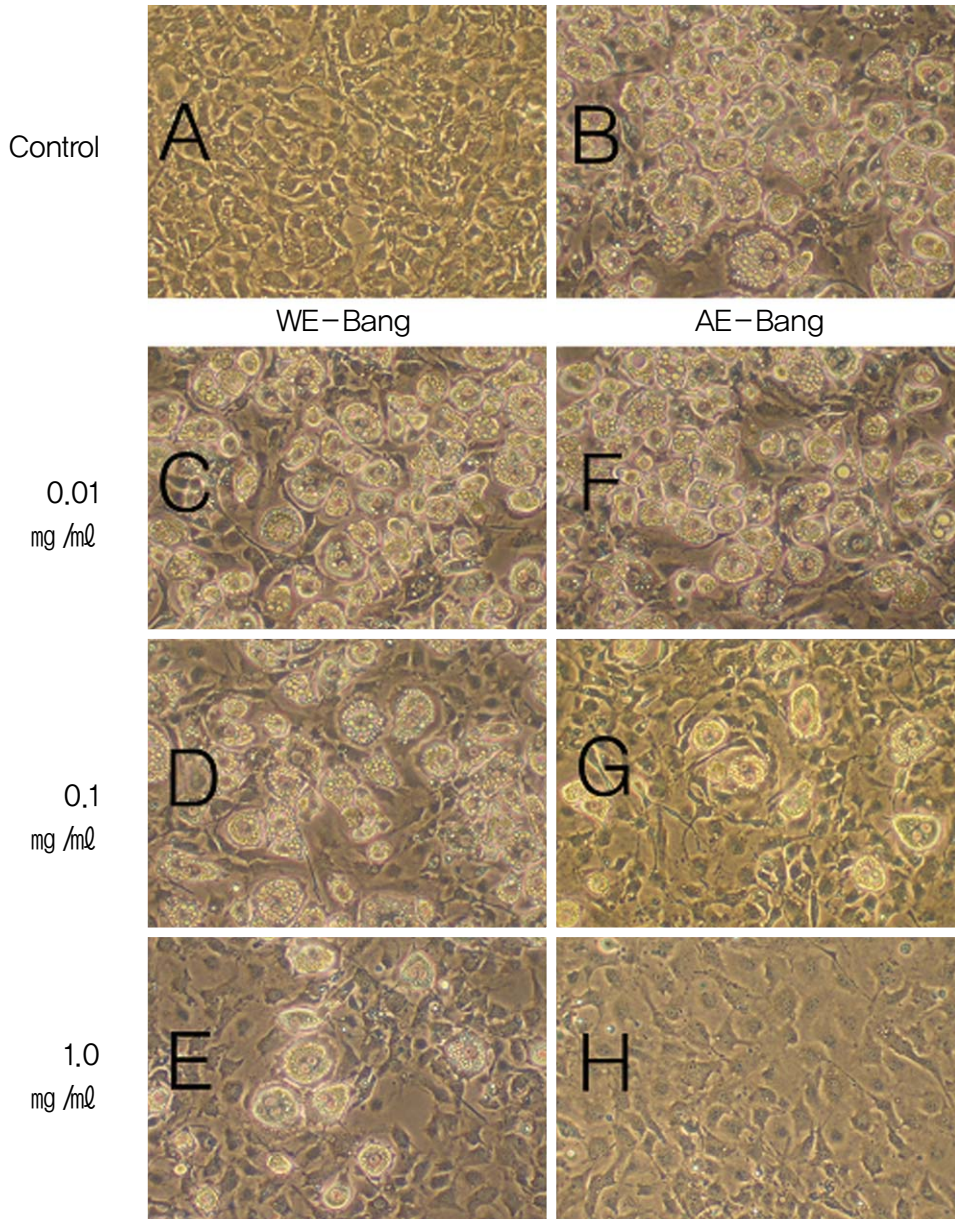


Fig. 3. The suppressed effects of Bangpungtongsung-san extracts to the preadipocyte differentiation (×100).
A: Undifferentiated cell
B: Control was treated with 0.9% NaCl Solution adipocyte induced to differentiation
C: 0.01mg /ml water extract of Bangpungtongsung-san was treated with 3T3 preadipocyte
D: 0.1mg /ml water extract of Bangpungtongsung-san was treated
E: 1.0mg /ml water extract of Bangpungtongsung-san was treated
F: 0.01mg /ml alcohol extract of Bangpungtongsung-san was treated
G: 0.1mg /ml alcohol extract of Bangpungtongsung-san was treated
H: 1.0mg /ml alcohol extract of Bangpungtongsung-san was treated

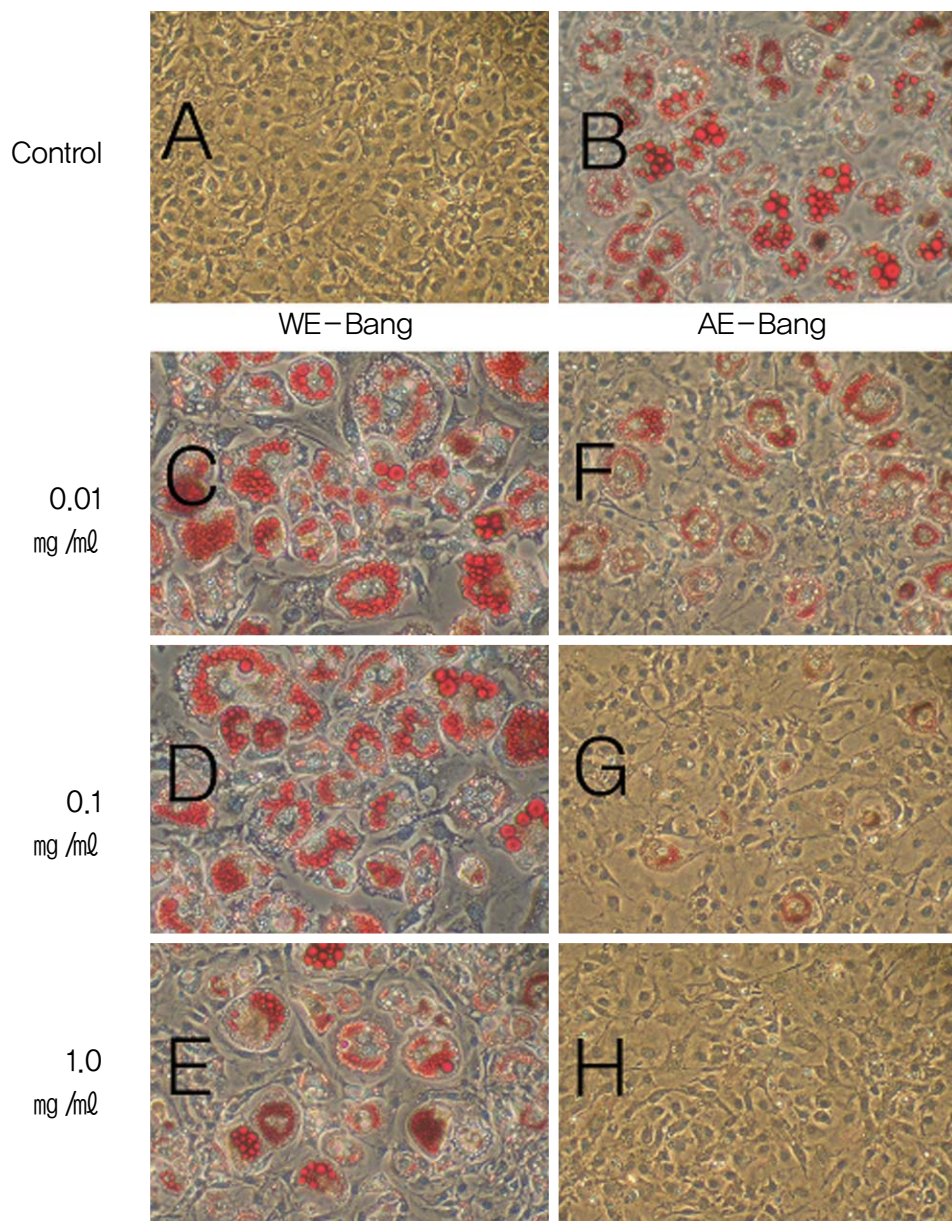


Fig. 4. The suppressed effects of Bangpungtongsung-san extracts to the preadipocyte differentiation. All cells are stained with Oil Red O($\times 100$).

A: Undifferentiated cell
 B: Control adipocyte stained with Oil Red O
 C: Oil Red O staining image of adipocyte 0.01 mg/mL water extract of Bangpungtongsung-san was treated with adipocyte
 D: 0.1 mg/mL water extract of Bangpungtongsung-san was treated
 E: 1.0 mg/mL water extract of Bangpungtongsung-san was treated
 F: 0.01 mg/mL alcohol extract of Bangpungtongsung-san was treated
 G: 0.1 mg/mL alcohol extract of Bangpungtongsung-san was treated
 H: 1.0 mg/mL alcohol extract of Bangpungtongsung-san was treated

3) GPDH 활성에 미치는 영향

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

防風通聖散 熱水 추출물의 첨가 농도에 따른 GPDH 활성은 0.01, 0.1 및 1.0mg/ml 농도 첨가에 따라 각각 74.7, 64.9 및 46.3 mU/min/mg protein으로 감소하여, 0.1mg/ml 농도에서부터 지방합성을 유의적으로 억제하였다 (Table 2.).

반면 알코올 추출물은 0.01, 0.1 및 1.0mg/ml 농도 첨가에 따라 GPDH 활성은 각각 67.2, 30.9 및 8.9mU/min/mg protein으로 감소하여 농도 의존적으로 GPDH 활성을 감소시켰다.

防風通聖散 알코올 추출물과 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 억제작용이 더욱 우수함을 알 수 있었다.

2. 지방세포의 분해(lipolysis)에 미치는 영향

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

防風通聖散 熱水 추출물이 지방분해에 미치는 효과는 0.01mg/ml 농도 에서는 대조군에 비해 유의하게 관찰되지 않았고, 0.1 및 1.0mg/ml 농도에서는 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 0.1과 1.0mg/ml의 glycerol 농도는 차이가 없었다(Table 3.).

알코올 추출물 역시 0.01mg/ml 농도에서는 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았으나 0.1 및 1.0mg/ml 농도 첨가에 따라 방출된 glycerol 농도는 각각 153.1과 245.1 μM/L로 유의적으로 증가하여, 알코올 추출물은 농도 의존적으로 지방분해를 촉진시켰다.

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

(Table 2) The effect of *Bangpungtongsung-san* extract 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
WE-Ba	0.01mg /ml	74.7±4.8 ^{a, b}
WE-Ba	0.1mg /ml	64.9±3.5 ^c
WE-Bar	1.0mg /ml Radix	46.3±6.8 ^c
AE-Ba	0.01mg /ml	67.2±5.7 ^b
AE-Ba	0.1mg /ml	30.9±4.3 ^d
AE-Ba	1.0mg /ml	8.9±3.2 ^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-Ba : Water extract of *Bangpungtongsung-san*

AE-Ba : 90% alcohol extract of *Bangpungtongsung-san*

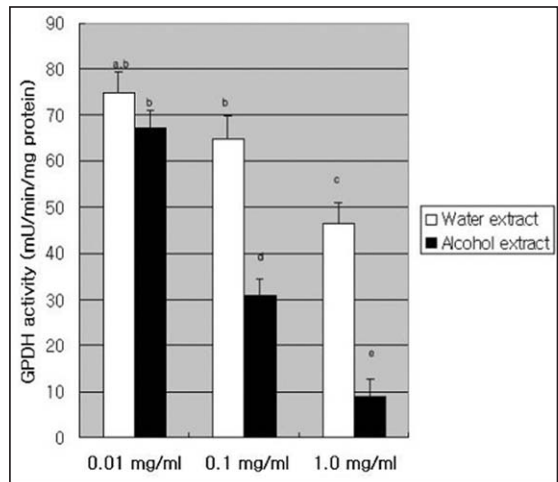


Fig. 5. The effect of *Bangpungtongsung-san* extracts on the inhibition of GPDH activity in rat primary epididymal in 3T3 adipocytes. Cells were treated with 0.01, 0.1 and 1.0mg/ml concentration for 72hrs. Results are the mean±SD(n=2), and analyzed by Duncan's multiple range test(p<0.05).

3. 돼지 지방세포에 미치는 영향

防風通聖散 熱水 추출물과 알코올 추출물을 각각 농도 별로 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. 熱水 및 알코올 추출물 모두 시술 부위의 관찰을 용이하게 하기 위하여 식용 색소를 희석하여 사용하였고, 생체와 가장 근접한 환경을 설정하기 위하여 인산염완충액 식염수로 37°C에서 한 시간 동안 배양 후, 생검 검시물을 주입한 자리에서 추출하여 H-E staining을 실행한 후 관찰하였다.

대조군으로는 각각의 extract를 희석하는데 사용된 0.9% 생리식염수를 처치하여 세포에 어떠한 영향을 주는 지를 관찰하였다.

그 결과 생리식염수의 처치도 지방세포에 약간의 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었다. 防風通聖散 熱水 추출물은 0.1, 1.0mg/ml의 농도에서는 지방세포에 큰 손상을 야기하지 않는 것으로 관찰되었으나 10mg/ml의 농도에서는 광범위한 손상을 일으키는 것이 관찰되었다(Fig. 7 C-E).

(Table 3) The effect of *Bangpungtongsung-san* extracts on the glycerol release by rat epididymal adipocytes

Treatment	Concentration	Glycerol ¹ (μ mole/L)
	Control	116.0 \pm 6.3 ^a
WE-Ba	0.01mg/ml	126.4 \pm 4.2 ^a
WE-Ba	0.1mg/ml	144.2 \pm 12.6 ^{b,c}
WE-Bar	1.0mg/ml Radix	187.2 \pm 6.3 ^d
AE-Ba	0.01mg/ml	132.3 \pm 4.2 ^{a,b,c}
AE-Ba	0.1mg/ml	153.1 \pm 25.2 ^c
AE-Ba	1.0mg/ml	245.1 \pm 4.2 ^e

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

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

WE-Ba : Water extract of *Bangpungtongsung-san*

AE-Ba : 90% alcohol extract of *Bangpungtongsung-san*

알코올 추출물에서는 전 농도에서 광범위한 세포막의 파괴를 동반한 세포사멸 작용이 일어나고 있음을 알 수 있었다(Fig. 7 F-H). 따라서 신선한 지방세포에서 알코올 추출 防風通聖散은 熱水 추출물에 비하여 지방세포 파괴 작용이 더욱 우수함을 알 수 있었다(Fig. 7).

V. 考察

防風通聖散은 金代 劉河間²¹⁾의 《宣明方論》에 최초로 收載된 方劑로서 '防風熱 雙解如通聖'의 뜻으로 즉, 風熱이 盛하여 表裏, 三焦俱實한 것을 雙解함을 목표로 한다. 따라서 一切의 風熱과 飢飽勞役의 內外諸邪에 損傷되어 氣血이 怫鬱하고 表裏와 三焦가 俱實하여 憎寒壯熱, 頭眩, 目赤睛痛, 耳鳴, 鼻塞, 口苦, 口乾, 咽喉不利, 唾涕稠粘, 咳嗽上氣, 大便秘結, 小便赤澀등을 다스린다³⁵⁾. 이와 같이 上下를 區分있게 다스리고 表裏를 함께 치료하여 汗出시키되 表를 傷하지 않고, 瀉下를 하되 裏를 傷하지 않으므로, '通聖'이라 이름 지었다. 本方은 足太陽, 足陽明의 表裏血氣藥이며, 三焦의 實熱을 疏散시키는 效能이 있다²²⁾.

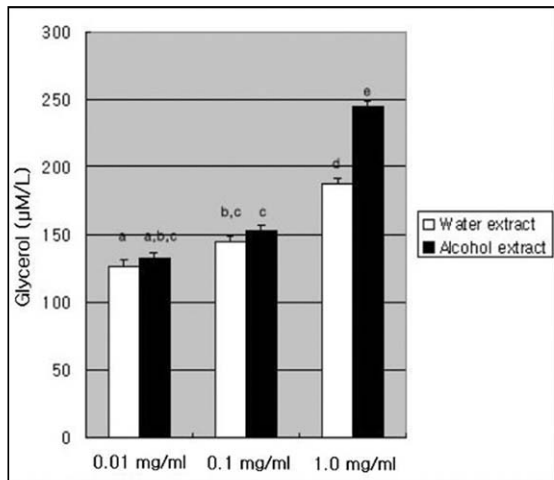


Fig. 6. Lipolysis measured by glycerol release in rat adipocytes incubated with a range of concentrations of *Bangpungtongsung-san* extracts. Results are the mean \pm SD(n=2), and analyzed by Duncan's multiple range test(p<0.05).

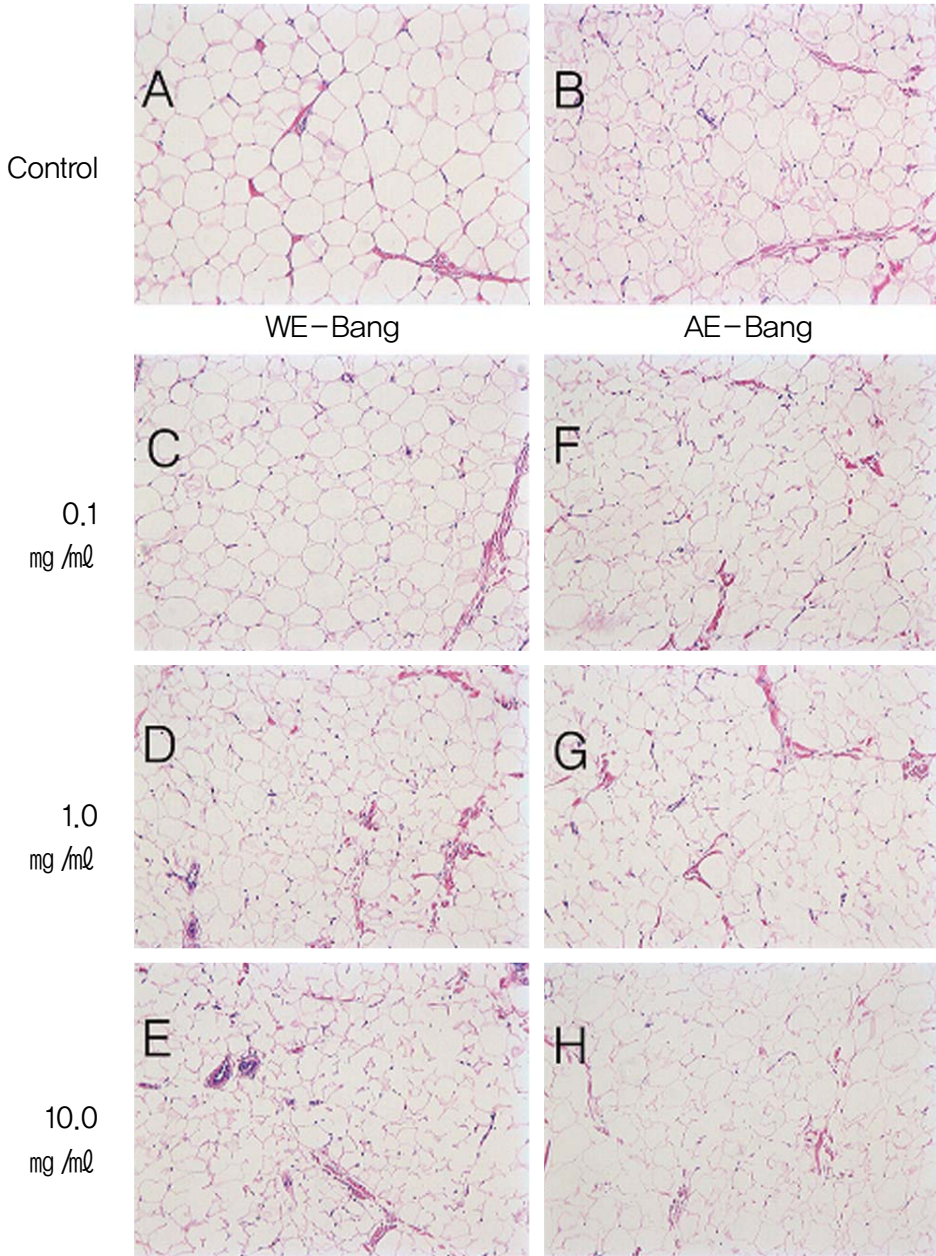


Fig. 7. Light microscopic of porcine lipocyte images treated with *Bangpungtongsung-san* extracts depend on concentration ($\times 100$).
A: Normal fat tissue of porcine
B: Control treated with 0.9% Normal Saline
C: Treated with 0.1mg /mL water extracts of *Bangpungtongsung-san*
D: Treated with 1.0mg /mL water extracts of *Bangpungtongsung-san*
E: Treated with 10.0mg /mL water extracts of *Bangpungtongsung-san*
F: Treated with 0.1mg /mL alcohol extracts of *Bangpungtongsung-san*
G: Treated with 1.0mg /mL alcohol extracts of *Bangpungtongsung-san*
H: Treated with 10.0mg /mL alcohol extracts of *Bangpungtongsung-san*

비만은 체내에서 요구되는 에너지량보다 많은 에너지를 섭취하고 남은 에너지가 지방으로 바뀌어 체내에 축적되어 발생하는 일종의 병리현상으로, 특히 피하조직이나 장간막에 많이 축적된다고 알려져 있다³⁶⁾. 일반적으로 자신의 체중이 표준체중보다 20%이상 증가된 경우를 말하나, 의학적으로는 단순히 체중의 과다를 의미하는 것이 아니고 체중에 지방침착이나 지방조직이 과다한 경우로 남자는 체중의 25~30%이상, 여자의 경우는 30~35%이상인 경우를 말한다²⁾.

소아비만은 성인이 되어서 비로소 증상이 나타나는 퇴행성 심혈관계 질환이 이미 진행되고 있고³⁷⁾, 비만은 고혈압, 고지혈증, 동맥경화, 심장질환 및 인슐린 비의존형 제2형 당뇨병 (Non insulin Dependent Diabetes Mellitus; NIDDM)과 같은 성인성 질환을 유도하는 가장 중요한 위험인자중 하나이다^{37,38)}.

韓醫學에서는 肥滿에 대하여 《靈樞·逆順肥瘦篇》³⁹⁾에 “年質壯大 血氣充盈 膚革堅 因加以邪刺 此者深而留之 此肥人也”로 記述한 이후 肥³⁹⁾, 肥人, 肥貴人⁴⁰⁾, 肥白人, 肥膚盛⁴¹⁾, 肥胖⁴²⁾ 등으로 표현되었다. 《素問·通評虛實論》⁴⁰⁾에 “肥貴人 則膏粱之疾也”라고 하고, 肥滿人에게 發生하는 疾病에 대하여서는 《素問·通評虛實論》⁴⁰⁾에 “凡治 消瘠 仆擊 偏枯 痿厥 氣滿發逆 肥貴人即 膏粱之疾也”라 하였으며, 《東醫寶鑑·風門》⁴³⁾에는 “肥即腠理緻密 而多鬱滯血 難以通利 故多卒中也”라 하여 肥人에게 中風이 많은 이유를 설명하였고, 《素問·奇病論》⁴⁰⁾에는 “肥者 令人內熱 甘者 令人中滿 故 其氣上溢 轉爲 消渴”이라 하여 消渴症이 발생한다고 하였다. 肥滿의 原因에 대하여 考察해보면 《黃帝內經素問》⁴⁰⁾에 “數食甘味” “膏粱之疾”이라 하고 《黃帝內經靈樞》³⁹⁾에 “貪於取與”라고 하여 甘味와 膏粱厚味の 과다섭취와 잦은 섭취를 비만의 원인으로 보았다.

한국에서는 주로 한약복합제인 처방으로 선택되었다면(91%), 해외에서는 주로 單味로 사용되었으며(72%) 주로 식품첨가제, 식품대체제로서 사용되었다. 이는 해외에서는 한약을 약이라는 관점에서 접근하기 보다는, 보완대체의학의 일환으로 식품첨가제로 취급하기 때문이라고 생각된다. 한의학에서는 각각의 본초를 직접 사용하기 보다는, 여러 본초를 배합하여 고유의 효능을 높이고 독성을 완화해 줄 수 있도록 복합제로서 사용할 수 있도록 하고 있다.⁹⁾

현재 비만의 치료와 관련하여 제시되고 있는 방법은 단미제^{9,10)}, 복합방^{11-13,23-25)}의 한약을 이용한 약물요법이나 이침¹⁴⁾, 전침¹⁵⁾, 약침^{16,17)} 등의 침에 대한 연구가 이루어지고 있고, 또한 운동요법, 식이요법, 수술요법, 유전자관련 연구

¹⁸⁾와 행동수정요법¹⁹⁾, 정신요법²⁰⁾ 등이 연구되어지고 있으며, 국소비만치료 연구도 북부위주로 시작되고 있는 단계이긴하나 아직 활발하게 이루어지고 있지는 않은 실정이다.

이에 저자는 防風通聖散이 국소비만치료제로서 적절한지를 알아보고자 추출방식을 달리하여 3T3 미분화지방세포를 이용하여 지방세포의 분화능 억제효과와 성숙지방세포의 분해에 미치는 영향을 관찰하였고, 돼지의 지방조직에서 조직학적 변화를 관찰하여 국소 비만 치료제로서의 사용이 가능한가를 알아보고자 본 연구를 시도하였다.

전지방세포(cell-line)인 3T3 세포는 3T3 세포로부터 유래된 세포주로서 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있고, 인슐린이나 그와 유사한 유도물질의 존재 하에서 지방세포(adipocyte cell)로 분화하는 성질을 갖고 있어 지방세포의 대사과정은 물론 지방축적과 지방세포의 분화과정을 연구하는데 널리 사용되고 있다⁴⁴⁾.

3T3 미분화 지방세포(pre-adipocyte)를 배양한 결과 정상적인 성장이 이루어짐을 확인할 수 있었다.

전 지방세포에서 지방세포로 분화되는 과정에서 알코올 추출물과 熱水 추출된 防風通聖散 extract를 각각 1.0mg/ml, 0.1mg/ml, 그리고 0.01mg/ml의 농도로 나누어 3T3 지방전구세포의 분화 전 단계에서 배지에 처리한 후 농도별로 지방세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하였다.

그 결과 熱水 추출물은 대조군에 비하여 0.1mg/ml, 그리고 0.01mg/ml 농도에서는 큰 차이를 나타내지 않았고 1.0 mg/ml 농도에서 약간의 분화 억제를 나타내는 것으로 관찰되었다.

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.

Oil Red O를 이용하여 세포 염색을 시행한 결과 역시 熱水 추출물은 1.0mg/ml의 농도에서, 알코올 추출물은 전 농도에서 대조군에 비하여 지방세포의 분화를 억제하고 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 바탕으로 防風通聖散 추출물은 고농도에서 지방세포의 분화 기전에 작용하며 熱水 추출물보다는 알코올 추출물의 분화억제 효과가 더욱 좋은 것으로 나타났다.

防風通聖散 알코올 추출물과 熱水 추출물이 전지방세포로부터 지방세포로의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 GPDH 활성을 측정하였다. GPDH는 지방세포의 형

성에 관여하는 중요한 효소로 GPDH가 증가하였다는 것은 중성지방의 합성이 활성화되고 있음을 의미한다. GPDH활성은 지방전구세포가 지방세포로 분화할 때 급증한다는 것으로 알려져, cell-line화 되어 있는 지방전구세포를 지방세포로 분화하는 실험에 있어서 그 분화를 억제하는 물질을 screening하기 위한 지표로 이용되고 있다. 미분화 3T3 지방세포가 성숙한 분화 지방세포로 전환됨에 따라 GPDH 효소 활성은 증가하게 된다.

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

防風通聖散 熱水 추출물의 첨가 농도에 따른 GPDH 활성은 0.01, 0.1 및 1.0mg/ml 농도 첨가에 따라 각각 74.7, 64.9 및 46.3mU/min/mg protein으로 감소하여, 0.1mg/ml 농도에서부터 지방합성을 유의적으로 억제하였다.

반면 알코올 추출물은 0.01, 0.1 및 1.0mg/ml 농도 첨가에 따라 GPDH 활성은 각각 67.2, 30.9 및 8.9mU/min/mg protein으로 감소하여 농도 의존적으로 GPDH 활성을 감소시켰다.

防風通聖散 알코올 추출물과 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 억제작용이 더욱 우수함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 바탕으로 防風通聖散 알코올 추출물과 熱水 추출물은 고농도에서 지방세포의 분화를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 특히, 알코올 추출물 防風通聖散의 지방합성 억제효과는 고농도로 갈수록 뚜렷하였다.

防風通聖散 熱水 추출물과 알코올 추출물이 분화된 지방세포의 지방 분해에 미치는 영향은 glycerol 함량을 측정함으로써 조사하였다. 지방은 glycerol 과 fatty acid로 분해되므로 glycerol의 함량이 많아지는 것은 지방세포의 분해가 증가되었음을 의미한다.

본 연구에서 防風通聖散 熱水 추출물이 지방분해에 미치는 효과는 0.01mg/ml 농도에서는 대조군에 비해 유의적인 차이가 관찰되지 않았고, 0.1 및 1.0mg/ml 농도에서는 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 0.1과 1.0mg/ml의 glycerol 농도는 차이가 없었다.

알코올 추출물 역시 0.01mg/ml 농도에서는 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 하지만 0.1 및 1.0mg/ml 농도 첨가에 따라 방출된 glycerol 농도는 각각 153.1

과 245.1 μ M/L로 유의적으로 증가하여, 알코올 추출물은 농도 의존적으로 지방분해를 촉진시켰다.

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

생체에서 防風通聖散 알코올 추출물과 熱水 추출물이 지방세포에 농도별로 어떠한 영향을 미치는 가를 알아보기 위하여 신선한 돼지의 지방조직에 처치한 후 조직학적 소견을 관찰하였다.

防風通聖散 熱水 추출물과 에탄올 추출물을 각각 농도별로 10.0, 1.0, 그리고 0.1mg/ml로 희석하여 돼지 지방조직에 주입한 후 H-E staining을 실행한 후 관찰하였다.

대조군으로는 각각의 extract를 희석하는데 사용된 0.9% 생리식염수를 처치하여 세포에 어떠한 영향을 주는 지를 관찰하였다.

그 결과 생리식염수의 처치도 지방세포에 약간의 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었다. 防風通聖散 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 防風通聖散은 熱水 추출물에 비하여 지방세포 파괴 작용이 더욱 우수함을 알 수 있었다.

이러한 결과로 보아 防風通聖散 알코올 추출물과 熱水 추출물은 국소 비만 치료에 응용 가능할 것으로 사료된다.

V. 結論

熱水 및 알코올 防風通聖散 추출물이 국소 비만 치료제로서의 사용이 가능한가를 알아보고자 3T3 지방세포와 rat의 정소상체 지방조직을 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. 防風通聖散 알코올 추출물과 熱水 추출물은 고농도

- (1.0mg/ml)에서 지방세포의 분화를 억제하였다.
2. GPDH 활성을 측정한 결과 防風通聖散 알코올 추출물과 熱水 추출물은 고농도(1.0mg/ml)에서 지방세포의 분화를 억제하는 효과가 있었다. 특히, 防風通聖散 알코올 추출물의 지방합성 억제효과는 고농도로 갈수록 뚜렷하였다.
3. 防風通聖散 알코올 추출물과 熱水 추출물의 지방분해 효과는, 고농도(1.0mg/ml)에서 알코올 추출물의 지방분해 효과가 더 높은 것으로 관찰되었다.
4. 생체 지방세포에서 防風通聖散 熱水 추출물은 고농도(10.0mg/ml)에서는 광범위한 손상을 일으키는 것이 관찰되었고, 알코올 추출물에서는 전 농도에서 광범위한 세포막의 파괴를 동반한 세포사멸을 유도하였다.

이러한 결과로 防風通聖散의 알코올 및 熱水 추출물은 비만치료를 유효하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 參考文獻

1. 전국한외과대학 재활의학과학교실편저. 동의재활의학과학. 서울. 서범당. 1995; 570-573, 575-576, 582.
2. 최종명의. 비만과 관련된 생활습관에 관한 연구. 경희대학교의과대학 1994; 74.
3. 보건복지부. 2005년 국민건강영양조사. 2006.
4. 허갑범. 비만증의 병인. 한국영양학회지. 1990;23(5) : 333-6.
5. 김수익, 송용신. 비만에 대한 동서의학적 고찰. 한방재활의학과학회지. 1993; 3(1): 299-314.
6. 김경남, 임형호. 비만관련논문에 대한 조사연구. 한방재활의학과학회지. 1999; 9(2): 9-35.
7. 김석, 편승희, 김태희. 동의보감을 위주한 비만의 원인, 증상, 치료법 연구. 대한한학회지. 1998; 19(2): 125-36.
8. 황미자, 신현대, 송미연. 한국에서 비만치료를 쓰이는 한약에 대한 문헌연구(2000년 이후 발표된 논문을 중심으로). 한방재활의학과학회지. 2006; 16(3): 65-81.
9. 김윤정. 마황이 비만유도 흰쥐의 혈중지질대사 및 부고환의 비장분포에 미치는 영향. 동국대학교석사논문. 2006.
10. 윤상구, 김호준, 이명중. 반하가 비만쥐의 혈중 지질 및 골격근내의 지방산 대사에 미치는 영향. 2006; 27(2): 211-24.
11. 장영주, 조정훈, 송병재. 태음조위탕과 전기침 병행 치료의 비만에 대한 효과. 대한한방비만학회지. 2001; 1(1): 77-83.
12. 이상학, 정석희, 신현대. 태음조위탕 복용전후비만 지표와 심박변이도와의 관계. 한방재활의학과학회지. 2005; 15(4): 47-54.
13. 서동민, 이상훈, 이재동. 비만 환자에 대한 조위승청탕의 효과 및 부작용에 관한 임상적 관찰. 대한침구학회지. 2005; 22(3): 145-153.
14. 박상용, 이병렬. 비만치료를 위한 침구 및 약물치료의 임상적 연구. 대전대학교한의학연구소. 한의학논문집. 1994; 2(2): 163-185
15. 정선희, 남상수, 김용석, 이재동, 최도영 외. 비만환자의 전침치료 임상례. 대한침구학회지. 1999; 13(1): 79-87.
16. 주준성, 윤대환, 나창수, 조명래, 채우석. 풍릉·양릉천에 대한 약침이 고지방식으로 유발된 비만 백서에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2004 ; 21(2): 131-152.
17. 조희철, 이시형, 신조영, 김강산, 조남근, 권기록, 임태진. 옹담과 우황 약침이 지방세포 대사에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007; 24(4):125-142.
18. 심우진, 송미연, 정석희등. UCP 유전자 다형성이 한국인 여성의 비만과 체중감량에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2007; 17(4):107-140.
19. 윤호준, 송윤경, 임형호. 비만치료전략으로서의 행동수정요법 한방재활 의학과학회지. 2003; 13(3): 73-89.
20. 최승. 한방비만치료와정신요법. 대한한방비만학회지. 2006; 6(2): 1-15.
21. 劉完素. 宣明方論 卷十一(文淵閣書庫全書, 中醫學大系). 서울. 麗江出版社. 1988; 768.
22. 황미자, 신현대, 송미연. 2000년 이후 비만치료를 사용되는 處方 및 本草에 대한 문헌연구-麻黃을 중심으로. 대한한방비만학회지. 2007;7(1): 39-54.
23. 안정미, 김성수, 신현대. 방풍통성산이 비만유도백서의 체중 및 지질대사에 미치는 영향. 경희의학. 1993; 9(1); 69-82.

24. 황상준, 송태원, 오민석. 방풍통성산이 고지방사료 식이로 유발된 비만 생쥐에서 비만 유전자 및 관련 인자에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2006; 27(1): 11-22.
25. 신병철, 송용선. 방풍통성산이 백서의 비만증 및 비만세포에 미치는 영향. 한방재활의학회지. 1997; 7(1): 101-118.
26. 보건복지부. 한약재 수급 및 유통관리 규정 제 2조 2항 보건복지부고시제 2006-69호. 2006.
27. Ingh, R., Artaza, J.N., Taylor, W.E., Braga, M., Yuan, X., Gonzalez-Cadavid, N.F. and Bhasin, S. Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3 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: 141-154
28. Negrel, R. and Dani, C. Culture of adipose precursor cells and cells of clonal lines from animal white adipose tissue. In *Adipose Tissue Protocols*. G. Ailhaud (ed). Humana Press, Inc., Totowa, NJ. 2001; 225-237.
29. Wise, L.S. and Green, H. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 1979; 254: 273-275.
30. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
31. Rodbell, M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 1964 ; 239: 375-380.
32. Zalatan, F., Krause, J.A. and Blask, D.E. Inhibition of isoproterenol-induced lipolysis in rat inguinal adipocytes in vitro by physiological melatonin via a receptor-mediated mechanism. *Endocrinology*. 2001; 142: 3783-3790.
33. McGowan, M.W., Artiss, J.D., Strandbergh, D.R. and Zak, B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 1983; 29: 538-542.
34. Steel, R.G.D. and Torre, J.H. *Principles and Procedures of Statistics*, 2nd ed, McGraw-Hell, New York. 1980; 187-188.
35. 신재용편저. 방약합편해설. 서울. 정보사. 1991; 208-209.
36. 두호경. 동의신계학. 서울. 동양의학연구원. 1991; 1075-6, 1081, 1087.
37. 대한비만학회. 임상비만학. 서울. 고려의학. 2001; 73-113.
38. 김재범, 박지영. 지방세포분화와 지방세포 분비물질들의 기능. 대한내분비학회지. 2002; 17(1): 1-9.
39. 楊維傑. 內經靈樞譯解. 서울. 대성문화사. 1990; 303-309.
40. 楊維傑. 內經素問譯解. 서울. 대성문화사. 1990; 235-243, 356-361.
41. 張機. 金匱要略方論. 서울. 정보사. 1985; 35.
42. 朴盛洙, 廉泰煥. 現代漢方講座. 서울. 행림의원. 1975; 473.
43. 許浚. 東醫寶鑑. 서울. 남산당. 1971; 367, 420, 426, 557, 569.
44. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974; 3: 127-33.