

丁香藥鍼이 고지방 식이 유발 비만 白鼠에 미치는 영향

김성진¹, 이현종¹, 이봉효¹, 이윤규¹, 임성철¹, 정태영², 김재수^{1,*}

¹대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

²제한동의학술원



[Abstract]

The Effects of Pharmacopuncture(*Eugenia caryophyllata* T_{HUNB.}) on the High Fat Diet-induced Obese ICR Mice

Sung Jin Kim¹, Hyun Jong Lee¹, Bong Hyo Lee¹, Yun Kyu Lee¹, Seong Chul Lim¹, Tae Young Jung² and Jae Soo Kim^{1,*}

¹Department of Acupuncture & Moxibustion, Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University

²Je-Han Oriental Medical Academy

Objectives : The purpose on this study is to show the anti-obesity effect of *Eugenia caryophyllata* T_{HUNB.} pharmacopuncture in mice fed a high fat diet.

Methods : Male ICR mice were divided into three groups, which were fed a normal AIN diet(N), a high fat diet(CT), a high fat diet and injected with 50 mg/kg of *Eugenia caryophyllata* T_{HUNB.} pharmacopuncture(EC) for 8 weeks.

Results : 1. The levels of body weight gains were significantly increased in CT compared with N and decreased in EC compared with CT.

2. The levels of absolute liver weight and adipose-tissue weight were significantly decreased in EC compared with CT. The levels of relative adipose-tissue weight were significantly decreased in EC compared with CT.

3. The levels of total cholesterol(TG), triglycerid(TC), high density lipoprotein(HDL) cholesterol and low density lipoprotein(LDL) cholesterol were significantly increased in CT compared with N and decreased in EC compared with CT. The levels of HDL/LDL ratio were shown there were no significant differences in all groups.

4. The levels of adiponectin in serum were remarkably decreased in CT compared with N and significantly increased in EC compared with CT.

5. The levels of measuring adipocyte number in adipose tissue was significantly decreased in CT compared with N and increased in EC compared with CT.

Conclusions : These results suggest that *Eugenia Caryophyllata* T_{HUNB.} has an anti-obesity effect in mice and that the effect is mediated by inhibition of fat gain.

Key words :

Eugenia caryophyllata
T_{HUNB.};

Pharmacopuncture;
Obesity

Received : 2013. 05. 11.

Revised : 2013. 05. 29.

Accepted : 2013. 05. 29.

On-line : 2013. 06. 20.

* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion, Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 706-828, Republic of Korea

Tel : +82-53-770-2112 E-mail : jaice@hanmail.net

I. 서 론

비만이란 체지방의 과다상태를 말하며 건강을 해칠 정도로 체내지방이 과도하게 축적된 상태로 정의할 수 있다. 비만은 제2형 당뇨병, 심장병, 뇌졸중 등 각종 질병의 원인으로 작용하고 사회적·정신적으로도 장애를 일으키는 원인으로 밝혀지면서 반드시 치료되어야 하는 만성 질환이라는 인식이 확립되고 있다^{1,2)}.

비만은 최근 우리나라를 비롯하여 세계적으로 급격한 증가 추세에 있다. 국민건강영양조사에 따르면 신체질량지수가 25 이상인 성인은 1998년 26.0 %에서 2001년 29.2 %, 2005년 31.3 %, 2007년 31.7 %로 꾸준히 증가하고 있다. 또한 아동과 청소년 비만율은 1998년 약 5.8 %였지만 2007년에는 12.9 %로 급격히 증가하였다. 2007년 국민건강영양조사에 따르면 남성은 40대 비만이 37.9 %에서 50대에 41.7 %로 약간 증가한 반면, 여성은 40대 26.6 %에서 50대에는 43.1 %로 급격히 증가하였다^{3,4)}.

비만 인구가 증가하는 가운데 비만을 완화하는 여러 가지 치료 요법들이 도입되고 시도되고 있다. 비만의 가장 효과적인 방법은 운동요법과 식이요법을 병행하는 치료지만 현대인의 생활에 적용하기 어려운 부분이 있다. 이에 효율적인 치료 방법에 관한 연구가 활발히 진행되면서 약침제재를 활용한 비만 치료가 대안 중의 하나로 연구되고 있다. 한의학적인 연구로는 蒼朮·茵陳·蠅蚶·大腹皮 등을 이용한 동물 실험에서 유효한 효과가 보고되어 있으며, 임상실험은 복부비만, 허벅지 등 국소부위에 약침치료를 시행한 것이 대부분으로 일부 지표에서 유효한 결과가 있는 것으로 보고되어 있다⁵⁾.

丁香(*Eugenia caryophyllata* THUNB.)은 溫辛하고 脾胃腎經에 歸經하여 溫中降逆, 補腎助陽의 효능으로 脾胃虛寒, 呃逆嘔吐, 食少吐瀉, 心腹冷痛, 腎虛陽痿, 女子陰冷의 증상을 치료한다⁶⁾. 정향의 약리 효능으로는 항균⁷⁾, 항발암성⁸⁾, 항알레르기⁹⁾와 항돌연변이 효능이 있다¹⁰⁾. 그 중 eugenol은 주요한 성분 중 일종으로 항산화 효능¹¹⁾과 살충 기능성이 있다^{12,13)}. 특히 Kim et al¹⁴⁾은 정향에서 추출물을 분리 정제하여 효소의 활성도를 측정하는 실험을 하였고, 소화기관 내에서 지방을 분해하는 pancreatic lipase를 저해하여 지방의 흡수를 억제하는 효과가 있음을 보고하였다.

그러나 아직까지 국소비만에 미치는 정향약침에 대한 연구보고가 없어, 이에 본 연구자는 고지방 식이로 유도된 비만 白鼠에서 부작용이 거의 없는 천연 한약재인 정향을 이용하여 약침을 제조하였으며 이를 고지방 식이로 유발된 비만 백서에 주입한 후 체중변화, 혈청학적 지표, 지방조직

의 형태학적 소견 등 항비만 효과를 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에서 사용한 정향은 옴니허브(Youngchun, Korea)에서 구입한 것을 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학 교실에서 관능검사상 약전에 합격한 것만을 정선하여 사용하였다.

정향 200 g에 증류수 1 L를 첨가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 추출 여과액을 감압농축(45 ℃)을 한 후 동결 건조기를 이용하여 얻은 분말가루를 deep freezer (-84 ℃)에 보관하였다. 약침 주사액 제조는 밀리포어 0.24 μ m syringe filter를 사용하여, 여과한 것을 사용하였으며 약물 투입 농도는 50 mg/kg이었다. 본 실험은 대구한의대학교 동물실험 윤리규정을 준수하여 시행하였다.

2. 실험동물

실험에 사용한 마우스는 4주령의 웅성 ICR 마우스를 (주) 오리엔트(Sungnam, Korea)에서 구입하였다. 실험동물은 plastic mouse cage에 보관하여 동물실험실에서 온도 22±2 ℃, 상대 습도 50±5 %, light/dark cycle(12 h/12 h)의 조건하에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 1주일 후 고지방 식이(high fat diet)로 식이를 대체하였으며, 식이 1주일 후 체중을 측정하여 비만이 유발된 마우스만을 선별하여 그룹을 분리하였다. 실험 시작 시 한 그룹당 마우스는 15마리로 분리하였으며, 사료 적응기 후 무게 측정을 통해 각 군당 2마리씩 제거하여 최종 13수의 마우스로 각 군을 분류하였다.

실험동물은 일반 식이를 섭취한 정상군(N), 고지방 식이를 섭취한 대조군(CT), 고지방 식이를 섭취하고 정향약침 50 mg/kg을 주입한 실험군(EC)으로 나누었으며, 실험군은 전만 4주 동안은 하루에 1회, 후반 4주 동안은 2일에 1회 복강 주입 및 피하주입을 시행하였다. 체중은 주 1회, 사료 섭취량(food intake)은 주 3회 측정하였다. 본 실험에 사용한 식이는 피드랩(Guri-si, Korea)에서 공급받았으며 정상 식이(AIN-93G)와 고지방 식이(High Fat 45 % Diet, HFD)의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of the Experimental Diets

Formulation	AIN-93G		HFD 45 % diet	
	gm(%)	kcal(%)	gm(%)	kcal(%)
Protein	20	20	24	20
Carbohydrate	64	64	41	35
Fat	7	16	24	45
kcal/kg	4,000		4,776	
Ingredient	g	kcal	g	kcal
Casein(from milk)	200	800	200	800
Corn starch	397.486	1,590	155.036	620
Sucrose	100	400	50	200
Dextrose	132	528	132	528
Cellulose	50	0	50	0
Soybean oil	70	630	25	225
Lard	0	0	175	1,575
Mineral mixture	35	0	35	0
Vitamin mixture	10	40	10	40
TBHQ	0.014	0	0.014	0
L-cystine	3	12	3	12
Choline bitartrate	2.5	0	2.5	0
Total	1,000	4,000	837.6	4,000

3. 간 및 지방 무게 측정

마우스를 부검하고 방혈한 후 간을 적출하여 정밀저울(Mettler toledo EL202, Greifensee, Switzerland)로 간 무게의 절대중량을 측정하였다. 지방은 일률적으로 마우스 기준 왼쪽 부위를 분리하였으며 부고환주위지방, 신장주위 지방, 복부피하지방을 합하여 총 지방 무게를 정밀저울(Mettler toledo EL202, Greifensee, Switzerland)로 측정하였다. 간 및 지방의 상대중량은 절대 중량을 체중으로 나누어서 계산하였으며 자세한 공식은 아래와 같다.

상대중량(%) 산출 공식 = 장기의 절대 중량(mg)/체중(g) × 100

4. 혈액생화학적 지표분석

혈액지표분석을 위한 혈액채취는 12시간 절식 후 실시하였다. Ethyl ether로 마취시킨 후 복강정맥에서 혈액을 채취한 후 상온에서 약 30분 정치시켰다. 그 후 혈액을 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 혈청을 분석에 사용하였다. total cholesterol(TC), triglycerid(TG), high density lipoprotein(HDL)-cholesterol, low density lipo-

protein (LDL)-cholesterol을 시판 시약(Sentron GmbH, Dresden, Germany)을 구입하여 생화학분석기(METROLAB 1600R, USA)를 이용하여 측정하였다.

5. 지방조직의 형태적인 관찰

실험동물에서 적출한 간 조직 및 지방조직을 10 % neutral buffered formalin을 사용하여 고정하고 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을 두께 5 μ m의 관상 절편으로 제작한 후 xylene을 이용하여 파라핀을 제거하고, 100, 95, 90, 80, 70 % alcohol로 친수화한 후 Hematoxylin & Eosin(H&E)염색을 한 후 다시 과정을 거쳐 Canada balsam으로 봉입하고 광학현미경(Olympus optical microscope BX51, Japan)으로 관찰하였다.

6. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) assay

시판 중인 ELISA KIT(영인프론티어, 한국)를 구입하여 인슐린 감수성을 조절하는 호르몬인 adiponectin을 측정하였다. 혈청 중 adiponectin의 발현량 측정방법을 설명하면, 우선 혈액으로부터 혈청을 원심분리기로 이용하여 분리한다. 분리된 혈청은 완충용액으로 1 : 9로 희석(10 μ l 혈청에 90 μ l sample diluent buffer를 섞어 희석하여 sample을 제작)하여 총 용량을 100 μ l로 맞추어 둔다. 그리고 ABC working solution과 TMB color developing agent는 사용하기 전에 37 °C에서 30분 동안 가열한다.

Adiponectin의 standard 대조군 설정을 위해 4,000 pg/ml, 2,000 pg/ml, 1,000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml 농도의 mouse adiponectin standard solutions 을 96 well에 넣는다.

Control(zero well)로 mouse adiponectin standard solutions에 sample diluent buffer를 100 μ l의 빈 well에 넣는다. 마우스에서 분리한 혈청을 적당한 농도로 희석된 샘플을 각각 빈 well에 100 μ l씩 넣는다. 분주된 plate에는 seal로 커버로 덮고 37 °C에서 90분 동안 배양한다.

30분 후 cover를 제거하고 plate의 내용물을 제거한다. 그 다음 secondary antibody와 antibody diluent buffer를 1 : 100의 비율로 희석한 anti-mouse adiponectin antibody working solution을 각 well에 0.1 ml 넣고 37 °C에서 60분간 방치한다. 60분 후 0.01 M TBS or 0.01 M

PBS로 3회 세척(각 회당 1분간 세척액 방치)하고 세척액을 털어내어 제거한다.

각 well에 Avidin-Biotin-Peroxidase Complex와 ABC diluent buffer를 1 : 100의 비율로 희석한 ABC working solution을 0.1 ml씩 넣고 37 °C에서 30분간 방치한 후, 0.01 M TBS로 5회 세척(각 회당 1~2분간 세척액 방치)하고 세척액을 털어내어 제거한다. TMB color developing agent를 각 well에 90 μ l 넣고 25 °C에서 20~25분간 방치한다. TMB stop solution을 각 well에 0.1 ml 넣으면 색상이 바로 노란색으로 변한다. TMB stop solution을 넣고 30분 후에 450 nm로 OD 값을 ELISA reader(TECAN, Infinite M200 pro, Austria)로 측정하였다.

7. 자료분석 및 통계처리

모든 실험 결과는 SPSS for Windows(Release 14.0K, SPSS Inc, USA)를 이용하여 분석하였으며, 분석결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 각 군의 결과값에 대해 one-way ANOVA 분석 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 p -value가 $p < 0.05$ 이하인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 체중변화

초기 체중은 정상군(N)은 28.3 ± 3.1 g, 대조군(CT)은 28.4 ± 1.9 g, 실험군(EC)은 28.6 ± 2 g으로 나타났다. 최종 체중은 정상군은 35.1 ± 4.4 g, 대조군은 38.2 ± 2.7 g, 실험군은 34.5 ± 3 g으로 측정되었다.

정상군에 비해 대조군의 체중이 증가하였고, 실험 종료 시인 8주까지 체중이 증가하였다. 실험군의 체중은 4주부터 유의성 있는 차이가 나타났으며, 8주까지 분석 결과 대조군에 비해 유의성 있게 체중이 감소되었다(Fig. 1).

사료 섭취량은 정상군 8.4 ± 0.2 g, 대조군 8.7 ± 1.0 g, 실험군 7.6 ± 0.6 g으로 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

2. 간 및 지방 무게분석

실험 종료 후, 장기 적출을 통해 간과 지방을 분리하였으

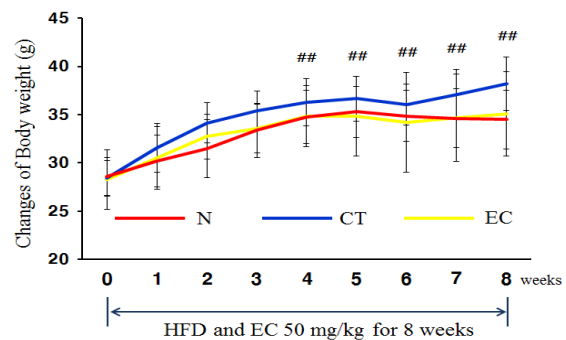


Fig 1. The effect of body weight for eight weeks on N, CT and EC

Comparisons between CT and EC were analyzed using Student's t -test(## : $p < 0.01$).

N : normal mice group fed with AIN(American Institute of Nutrition) diet for 8 weeks.

CT : control mice group fed with high fat diet for 8 weeks.

EC : experiment mice group fed with high fat diet for 8 weeks and injected with 50 mg/kg of *Eugenia caryophyllata* T_{HUNB}, pharmacopuncture.

Table 2. The Change of Absolute and Relative Liver and Fat Mass Weight in N, CT and EC

Measure	Absolute weight		Relative weight	
	Liver	Fat mass	Liver	Fat mass
	g	g	%	%
N	1.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	4.3 ± 0.3	1.2 ± 0.2
CT	$1.5 \pm 0.1^*$	$0.7 \pm 0.2^{**}$	4.1 ± 0.4	$1.8 \pm 0.4^{**}$
EC	$1.4 \pm 0.1^{\#}$	$0.5 \pm 0.2^{\#\#}$	4 ± 0.3	$1.5 \pm 0.6^{\#\#}$

Comparisons between N and CT were analyzed using Student's t -test(* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$).

Comparisons between CT and EC were analyzed using Student's t -test(# : $p < 0.05$; ## : $p < 0.01$).

N : normal mice group fed with AIN diet for 8 weeks.

CT : control mice group fed with high fat diet for 8 weeks.

EC : experiment mice group fed with high fat diet for 8 weeks and injected with 50 mg/kg of *Eugenia caryophyllata* T_{HUNB}, pharmacopuncture.

며 간의 절대 중량을 측정한 결과, 대조군(CT)이 정상군(N)에 비해 유의성 있게 증가하였고(* : $p < 0.05$), 실험군(EC)은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(# : $p < 0.05$) (Table 2).

복벽 피하지방, 부신주위지방과 부고환주위지방을 적출하여 함께 무게를 측정한 결과, 대조군이 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였고(** : $p < 0.01$), 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(## : $p < 0.01$) (Table 2).

간의 상대 중량을 측정한 결과 정상군과 대조군 및 실험군 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다(Table 2). 그러나 지방조직 상대 중량을 분석한 결과, 대조군이 정상군에 비

해 유의성 있게 증가하였고(** : $p < 0.01$), 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(## : $p < 0.01$)(Table 2).

3. 혈액 생화학적 분석

1) 혈청 내 TG 함량 분석

정상군(N)은 135.6 ± 2.1 ng/ml, 대조군(CT)은 189.2 ± 5.1 ng/ml, 실험군(EC)은 145 ± 3.9 ng/ml로 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였고(* : $p < 0.05$)(Fig. 2), 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(# : $p < 0.05$)(Fig. 2).

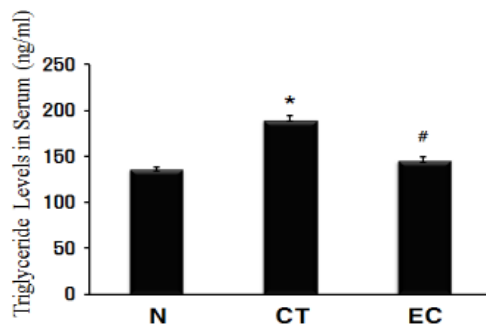


Fig 2. The effect of TG levels in serum on N, CT and EC

Comparisons between N and CT were analyzed using Student's *t*-test(* : $p < 0.05$).

Comparisons between CT and EC were analyzed using Student's *t*-test(# : $p < 0.05$).

N : normal mice group fed with AIN diet for 8 weeks.

CT : control mice group fed with high fat diet for 8 weeks.

EC : experiment mice group fed with high fat diet for 8 weeks and injected with 50 mg/kg of *Eugenia caryophyllata* THUNB. pharmacopuncture.

2) 혈청 내 TC 함량분석

정상군(N)은 5.1 ± 2.3 ng/ml, 대조군(CT)은 62.8 ± 7.4 ng/ml, 실험군(EC)은 40.3 ± 5.8 ng/ml로 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였다(*** : $p < 0.001$)(Fig. 3). 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(### : $p < 0.001$)(Fig. 3).

3) 혈청 내 HDL cholesterol 함량분석

정상군(N)은 88.2 ± 20.4 ng/ml, 대조군(CT)은 110.3 ± 9.7 ng/ml, 실험군(EC)은 99.6 ± 5 ng/ml로 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였다(** : $p < 0.01$)

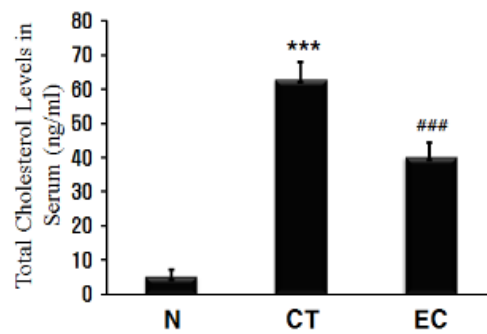


Fig 3. The effect of total cholesterol levels in serum on N, CT and EC

Comparisons between N and CT were analyzed using Student's *t*-test(*** : $p < 0.001$).

Comparisons between CT and EC were analyzed using Student's *t*-test(### : $p < 0.001$).

N : normal mice group fed with AIN diet for 8 weeks.

CT : control mice group fed with high fat diet for 8 weeks.

EC : experiment mice group fed with high fat diet for 8 weeks and injected with 50 mg/kg of *Eugenia caryophyllata* THUNB. pharmacopuncture.

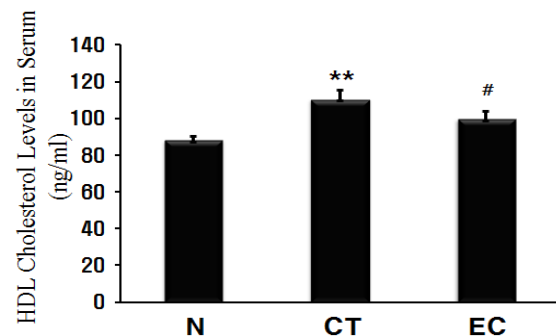


Fig 4. The effect of HDL cholesterol levels in serum on N, CT and EC

Comparisons between N and CT were analyzed using Student's *t*-test(** : $p < 0.01$). Comparisons between CT and EC were analyzed using Student's *t*-test(# : $p < 0.05$).

N : Normal mice group fed with AIN diet for 8 weeks.

CT : Control mice group fed with high fat diet for 8 weeks.

EC : experiment mice group fed with high fat diet for 8 weeks and injected with 50 mg/kg of *Eugenia caryophyllata* THUNB. pharmacopuncture.

(Fig. 4). 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(# : $p < 0.05$)(Fig. 4).

4) 혈청 내 LDL cholesterol 함량분석

정상군(N)은 36.1 ± 2.5 ng/ml, 대조군(CT)은 73.6 ± 6.6 ng/ml, 실험군(EC)은 42.2 ± 5 ng/ml로 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였다(* : $p < 0.05$)(Fig. 5). 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(## : $p < 0.01$)(Fig. 5).

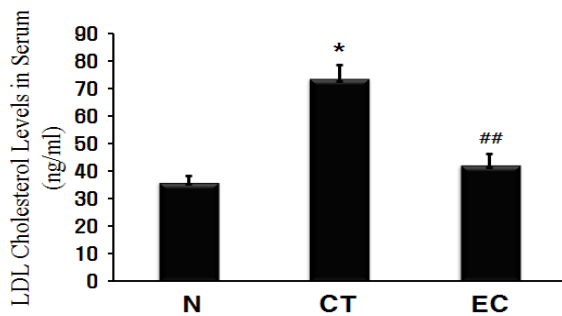


Fig 5. The effect of LDL cholesterol levels in serum on AN, CT and EC

Comparisons between N and CT were analyzed using Student's *t*-test(* : $p < 0.05$). Comparisons between CT and EC were analyzed using Student's *t*-test(## : $p < 0.05$).

N : normal mice group fed with AIN diet for 8 weeks.

CT : control mice group fed with high fat diet for 8 weeks.

EC : experiment mice group fed with high fat diet for 8 weeks and injected with 50 mg/kg of *Eugenia caryophyllata* T_{HUNE}, pharmacopuncture.

5) 혈청 내 HDL/LDL ratio 분석

정상군(N)은 2.1 ± 0.2 , 대조군(CT)은 2 ± 0.4 , 실험군(EC)은 2.3 ± 0.2 로 나타났다. 실험군은 대조군에 비해 15 % 증가하였으나, 세 군 사이에 유의성 있는 차이는 없었다.

4. ELISA assay

혈청 내 adiponectin 함량 분석에서 정상군(N)은 3.2 ± 2.5 pg/ml, 대조군(CT)은 2.6 ± 1 pg/ml, 실험군(EC)은 8.0 ± 0.8 pg/ml로 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 감소

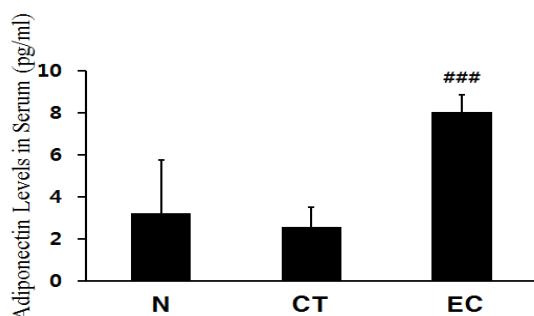


Fig 6. The effect of adiponectin levels in serum on N, CT and EC

Comparisons between CT and EC were analyzed using Student's *t*-test(### : $p < 0.001$).

N : Normal mice group fed with AIN diet for 8 weeks.

CT : Control mice group fed with high fat diet for 8 weeks.

EC : experiment mice group fed with high fat diet for 8 weeks and injected with 50 mg/kg of *Eugenia caryophyllata* T_{HUNE}, pharmacopuncture.

하였으나 유의성 있는 차이는 없었다. 그러나 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(### : $p < 0.001$)(Fig. 6).

5. 조직학적 분석

중성 포르말린으로 고정한 간 조직과 지방 조직을 H&E 염색하여 분석한 결과, 지방조직의 경우 대조군(CT)은 정

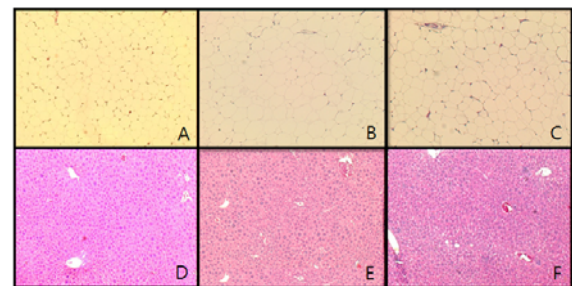


Fig 7. The histological analysis in liver and fat tissue on N, CT and EC

Fixed tissue were made by paraffin block, cut 5 μ m with microtome and stained by H&E.

A : the fat tissue of N.

B : the fat tissue of CT.

C : the fat tissue of EC.

D : the liver tissue of N.

E : the liver tissue of CT.

F : the liver tissue of EC.

N : normal mice group fed with AIN diet for 8 weeks.

CT : control mice group fed with high fat diet for 8 weeks.

EC : experiment mice group fed with high fat diet for 8 weeks and injected with 50 mg/kg of *Eugenia caryophyllata* T_{HUNE}, pharmacopuncture.

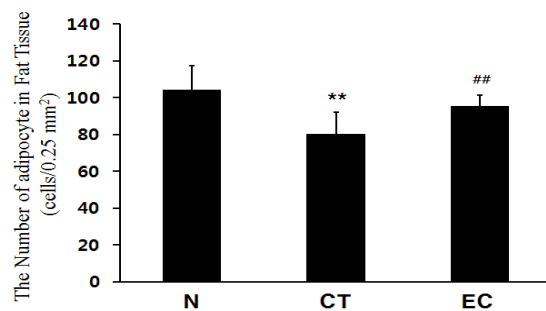


Fig 8. The effect of adipocyte number in the fat tissue on N, CT and EC

Comparisons between N and CT were analyzed using Student's *t*-test(** : $p < 0.01$). Comparisons between CT and EC were analyzed using Student's *t*-test(## : $p < 0.01$).

N : normal mice group fed with AIN diet for 8 weeks.

CT : control mice group fed with high fat diet for 8 weeks.

EC : experiment mice group fed with high fat diet for 8 weeks and injected with 50 mg/kg of *Eugenia caryophyllata* T_{HUNE}, pharmacopuncture.

상군(N)에 비해 지방세포가 커진 것을 확인할 수 있었으며, 실험군(EC)은 대조군에 비해 세포의 크기가 감소하였다(Fig. 7A~C).

간 조직의 경우, 정상군과 대조군·실험군 간에 별다른 차이점은 보이지 않았다(Fig. 7D~F).

또한 현미경으로 0.25 mm² 단위 면적당 지방세포 숫자를 분석한 결과, 정상군은 104.1±13.4개, 대조군은 80.1±12개, 실험군은 95.1±6.4개로 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 감소하였으며(** : $p<0.01$)(Fig. 8), 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(## : $p<0.01$)(Fig. 8).

IV. 고 찰

비만은 생체 내의 에너지 흡수와 에너지 소비의 불균형 결과로 생기는 현상으로 신체 여러 조직, 특히 피하조직에 지방이 과도하게 축적된 상태이다. 최근 우리나라에서도 경제 성장에 따른 서구적인 생활습관으로 지속적인 에너지 공급과잉이 이루어 졌는데 비해 전형적인 운동 부족으로 남녀노소를 불문하고 비만 인구가 계속 증가하고 있다¹⁵⁾.

비만은 비정상적 체내대사 혹은 내분비상태를 유발하여 혈청 TG 및 TC를 증가시켜 비정상적인 심혈관계 질환, 당뇨병, 고혈압, 관절염, 지방간, 암 등을 유발할 수 있는 위험요인이며 골관절염의 위험도를 13배 증가시키고 대인관계나 정서적 문제 등 심리적 건강에도 문제를 일으킨다¹⁵⁾. 특히 복부가 나오는 중심형 비만이 더욱 나쁜 영향을 미치는데 이는 복강 내 내장지방의 현저한 비만증으로 당뇨병, 고지혈증, 고혈압 등의 성인성 만성 질환의 합병증을 일으키기 쉽다^{16,17)}.

비만 치료는 지방흡수 억제, 식욕 억제, 지방분해 촉진, 운동요법의 네 가지 방법을 기본으로 연구된다. 지방흡수 억제 치료는 lipase를 비활성 하는 것으로 대표적으로 orlistat이 있다. 하지만 지용성 비타민의 흡수를 저해하고 신경학적·심리적인 부작용이 있다. 식욕 억제 치료에 사용되는 약물은 대표적으로 sibutramine이 있으나 두통, 구건, 변비, 불면 등의 부작용이 있고 혈압을 상승시켜 고혈압, 심혈관질환, 빈맥을 동반하는 환자에서는 사용을 금하고 있다⁴⁾.

최근에는 지방의 분해를 촉진하는 치료가 연구되고 있으며 대표적인 기전으로는 cAMP(cyclic adenosine monophosphate) pathway가 잘 알려져 있으며 phospho- diesterase(PDE)

와 hormone sensitive lipase(HSL)는 이에 관여하는 중요한 효소이다¹⁸⁾. 특히 HSL은 지방분해 과정에서 매우 중요한 lipase로 인식되어 왔으며 insulin과 epinephrine 등의 호르몬 조절을 받는다. 세포 내 cAMP가 증가하면 protein kinase A(PKA)가 활성화되고, PKA에 의해 인산화 된 HSL이 지방세포에 축적된 triacylglycerol을 지방산과 글리세롤로 분해한다. 최근에는 adipose triglyceride lipase(ATGL)가 TG에 특이적으로 작용하는 지방분해 효소로 밝혀져 연구되고 있다¹⁹⁾.

비만을 한의학에서는 《黃帝內經·素問·通評虛實論》²⁰⁾에서 “肥貴人 膏粱之疾也”라고 하여 원인에 의한 간단한 정의로 최초 언급하였고, 근본적으로는 장부의 기가 허하다는 데 있다. 무력한 운화작용으로 인하여 이차적으로 濕痰이 발생하고 濕痰은 동시에 수액대사를 실조케 하여 다시 비만의 원인이 된다²¹⁾. 이에 치료는 한의학적 변증을 거쳐 증상에 맞는 치료를 시행한다.

비만과 관련된 연구를 고찰해 보면, Cho et al²²⁾은 무작위대조 임상실험을 하여 침치료가 비만에 효과가 있다고 보고하였으며, Hwang et al²³⁾은 전침을 시행하고 허벅지 둘레를 측정하는 임상실험을 통해 저주파 전침자극요법이 국소 지방분해효과와 체지방률을 감소하는 효과가 있다고 보고하였고, Shin et al²⁴⁾은 한약치료 및 전침치료를 병행한 복부비만치료를 시행하여 허리둘레와 피하지방, 내장지방의 감소에 효과가 있었다고 보고하였다.

최근에는 약침요법을 사용하여 비만치료 효과에 대한 연구가 보고되었으며, 단일 약재만 사용한 경우부터 처방을 약침액으로 사용한 연구까지 다양하게 연구되고 있다. 동물실험의 경우 Youh et al²⁵⁾은 인진약침이 비만 및 동반대사이상을 개선시키는 효과가 있다고 보고하였고, Kwon²⁶⁾은 구인약침이 지질강하 효과, 항산화 효과가 있다고 보고하였으며, 유²⁷⁾는 창출약침이 체중 감소, 지방중식 억제 등 비만 치료에 효과가 있음을 보고하였고, 장²⁸⁾은 하고초·감국·갈근 혼합약침은 비만과 관련된 여러 생체 지표들을 개선하는 데 효과가 있다고 보고하였다. 임상 실험의 경우 Lim et al²⁹⁾은 봉독 약침이 복부비만에 효과가 있고 국소 비만 치료에 유효하다는 근거를 찾았다고 보고하였고, Cha et al³⁰⁾은 傷食1호 팔강약침이 체지방감소에 유효한 효과가 있으며 비만에 전반적으로 효과가 있는 것으로 보고하였다.

정향은 도금낭과(Myrtaceae)에 속한 상록목인 丁香樹의 花蕾를 건조한 것으로 花蕾가 綠色에서 紅色으로 될 때 채취하여 曬乾한다. 정향은 정유를 다량 함유하고 있는데, 그 주요 성분은 eugenol, β -caryophyllene, benzaldehyde acetyl eugenol, humulene이고, 탄닌 성분으로는 eugenin, casuarictin, 1,3-di-O-galloyl-4,6-(S)-hexahydroxydiphenyl-

β -D-glucopyranose and tellimagrandin이 있으며, 이외에 biflorin and isobiflorin 등이 함유되어 있다^{6,31}. 溫中降逆, 補腎助陽하는 효과가 있어서 脾胃虛寒, 呃逆嘔吐, 食少吐瀉, 心腹冷痛, 腎虛陽痿, 女子陰冷의 증상이 있는 환자에게 사용된다.

정향에 대한 현대 약리연구로는 Lee³²)가 정향 추출물의 항균성과 항산화 효능을 연구 보고 하였고, Dong³³)이 추출물별 정향의 생리 활성은 보고하였고, Lee³⁴)가 계피와 정향에서 분리한 항균 활성 물질이 식품부패 유발 미생물에 미치는 항균 효능을 연구하였으며, Leem et al³⁵)이 한방증류추출액의 휘발성 향기성분의 분석과 정향 eugenol 유도체의 항산화 및 항염증 활성을 연구 보고하였으며, Kwon³⁶)은 정향 추출물의 항진균 효능과 유효성분 분리 및 동정 결과를 보고하였으며, Dong et al³⁷)은 용매별 정향 추출물의 항산화 효과를 비교 연구하였고, Lee et al³⁸)은 용매별 정향 추출물의 항균활성을 연구 보고하였으며, Yang et al³⁹)은 정향 추출물의 항산화와 항혈소판 응집효과, 혈전 용해능 효과를 연구 보고하였다.

그러나 아직까지 정향약침에 대한 항비만 효능은 연구되지 않았으며, 정향약침의 비만 예방 효과를 조사하기 위하여 8주 동안 45 % (W/W)의 지방이 함유된 고지방 식이를 실험대조군으로 공급하면서 실험군으로 정향약침(50 mg/kg)을 복부 주입하였다. 정상대조군은 16 % 지방을 포함한 식이를 8주간 공급하였다.

8주 사육 후 ICR mouse의 사료 섭취량을 조사한 결과, 정상군보다 대조군이 약간 증가하였고 실험군은 약간 감소하였으나 그룹 간 유의적 차이는 보이지 않았다.

실험기간 내 체중 변화를 측정한 결과 초기 체중은 정상군은 28.3±3.1 g, 대조군은 28.4±1.9 g, 실험군은 28.6±2 g으로 그룹 간 유의성이 없었으나, 부검 전 HFD 섭취 종료 뒤 최종 체중은 정상군은 35.1±4.4 g, 대조군은 38.2±2.7 g, 실험군은 34.5±3 g으로 실험군에서 유의성 있게 감소하였다. 이러한 변화는 4주째부터 유의성이 있었다(Fig. 1).

그런데 대조군과 실험군 사이에 사료 섭취량에 유의성이 없는 것으로 보아, 이는 약물의 약리 효능에 따라 체중 감소 변화가 나타날 것으로 판단되며, 실험군의 체중이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 1).

간 장기와 지방 조직의 절대 무게와 상대 무게를 분석한 결과, 절대 무게에서 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다 (Table 2). 또한 지방 덩어리의 절대 무게를 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table 2). 상대 무게 분석결과, 간 조직의 상대 중량은 정상군과 대조

군·실험군 간의 유의적 차이는 보이지 않았으나, 지방 덩어리 상대 무게에서 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, 실험군은 정상군과는 유의성 있는 차이가 없었고, 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table 2). 이러한 결과는 지방 덩어리에 대한 육안적 관찰 결과와도 일치한다. 따라서 정향약침 주입은 비만 유도 백서에서 피하지방, 부신주위지방, 부고환주위지방의 무게를 유의성 있게 감소시켰다고 판단된다.

비만 유도를 통한 고지혈증의 진행 여부를 알아보기 위해 TG, TC, HDL cholesterol, LDL cholesterol, HDL/LDL ratio를 측정하였다. 혈청 내 TG 함량을 분석한 결과, 정상군은 135.6±2.1 mg/ml, 대조군은 189.2±5.2 mg/ml로 유의성 있게 증가하였으며(Fig. 2), 실험군의 TG 함량은 145±4 mg/ml로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2). 혈청 내 총 TC 함량은 정상군은 5.1±2.3 mg/ml, 대조군은 62.8±7.4 mg/ml, 실험군은 40.3±5.8 mg/ml로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 3). 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

혈청 중 HDL cholesterol 함량을 분석한 결과, 정상군은 88.2±20.4 mg/ml, 대조군은 110.3±9.7 mg/ml, 실험군은 99.6±5 ng/ml로 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 4). 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4). 혈청 중 LDL cholesterol 함량을 분석한 결과, 정상군은 36.1±2.5 mg/ml, 대조군은 73.6±6.6 mg/ml, 실험군은 42.2±5 ng/ml로 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 5). 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

따라서 대조군은 혈청 내 TG, TC, HDL cholesterol, LDL cholesterol 함량이 정상군에 비해 유의성 있게 증가된 반면, 실험군의 TG, TC, HDL cholesterol, LDL cholesterol 함량은 유의성 있게 대조군에 비해 감소하였다. 이는 정향약침이 비만과 관련된 혈중 지표들을 감소시켜 고지혈증에 유효하다고 판단된다. HDL/LDL ratio는 실험군에서 대조군에 비해 15 % 증가하였으나 유의성 있는 차이는 없었다.

Adiponectin은 근육과 간 조직에서 인슐린의 민감성을 높이고 지방의 산화를 증가시켜 체중을 줄인다. Adiponectin은 비만일 경우 정상군에 비해 농도가 감소한다⁴⁰). 혈청 중 adiponectin 함량을 분석한 결과, 정상군은 3.2±2.5 pg/ml, 대조군은 2.6±1 pg/ml, 실험군은 8.0±0.8 pg/ml로 정상군에 비해 대조군이 감소하였으나 유의성 있는 차이는 없었다. 그러나 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 정향약침이 지방의 산화를 증가시켜 체중을 감소시키는 효과가 있음을 추정하는 근거가

될 수 있다.

현미경을 이용하여 0.25 mm² 단위 면적당 지방세포 수를 분석한 결과, 정상군은 104.1±13.4개, 대조군은 80.1±12개로 유의성 있게 세포수가 감소하였으며(Fig. 8), 실험군은 95.1±6.4개로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 8). 따라서 정향약침을 국소 부위에 주입한 경우 지방세포 크기가 대조군에 비해 감소하였음을 알 수 있었다. 이는 정향약침이 지방세포에 지방 축적을 억제하고 성장을 저해했다고 사료되며 이는 지방의 상대 중량 결과와도 일치한다(Table 2).

이상의 결과로 정향약침을 복부에 국소 주입하여 비만 유도 백서에 미치는 영향을 살펴본 결과, 정향약침은 전신적으로는 혈중 고지혈증을 개선시키며, 국소적으로는 지방 조직의 증가를 저해시켜 상대 중량에서 유의성 있는 감소를 나타내고 있으며, 조직학적으로는 단위면적당 지방세포 수가 대조군에 비해 증가하였으므로, 정향약침이 지방세포의 증식과 크기를 유의성 있게 억제시켰음을 알 수 있었다. 향후 연구를 통해 정향을 열수 추출하여 제조한 약침 중 분획을 통해 유효성분이 많은 분획층을 찾아내고 나아가 성분을 분리 동정할 수 있는 후속연구가 필요하다고 판단되며, 아울러 지방조직의 증식억제에 미치는 기전 연구를 향후 수행해야 한다고 사료된다.

V. 결 론

정향약침에 대한 국소지방 및 비만 유발 백서에 미치는 영향을 알아보기 위해, 본 연구자는 정상군·대조군·실험군을 나누어 8주간 약물을 투여하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 체중변화 분석결과, 대조군은 정상군에 비해 유의적으로 체중이 증가하였고, 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.
2. 간과 지방조직의 무게 측정결과, 실험군은 대조군에 비해 간과 지방조직의 절대 중량과, 지방의 상대 중량이 유의성 있게 감소하였다.
3. 혈액생화학적 분석결과, TG, TC, HDL cholesterol, LDL cholesterol은 대조군이 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으며 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고, HDL/LDL ratio는 유의성 있는 차이는 없었다.
4. 혈청 내 adiponectin 함량 분석결과, 대조군은 정상

군에 비해 감소하였으나 유의성 있는 차이는 없었고, 실험군은 대조군보다 유의성 있게 증가하였다.

5. 조직학적 분석으로 단위면적당 지방세포 수를 비교한 결과, 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 감소하였고, 실험군은 대조군보다 유의성 있게 증가하였다.

이상의 결과로 정향약침의 복부주입은 국소 지방조직의 크기 감소에 효과를 보여주며, 전신적으로는 혈중 비만 지표의 호전을 가져온다고 판단된다.

VI. References

1. Jung YS, Yoon KH, Choi SB, Yoon MC, Shin SS. Clinical efficacy of gyeongshingangjeehwan16 according to obesity related to measurement variables. *Kor J Oriental Medical Prescription*. 2008 ; 16(1) : 169-83.
2. Kim KW, Chung WS, Chung SH. A clinical case study on the changes of body composition and blood chemistry after modified fasting therapy in a patient with obesity. *Journal of Society of Korean Medicine for Obesity Research*. 2010 ; 10(1) : 49-56.
3. Kim HK, Kim MK. Effects of weight control program on dietary habits and blood composition in obese middle-aged women. *Kor J Nutr*. 2010 ; 43(3) : 273-84.
4. Kwak NS, Kim Eojina, Kim HR. Current status and improvements of obesity related legislation. *Kor J Nutr*. 2010 ; 43(4) : 413-23.
5. Kim MW, Song YK, Lim HH. Study of experimentations and clinical trials' trends for obesity treatment using pharmacupuncture. *Kor J Medicine for Obesity Research*. 2011 ; 11(1) : 47-60.
6. Herbology textbook publish commission. *Herbology*. Seoul : Yunglimsa. 2010 : 383-4.
7. Chami F, Chami N, Bennis S, Bouchikhi T, Remmal A. Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytother Res*. 2005 ; 19(5) : 405-8.
8. Zheng GQ, Kenney PM, Lam LKT. Sesqui-

- terpenes from clove(*Eugenia caryophyllata*). *J Nat Prod*. 1992 ; 55(7) : 999–1003.
9. Kim HM, Lee EH, Hong SH et al. Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. *J Ethnopharmacol*. 1998 ; 60(2) : 125–31.
10. Miyazawa M, Hisama M. Suppression of chemical mutagen induced SOS response by alkylphenols from clove(*Syzygium aromaticum*) in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 umu test. *J Agric Food Chem*. 2001 ; 49(8) : 4019–25.
11. Ogata M, Hoshi M, Urano S, Endo T. Anti-oxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem Pharm Bull*. 2000 ; 48(10) : 1467–9.
12. Park IK, Lee HS, Lee SG, Park JD, Ahn YJ. Insecticidal and fumigant activities of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials against *Mechoris ursulus* (Coleoptera: Attelabidae). *J Agric Food Chem*. 2000 ; 48(6) : 2528–31.
13. Kamel Chaieb, Hafedh Hajlaoui, Tarek Zmantar et al. The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. *Phytother Res*. 2007 ; 21(6) : 501–6.
14. Kim SK, Kim YM, Homg MJ, Rhee HI. Study on the inhibitory effect of *Eugenia aromaticum* extract on pancreatic lipase. *Agric Chem Biotechnol*. 2005 ; 48(2) : 84–8.
15. Kim DH, Yang BS. Molecular mechanisms underlying the link of obesity to chronic diseases. *Kor J Oriental Association for Study of Obesity*. 2006 ; 15(3) : 121–8.
16. Kissebah AH, Uydellingum N, Mrray F, Evans DJ & Hartz AJ. Realation of body-fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Met*. 1982 ; 54(2) : 254–60.
17. Shin SW, Kim KS. Changes in of abdominal subcutaneous and visceral fatfollowingafter abdominal obesity treatment. *Kor J Oriental Association for study of obesity*. 2006 ; 6(2) : 95–104.
18. Lee YS, Kim JH, Kim HJ et al. Anti-lipase and lipolytic activities of EtOH extract from juniperus rigida. *Kor J Pharmacogn*. 2010 ; 41(3) : 216–20.
19. Cha SY, Jang JY, Lee YH et al. Lipolytic Effect of methanol extracts from luffa cylindrica in mature 3T3-L1 adipocytes. *Kor J Soc Food Sci Nutr*. 2010 ; 39(6) : 813–9.
20. Bae BC. Gm-Taek Huangdi's Canon of Medicine Plain Questions. Seoul : Seongbosa. 1994 : 291.
21. Shin HD. Basic concepts and treatment methods of obesity in oriental medicine. *Kyung Hee Oriental Medicine*. 1995 ; 1(1) : 257–67.
22. Cho SH, Lee JS, Thabane L, Lee J. Acupuncture for obesity: a systematic review and meta-analysis. *International of Obesity*. 2009 ; 33(2) : 183–96.
23. Hwang DS, Ahn SJ, Lee KS. Effect of electroacupuncture on regional fat by measuring thigh circumference. *Kor J Oriental Association for Study of Obesity*. 2005 ; 5(1) : 1–8.
24. Shin SU, Kim KS. Changes in of abdominal subcutaneous and visceral fatfollowingafter abdominal obesity treatment. *Kor J Oriental Association for Study of Obesity*. 2006 ; 6(2) : 95–104.
25. Youh EJ, Seo BK, Huang Bo, Kim JI, Kang SK. Artemisia capillaries herbal acupuncture improves metabolic abnormalities in high fat diet-induced obese ICR mice. *Kor J Acupuncture & Moxibustion Society*. 2012 ; 28(1) : 2–14.
26. Kwon Kang, Park HS. The effects of lumbricus pharmacopuncture on the lipid lowering, anti-oxidative activity and concentration of proinflammatory cytokines in rat fed high fat diet. *Kor J Acupuncture & Moxibustion Society*. 2010 ; 27(2) : 59–69.
27. Youh EJ, Seo BK, Nam SS, Knag SK. Anti-obesity effect of rhizoma atractylodis herbal acupuncture in high fat diet-induced obese ICR mouse. *Kor J Acupuncture & Moxibustion Society*. 2010 ; 27(6) : 31–42.
28. Jang HJ, Lee HS, Lee JM. Effect of *Hagocho*

- (*Prunella vulgaris* L.), *Gamgook*(*Chrysanthemum indicum* L.) and *Galaeun*(*pueraria Radix*) aqua-acupuncture at *Gokji*(LI-11) and *Joksamri* (ST-36) on lowering lipid effect, oxodative capacity, concentration of TNF- α , IL-6, Leptin and histological consideration in hyperlipidemic rat. *Kor J of Meridian & Acupoint*. 2007 ; 24(4) : 201-19.
29. Lim CS, Park WP, Jang SB et al. Clinical Studies of Sweet Bee Venom to The Effect of Abdominal Fat Accumulation. *Journal of Pharm-acupuncture*. 2008 ; 11(2) : 33-40.
 30. Cha YY, Kim YS, Shin YW, Kwon KR, Lee SG. A clinical study for the influence of herbai acupuncture therapy(Sangsik no.1) on Obesity. *Jor of Pharmacopuncture*. 2001 ; 4(2) : 57-63.
 31. Chami F, Chami N, Bennis S, Bouchikhi T, Remmal A. Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytother Res*. 2005 ; 19(5) : 405-8.
 32. Lee HS. Antibacterial activity and antioxidant activity of syzygium aromaticum(Clove) extracts [dissertation]. Naju : Dongshin University. 2005. Korean.
 33. Dong Suk. Physiological activities of clove by the different extraction solvents[dissertation]. Anseong : Hankyong University. 2004. Korean.
 34. Lee YK. Identification and antimicrobial activity of cinnamon and clove extracts on food spoilage microorganisms[dissertation]. Seoul : Sookmyung University. 1995. Korean.
 35. Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Choi SW. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove(*eugenia caryophyllata* thunb.). *Kor J Soc Food Sci Nutr*. 2011 ; 40(10) : 1361-70.
 36. Kwon GS. Antifungal Activity of *Eugenia caryophyllata* extracts and identification of antifungal compounds[dissertation]. Seoul : Seoul National University of Technology. 2006. Korean.
 37. Dong Suk, Jung SH, Moon JS, Rhee SK, Son JY. Antioxidant Activities of Clove by Extraction Solvent. *Kora J Soc Food Sci Nutr*. 2004 ; 33(4) : 609-13.
 38. Lee OH, Jing SH, Son JY. Antimicrobial Activity of Clove Extract by Extraction Solvents. *Kora J Soc Food Sci Nutr*. 2004 ; 33(3) : 494-9.
 39. Yang YY, Lee MJ, Lee HS, Park WH. Screening of antioxidative, anti-platelet aggregation and anti-thrombotic effects of clove extracts. *Kor J Oriental Physiology and Pathology*. 2011 ; 25(3) : 471-81.
 40. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese mans. *N Engl J Med*. 1996 ; 334(5) : 292-5.