

太陰人 熱多寒少湯이 3T3-L1 脂肪前驅細胞 分化에 미치는 影響

유새롬 · 정수진 · 신현규

한국한의학연구원 한약기초연구그룹

Abstract

Effects of Yeoldahanso-tang, a Sasang Constitutional Herbal Prescription for Taeumin, on the Adipogenesis in 3T3-L1 Cells

Sae-Rom Yoo, Soo-Jin Jeong, Hyeun-Kyoo Shin

Basic Herbal Medicine Research Group, Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine

Objectives

Although Yeoldahanso-tang (YDHST) has been widely used for treatment of obesity and its related diseases such as hyperinsulinemia and hypertension for Taeumin, no scientific evidence has reported yet to support its ability to work against these metabolic disorders. Our study was aimed to investigate the anti-obesity effect of YDHST extract on the cellular differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into adipocytes.

Methods

3T3-L1 preadipocytes were differentiated into adipocytes by adding insulin, dexamethasone and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) for 8 days in the absence or presence of YDHST extract. Anti-obesity effects of YDHST extract were evaluated by Oil Red O staining, glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity, triglyceride contents, and leptin production.

Results

YDHST extract remarkably prevented lipid accumulation with no cytotoxicity in the differentiated 3T3-L1 cells. In addition, YDHST extract decreased contents of triglyceride 3T3-L1 adipocytes. Consistently, YDHST extract caused a significant inhibition of GPDH activity and leptin production in a dose-dependent manner.

Conclusions

Our findings suggest that Sasang constitutional herbal formula YDHST for Tae-eumin has anti-obesity activity by regulation of the adipogenesis process *in vitro*. Additional study will be required to further confirm the inhibitory effect on adipocyte differentiation by using *in vivo* animal model.

Key Words: Yeoldahanso-tang, Taeumin, 3T3-L1, adipogenesis, anti-obesity

I. 緒論

肥滿은 과다한 體脂肪을 가진 상태를 의미하며, 臨床的으로 體質量 지수가 30 이상일 때를 意味한다¹. 韓醫學에서 肥滿이라는 用語는 없으나, “內經素問 通平虛實論”에서는 이를 “肥貴人即 高粱之疾也”로 표현하였으며² 身體 內臟器의 機能과 代謝 이상으로 인한 肥濕이나 痰飲의 過剩 蓄積을 그 原因으로 보았다. 韓方에서는 臟器의 機能을 補完해 줌으로써 身體의 不均衡을 解消해 肥滿을 治療하고자 하였으며, 個人別 體質에 따른 處方을 考慮하고 있다.

韓醫學 중 四象醫學은 李濟馬에 의해 創製된 獨特한 醫學思想으로 四象醫學에서 體質은 크게 太陽人, 太陰人, 少陽人, 少陰人으로 나뉜다. 그 중 太陰人은 喜性이 廣張하고 樂情이 促急하므로 肝大肺小가 되어 腰圍之立勢가 盛壯하고 腦髓之氣勢가 孤弱한 體形氣像으로 ‘寬而緩’하는 肝氣가 盛하다. 그리고 水穀의 涼氣로부터 化生된 油가 血이 되고 血 中の 濁滓가 肉으로 歸하기 때문에 腰脊과 肉 등이 發達하게 되어³ 肉, 腰圍 등이 發達하게 되어 肥滿人의 體形과 비슷한 面이 많다. 四象 體質과 肥滿에 관해 김⁴, 조⁵, 신⁶의 연구를 살펴보면 肥滿 患者의 50% 이상이 太陰人이며, 肝大肺小한 太陰人은 다른 體質보다 肥滿으로 오는 合併症 發生이 높게 나타난다고 보고하고 있다. 이를 종합해 보면 四象體質 중 太陰人의 肥滿 發生率이 가장 높을 것으로 思料되며, 太陰人 四象處方에 대한 實驗의 接近을 통해 이를 根據로 한 太陰人의 肥滿을 豫防 또는 治療하기 위한 處方에 대한 研究가 必要하다.

葛根, 黃芩, 藁本, 蘿蔔子, 桔梗, 升麻 및 白芷의 總 일곱 가지 藥材가 配合된 熱多寒少湯은 『東醫壽世保元』중 太陰人 肝受熱裡熱病에 登場하는 處方이다. 熱多寒少湯은 太陰人의 肝燥熱證을 治療하는데 쓰이며, 여기에 大黃을 더해 夢泄, 虛癆 등을 緩和시키는데 利用되기도 하였다⁷. 『本

研究에서는 3T3-L1 脂肪前驅細胞를 利用하여 熱多寒少湯이 脂肪細胞의 分化 科程을 沮害 시킨다는 有意한 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다. 3T3-L1 細胞는 肥滿 研究를 위하여 脂肪細胞 分化 研究에 가장 많이 使用되는 모델이며, 1974년에 Green 博士에 의해 紹介되었다. 脂肪細胞 分化에 利用된 다른 細胞들과 달리 細胞에 成長 停止 狀態를 誘導한 후, 인슐린 등의 脂肪細胞 分化誘導劑를 가하여 分化를 誘導하게 된다. 이는 脂肪細胞 分化 前後의 效果를 뚜렷하게 比較할 수 있어, 細胞 水準의 抗肥滿 研究에서 가장 最適의 모델로서 많은 研究者들이 使用하고 있기 때문에 本 研究에서도 이 모델을 利用하여 研究하였다⁸.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 實驗 材料

本 實驗에 使用된 熱多寒少湯의 構成 韓藥材는 (주)음니허브 (Yeongcheon, Korea)와 (주)HMAX (Jechon, Korea)에서 購入하였다. 購入한 韓藥材는 東國大學校와 大田大學校 韓醫科大學의 2 人 教授로부터 鑑別 받은 후 使用하였으며, 각각의 構成 韓藥材들의 標本 (2008-KE09-1~2008-KE09-7)은 韓國韓醫學研究院 韓藥基礎研究그룹에 보관하였다.

2) 抽出物의 調製

熱多寒少湯의 構成 韓藥材를 Table 1과 같이 무게 比率로 配合 (總 試料 量 約 3.5 kg)하여 藥湯器 (Cosmos 660, Incheon, Korea)에 넣고, 물을 試料의 10 倍 (35 L)로 添加하여 100°C에서 2 時間 煎탕한 후 濃縮 및 凍結乾燥 하여 1.02 kg (收率 29.0%)의 抽出物을 얻었다.

Table 1. Composition of Yeoldahanso-tang

Herbal medicine	Amount (g)	Company of purchase	Source
Puerariae Radix (갈근, 葛根)	15.0	Omniherb	Jecheon, Korea
Scutellariae Radix (황금, 黃芩)	7.5	HMAX	Jeongseon, Korea
Angelicae Tenuissimae Radix (고본, 藜本)	7.5	HMAX	China
Raphani Semen (내복자, 蘿蔔子)	3.75	HMAX	China
Platycodi Radix (갈경, 桔梗)	3.75	Omniherb	Yeongcheon, Korea
Cimicifugae Rhizoma (승마, 升麻)	3.75	HMAX	China
Angelicae Dahuricae Radix (백지, 白芷)	3.75	Omniherb	Yeongcheon, Korea
Total	45.00		

2. 實驗方法

1) 細胞培養 및 分化

생쥐 由來 3T3-L1 脂肪前驅細胞株는 American Type Culture Collection (ATCC, CL-173, Rockville, MD, USA)으로부터 分讓 받아 使用하였다. 細胞는 10% new born calf serum (NCS, Gibco BRL., Carlsbad, CA, USA) 및 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL., USA)을 첨가한 DMEM (Gibco BRL., Carlsbad, CA, USA) 培地를 利用하여 37°C, 5% CO₂ 條件에서 培養하였다. 脂肪前驅細胞가 100% 擴 充되 면 이로부터 2 일 후에 分化 誘導物質인 5 µg/mL insulin, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 가 포함된 3T3-L1 differentiation medium (Zenbio Inc., Research Triangle Park, NC, USA)에서 2 일 동안 培養하고, 分化 誘導 2일 째부터 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL., Carlsbad, CA, USA)와 1 µg/mL insulin을 包含한 DMEM으로 2 일간 그리고 分化 誘導 4 일째 부터는 10% FBS가 包含된 DMEM으로 交換하며 총 8일간 分化를 誘導하였다. 熱多寒少湯 抽出物은 이를 間隔으로 培地 交換 時 함께 處理하였다. 陽性 對照群으로 PPAR γ 抑制劑인 GW9662 (20 µM) (Sigma St. Louis, MO, USA)를 使用하였다.

2) 細胞毒性 平價

細胞 毒性 測定은 Cell counting kit-8 solution (Dojindo, Kumamoto, Japan)을 利用하였다. 熱多寒少湯을 24 時間 동안 細胞에 處理한 다음, 450 nm에

서 吸光度를 測定 (Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)하였다. 測定값은 對照群과 比較를 통해 相對的인 細胞生存率 (% of control)을 計算하였다.

3) Oil Red O 染色

Sahai A9의 方法을 一部 修整해 實施하였다. 染色 細胞의 觀察은 光學顯微鏡 (Olympus CKX41 inverted microscopy, Olympus, Tokyo, Japan) 下에서 x 40의 倍率로 하였으며, 細胞 內 脂肪 蓄積量은 520 nm에서 吸光度를 測定하였다.

4) 中性脂肪 (Triglyceride) 量 測定

BioVision 사의 Triglyceride Quantification Kit를 使用하였다.

5) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性度 測定

Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity assay kit (TAKARA, Tokyo, Japan)를 使用하여 GPDH 活性度を 測定하였다.

6) Leptin 濃度 測定

Mouse leptin immunoassay kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 使用하여 脂肪 細胞로부터 分泌되는 leptin量을 測定하였다.

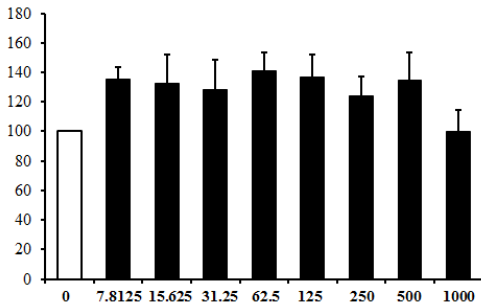


Figure 1. Effect of YDHST extract on the cell viability in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with various concentrations of YDHST for 24 h. Cell viability was determined by CCK-8 assay as described as under Materials and method. Results are presented as mean±SEM. YDHST; Yeoldahanso-tang.

7) 統計處理

實驗結果에 대한 統計學的 有意性은 ANOVA 檢證을 適用하였으며, Tukey's multiple comparison test를 利用하여 $p < 0.05$ 수준에서 사후검증을 實施하였다. 본 實驗의 모든 結果는 mean±S.E.M으로 表示하였으며, Graphpad InStat ver.3.10 (Graphpad software, Inc. San Diego, CA, USA)을 利用하여 算出되었다.

III. 結果

1. 熱多寒少湯의 脂肪前驅細胞에 대한 細胞毒性

熱多寒少湯의 3T3-L1 細布에 대한 毒性을 確認하기 위해 CCK assay를 통하여 測定하였다. 그 結果, 1000 μg/ml 濃度까지 細布 生存率에 대한 影響이 없음을 確認하였다 (Fig. 1).

2. 熱多寒少湯의 脂肪蓄積 抑制 效果

脂肪細胞로의 分化를 誘導하면서 熱多寒少湯을 同時 處理한 후, Oil Red O 染色을 통해 脂肪 방울의 生成을 測定하였다. 位相差 顯微鏡을 통하여 細胞의 形態 變化를 觀察하였을 때, Figure 2-A

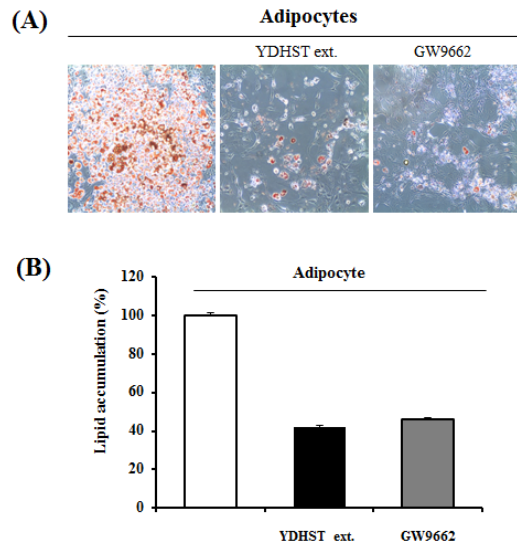


Figure 2. Inhibitory effects of YDHST on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Cells were induced adipocyte differentiation for 8 days and simultaneously treated with YDHST extract (200 μg/ml). (A) Intracellular lipid accumulation was evaluated by Oil red O staining and observed using an inverted microscope (at × 100 of magnification). (B) Lipid contents were estimated by dissolving cellular-lipid retained Oil Red O in isopropanol and measuring OD. Results are presented as mean±SEM. YDHST; Yeoldahanso-tang.

와 같이 인슐린 등으로 分化를 誘導한 脂肪細胞에서는 脂肪 방울의 蓄積이 뚜렷이 觀察되었다. 반면에, 熱多寒少湯을 處理한 細胞는 分化를 誘導한 경우와 比較하여, 脂肪 방울의 蓄積에 대한 有意的 減少를 나타내었다. 이 結果는 陽性 對照群으로 使用한 PPAR-γ 阻害制 GW9662와 比較하였을 때, 비슷한 水準의 減少 效果가 觀察되었다. 이를 定量化 하였을 때, 熱多寒少湯을 處理한 細胞의 脂肪蓄積量은 42%였으며, 이는 分化만을 誘導한 細胞와 比較하여 58%의 有意的인 減少를 나타내었다 (Fig. 2-B).

3. 熱多寒少湯의 中性脂肪含量 및 GPDH 活性에 미치는 影響

分化 誘導된 脂肪細胞의 中性脂肪 含量은

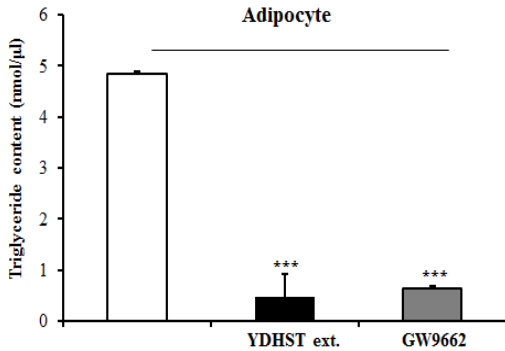


Figure 3. Inhibitory effects of YDHST extract on triglyceride contents in 3T3-L1 adipocytes. Preadipocytes were induced cellular differentiation into the adipocytes with MDI as described in Materials and Methods. Cells were treated with YDHST extract (200 μg/ml) during differentiation. Results are presented as mean±SEM. *** $p < 0.001$ versus differentiated control cells. YDHST; Yeoldahanso-tang, MDI; methylisobutylxanthine, dexamethasone, and insulin.

4.843 nmol/μl로 지방전驅細胞의 0.584 nmol/μl와 比較하여 有意的인 增加를 나타내었다. 反面에, 熱多寒少湯을 處理한 경우 中性脂肪의 含量은 0.465 nmol/μl 였으며, 이는 脂肪細胞의 含量에 對한 有意的인 減少로 확인되었다 (Fig. 3).

또한 分化를 誘導한 3T3-L1 細胞에서 熱多寒少湯은 GPDH 活性度를 有意的으로 減少시켰다. 특히 高濃度 (200, 400 μg/ml)에서는 分化된 脂肪細胞와 比較하여 GPDH 活性度가 約 90% 減少되었다 (Fig. 4)

4. 熱多寒少湯의 leptin 生成에 對한 效果

熱多寒少湯의 處理에 의한 3T3-L1 脂肪細胞의 leptin 分泌量을 測定한 結果, leptin 分泌量이 有意的으로 減少하였다 (Fig. 5).

IV. 考 察

肥滿은 에너지 攝取와 消費의 不均衡으로 因하

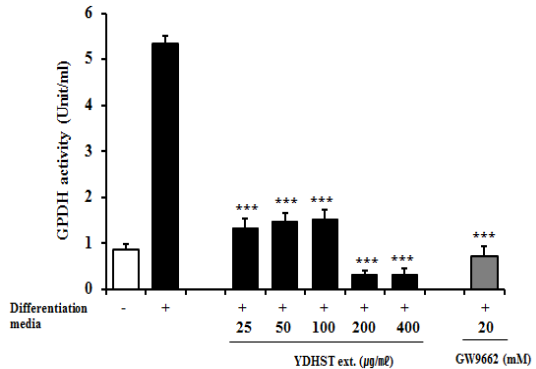


Figure 4. Inhibitory effects of YDHST on the GPDH activity in 3T3-L1 adipocytes. Preadipocytes were induced cellular differentiation into the adipocytes with MDI as described in Materials and Methods. Cells were treated with YDHST extract (25-400 μg/ml) during differentiation. GPDH activity was assessed by determination as decrease in NADH at 340nm. Results are presented as mean±SEM. *** $p < 0.001$ versus differentiated control cells. YDHST; Yeoldahanso-tang, GPDH; glycerol-3-phosphate dehydrogenase, MDI; methylisobutylxanthine, dexamethasone, and insulin.

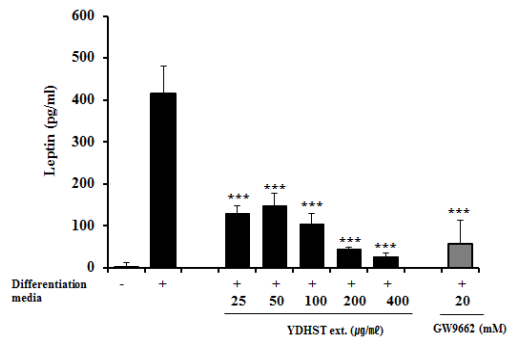


Figure 5. Inhibitory effects of YDHST on the leptin production in 3T3-L1 adipocytes. Preadipocytes were induced cellular differentiation into the adipocytes with MDI as described in Materials and Methods. Cells were treated with YDHST extract (25-400 μg/ml) during differentiation. Leptin production was determined by ELISA at 540 nm subtracted from 450nm. Results are presented as mean±SEM. *** $p < 0.001$ versus differentiated control cells. YDHST; Yeoldahanso-tang, MDI; methylisobutylxanthine, dexamethasone, and insulin.

여 體內 脂肪組織이 過剩 蓄積된 狀態를 말하며, 全世界적으로 그 有病率이 빠르게 增加하고 있다¹⁰. 現在 肥滿 治療劑로 使用되는 많은 藥物들은 몇

몇 副作用의 發生이 問題點으로 提起되고 있다¹¹⁻¹². 이를 解決하기 위하여, 食品이나 韓藥製劑 또는 韓藥處方을 包含한 天然物을 이용한 肥滿의 豫防과 治療에 效果의인 藥物을 찾고자 하는 많은 研究가 進行되고 있다. 이에 本 研究에서는 太陰人 韓藥處方인 熱多寒少湯의 抗肥滿 效能을 研究하였다.

本 研究를 위하여 3T3-L1 脂肪前驅細胞를 인슐린을 包含한 分化誘導物質의 添加하여 脂肪細胞로의 分化를 유도하고, 熱多寒少湯을 處理하였다. 分化 初期 纖維芽細胞와 類似했던 脂肪前驅細胞들은 全體의으로 球形(spherical)이 되고, 여러 가지 外部 要因 및 C/EBP α 나 PPAR γ 와 같은 轉寫因子들의 發現을 통해 脂肪細胞로 分化하게 된다¹³. 脂肪細胞 分化 過程에서 細胞 內部에 脂肪이 蓄積되어 脂肪 방울(lipid droplet)이 細胞質에 나타나게 된다¹⁴. 中性脂肪 合成에 있어 GPDH는 글리세롤을 中性脂肪으로 變化시키는 酵素로 後期 脂肪細胞 分化에 있어 主要 因子 중 하나이다. GPDH 酵素 活性도가 減少하면 脂肪 生合成(*de novo synthesis*)의 減少로 初期 脂肪前驅細胞의 分化와 成熟한 脂肪細胞의 脂肪 形成(lipogenesis)를 抑制시키게 된다¹⁵. 本 研究에서는 分化를 誘導한 3T3-L1 細胞에서 熱多寒少湯을 處理한 경우 中性脂肪 및 GPDH 活性도를 有意的으로 減少시켰다.

過去 脂肪組織은 中性脂肪의 形態로 餘分の 에너지를 貯藏하는 單純한 貯藏庫의 役割을 하는 것으로 認知되었으나, 最近 脂肪組織은 多樣한 信號傳達 物質을 分泌하며 身體 內 生理作用을 調節하는 것으로 밝혀졌다. 脂肪은 여러 種類의 사이토카인과 케모카인 그리고 아디포카인 등을 分泌하는데, 아디포카인은 體重變化, 인슐린 感受性의 變化에 反應하여 分泌되며 脂肪形成, 炎症形成 등에 關與한다. 아디포카인의 代表的인 호르몬인 leptin은 視床下部의 食慾中樞를 刺戟하여 食慾 抑制를 誘導하는 호르몬으로 잘 알려져 있다¹⁶. 특히 白色 脂肪組織의 量이 많아질수록 分泌量이 增加

하고 禁食과 같이 사람의 營養의 狀態를 잘 反映한다¹⁷. 熱多寒少湯의 處理에 의한 3T3-L1 脂肪細胞의 leptin 分泌量이 有意的으로 減少하였는데 이는 GPDH 活性도와 비슷한 樣相을 보였다.

現在까지 熱多寒少湯의 抗肥滿 效能에 대한 研究論文은 없었으나, 그 構成 藥材들에 대한 效果는 報告된 바 있다. 熱多寒少湯 중 가장 많이 함유된 構成 藥材는 葛根이며, 高脂肪食餌를 攝取시킨 흰 쥐에서 葛根에 의한 인슐린 抵抗성과 아디포카인 發現을 調節함이 報告되었다¹⁸. 또 다른 構成 藥材인 黃芩은 db/db 생쥐에서 體重 및 血中 中性脂肪 含量을 減少시켰으며¹⁹, 高脂肪食餌로 誘導된 肥滿 생쥐에서 蘿蔔子 물 抽出物을 攝取시켰을 때 抗肥滿 效果가 나타내었다²⁰. 또한 桔梗은 肥滿과 인슐린 抵抗성을 緩和시켰으며 桔梗에서 抽出한 사포닌인 platyconic acid가 血中 인슐린을 改善시켰다^{21,22}. 한편, 單一 抽出物 이외에 黃芩과 桔梗을 混合해 抽出하였을 경우, *in vitro*에서 脂肪前驅細胞의 分化를 抑制하였으며 肥滿을 誘導한 생쥐에서 體重 및 體脂肪 減少를 誘導 하였으며 血中 콜레스테롤 濃도가 低下됨이 觀察되었다²³. 胰臟 地方分解酵素(pancreatic lipase)는 中性地方을 脂肪酸으로 分解하는 重要 酵素 中の 하나로²⁴, lipase 活性을 沮害는 脂肪의 消化 및 血中の 脂肪 吸收를 低下시킬 수 있다. 最近 天然物 抽出物이 lipase 沮害劑로서 作用하여 肥滿 및 肥滿 關聯 疾患을 改善하는 效果가 있음이 報告되어²⁵ 이를 이용한 lipase 沮害劑의 開發을 위한 研究가 進行되고 있다. 天然物の 範疇에 속하는 韓藥을 김²⁶ 등은 四象體質별로 藥物을 分類하고 이 藥物들의 lipase 沮害活性을 통해 抗肥滿 效能을 研究하였다. 熱多寒少湯의 7 種 構成 藥材들의 lipase 沮害活性을 보면 桔梗, 蘿蔔子, 升麻, 葛根이 각각 81.7%, 73.1%, 73%, 56.3% 씩 lipase 活性을 沮害하였다. 따라서 本 研究 結果와 이들 結果를 綜合해 볼 때 熱多寒少湯 內 藥材들 및 이를 함께 抽出하였을 때 確認되는 다른 活性 成分에 의한 相乘作用에 基因

한 결과라고 여겨진다.

本 연구와 같이 中國, 日本 等地에서 傳統韓藥을 基盤으로 한 處方들에 대한 抗效能이 報告되었다. 本 연구와 同一한 細胞인 3T3-L1에 黃連解毒湯²⁷ 및 防風通聖散²⁸을 處理한 경우, 脂肪細胞의 分化 및 脂肪 蓄積을 抑制를 確認하였다. 抗效能 效能은 細胞 水準의 實驗 뿐 만 아니라, 肥滿 動物 모델을 利用한 實驗에서도 觀察되었다. 防風通聖散은 高脂肪食餌로 誘導한 KK/Ta 생쥐에서 uncoupling protein (UCP)-1 發現을 增加시켰으며²⁹, 淸肺瀉肝湯은 db/db 생쥐에서 體重 減少, 血漿 中性地質 減少 및 (UCP)-1 發現을 增價를 통하여 抗肥滿 效能을 提示하였다³⁰. 또한, xiao-gao-jiang-zhuo는 肥滿 動物모델에서 刊 組織 protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B 發現을 減少시켰음이 報告되었다³¹. 이들 研究結果는 肥滿의 表現型 變化에 따른 結果뿐만 아니라, 關聯 遺傳子 또는 蛋白質의 發現을 調節하는 등 漢藥處方을 바탕으로 한 抗效能 治療劑로의 새로운 可能性을 提示한다. 따라서 本 研究도 脂肪細胞를 利用한 效能 結果를 바탕으로 動物實驗 모델을 利用하여, 熱多寒少湯의 抗肥滿 活性를 檢證하고, 그 作用機轉에 대한 深度 있는 研究 또한 進行되어야 할 것이다.

V. 結 論

本 研究는 熱多寒少湯의 實驗의 方法을 통하여 熱多寒少湯의 抗肥滿 效能을 確認하였다. 熱多寒少湯은 脂肪細胞의 分化를 誘導한 3T3-L1 細胞의 分化를 抑制시키고, 이 과정에서 中性脂肪 蓄積을 減少시켰고, 이와 關聯된 GPDH 活性도와 leptin 生成量 또한 減少시켰다. 따라서 熱多寒少湯은 體脂肪 減少와 關聯하여 이를 토대로 한 肥滿 豫防 및 治療劑 開發에 效能이 있는 素材로 使用될 수 있을 것으로 생각된다. 한편 이러한 效能은 處方 속 含有된 多様な 藥材들의 多量の 플라보노이

드 및 페놀성 化合物과 關聯性이 있음으로 思料되나, 어떠한 生理活性 物質이 脂肪 蓄積을 抑制하는 지에 대한 研究가 必要할 것이다.

VI. 感謝의 글

本 研究는 韓國한의학연구원에서 지원하는 ‘표준 한방처방EBM구축사업 (K12031)’에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

VII. 參考文獻

- 2010, Health report 2000. World Health Organization. Available from: www.who.int/whr/2000/en/whr00_en.pdf.
- MA WD, Jang EA. Plain Questions of Huangdi's Internal Classic. Seoul:Seongbosa. 1975;224, 272-273, 330
- National federation of department of sasang constitutional medicine, colleges of oriental medicine. Sasang constitutional medicine. 2nd Ed. Seoul:Jipmoondang. 2004;638-639, 645-646.
- Kim DR, Beck TH. Clinical study on corelation of obesity and Sasang constitution. J Sasang Constitut Med. 1996; 8(1):219. (Korean)
- Cho MS, Koh BH, Song IB. A Clinical Study of the obesity patients according to the Sasang Constitution. J Sasang Constitut Med. 1998;10(2):485-511. (Korean)
- Shin DJ, Kim DR, Kim SH. The effect of Tacumjowetang and herba ephedrae on the obese mRNA and TMF- α mRNA in obesity-induced rats. J Sasang Constitut Med. 2001;13(1):79-87. (Korean)
- Won JS. New Compilation of Four constitutional Medicine. Seoul:Jonghab-uiwonsa. 1974
- Green, H and Meuth, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. Cell.

- 1974;3:127-133.
9. Sahai A, Patel MS, Zavosh AS & Tannen RL. Chronic hypoxia impairs the differentiation of 3T3-L1 fibroblast in culture: role of sustained protein kinase C activation. *Journal of Cell Physiology*. 1994; 160: 107 - 112.
 10. National Health and Nutrition Examination Survey Report. 2010. Available from: http://knhanes.cdc.gov/knhanes/sub04/sub04_03.do?classType=7
 11. Buyukhatipoglu H. A possibly overlooked side effect of Orlistat: gastroesophageal reflux disease. *J Natl Med Assoc*. 2008;100(10):1207.
 12. Van der Zwaal EM, Janhunen SK, Luijendijk MC, Baclesanu R, Vanderschuren LJ, Adan RA, et al. Olanzapine and sibutramine have opposing effects on the motivation for palatable food. *Behav Pharmacol*. 2012;23(2):198-204.
 13. P Cornelius, O A MacDougald, and M D Lane. Regulation of Adipocyte Development Annual Review of Nutrition. 1994;14:99-129.
 14. Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature*. 1998;396:377-380.
 15. He ML, Wang Y, You JS, Mir PS, McAllister TA. Effect of a seaweed extract on fatty acid accumulation and glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids*. 2009;44(2):125-132.
 16. Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Bricqs SL, Churgay LM, Clawson DK et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*. 1997;387(6629):206-209.
 17. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1995;1(11): 1155-1161.
 18. Zhang W, Liu CQ, Wang PW, Sun SY, Su WJ, Zhang HJ, et al. Puerarin improves insulin resistance and modulates adipokine expression in rats fed a high-fat diet. *Eur J Pharmacol*. 2010;649(1-3):398-402.
 19. Song KH, Lee SH, Kim BY, Park AY, Kim JY. Extracts of *Scutellaria baicalensis* Reduced Body Weight and Blood Triglyceride in db/db Mice. *Phytother Res*. in press
 20. Lee JR, Shin JH, Byun SH, Park SJ, Mi JP, Sang MK, et al. Anti-obese and Hypolipemic Effects of the Aqueous Extracts of Raphani Semen in Mice Fed High Fat Diet *J Korean Soc. Appl. Bio. Chem*. 2009;52(1): 50-57. (Korean)
 21. Lee CE, Hur HJ, Hwang JT, Sung MJ, Yang HJ, Kim HJ et al. Long-Term Consumption of *Platycodi Radix* Ameliorates Obesity and Insulin Resistance via the Activation of AMPK Pathways. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012. in press
 22. Kwon DY, Kim YS, Ryu SY, Choi YH, Cha MR, Yang HJ, et al. *Platyconic acid*, a saponin from *Platycodi radix*, improves glucose homeostasis by enhancing insulin sensitivity in vitro and in vivo. *Eur J Nutr*. 2012;51(5):529-540.
 23. Han S, Oh KS, Yoon Y, Park JS, Park YS, Han JH, et al. Herbal extract THI improves metabolic abnormality in mice fed a high-fat diet. *Nutr Res Pract*. 2011; 5(3):198-204.
 24. Bitou, N., M. Nimomiya, T. Tsjita and H. Okuda. Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids*. 1999;34:441-445.
 25. National Institute of Health Consensus Development Conference Statement. Health implacation of obesity. *Ann intern Med*. 1985;130:147-151.
 26. Kim JH, Kim JW. Experimental atudy on anti-obesity effect accroding to inhibitory effect against lipase activity of sasang constitution medicines. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2005;19(3):710-715. (Korean)
 27. Ikarashi N, Tajima M, Suzuki K, Toda T, Ito K, Ochiai W, et al. Inhibition of preadipocyte differentiation and lipid accumulation by Orengedokuto treatment of 3T3-L1 cultures. *Phytother Res*. 2012; 26(1):91-100.

28. Cha MK, Lee JY, Kim DG, Lee KT. Effects of Bangpoongtongsungsan on adipose tissue and hyperlipidemia of 3T3-L1 induced rats. *J Korean oriental pediatrics*. 2006;20(2):177-196. (Korean)
29. Akagiri S, Naito Y, Ichikawa H, Mizushima K, Takagi T, Handa O, et al. Bofutsushosan, an Oriental Herbal Medicine, Attenuates the Weight Gain of White Adipose Tissue and the Increased Size of Adipocytes Associated with the Increase in Their Expression of Uncoupling Protein 1 in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2008;42(2):158-166.
30. Kim EK, Sul YK, Chio JJ, Jeon SH, Kim H, Kim JW. Effect of Cheongpesagan-tang on the Change of Inhibitory Effect against Lipase Activity and Weight Loss, Plasma and UCP1, 2 mRNA Expression in db/db Mouse. *J Sasang Constitut Med*. 2007; 19(1):171-185. (Korean)
31. Li M, Chang B, Zhen Z, Qin PJ, Liu WK, Tong XL. Hepatic PTP1B expression involvement in the effects of Chinese medicine formula xiao-gao-jiang-zhuo using an obese rat model. *Am J Chin Med*. 2011; 39(2):301-313.