

## 실비산의 항산화 및 지방축적 억제 효과

김건우\* · 우창훈† · 김영준† · 안희덕†

대구한의대학교 대학원 한의학과 한방재활의학과\*, 대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실†

### Anti-oxidation and Fat Accumulation Inhibitory Effects of *Silbi-san*

Geon-Woo Kim, K.M.D.\*, Chang-Hoon Woo, K.M.D., Ph.D.†, Young-Jun Kim, K.M.D., Ph.D.†, Hee-Duk An, K.M.D., Ph.D.†

Department of Korean Rehabilitation Medicine, Graduate School Daegu Haany University\*, Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Hanny University†

RECEIVED September 23, 2020

REVISED October 21, 2020

ACCEPTED October 22, 2020

#### CORRESPONDING TO

Hee-Duk An, Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Hanny University, 136 Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu 42158, Korea

TEL (053) 770-2116,

FAX (053) 770-0566,

E-mail okee@dhu.ac.kr

Copyright © 2020 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

**Objectives** The purpose of this study was to investigate the effects of *Silbi-san* on the antioxidant and fat accumulation inhibition and to analyze the anti-obesity effect by analyzing the changes in serum lipid composition in obese mice.

**Methods** We compared contents of phytochemicals like total polyphenols and total flavonoid and antioxidant activities such as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging activity. After *Silbi-san* in 3T3-L1 cells *in vitro* and mouse adipose tissue *ex vivo*, we quantified intracellular triglyceride accumulation and lipolysis. Moreover, the anti-obesity activity though inhibiting pancreatic lipase were analyzed. In 3T3-L1 cells, morphological changes showed that control cells had many lipid while cells treated with *Silbi-san* had less lipid accumulation. 30% EtOH *Silbi-san* treatment also suppressed the fat absorption by inhibiting the activity of pancreatic lipase and led to high lipolysis through promoting glycerol release. The experimental group was divided into four groups: Normal group fed normal feed, Control group fed 60% high fat diet (HFD) and distilled water, drug group fed 60% high fat diet and 200 mg/kg of *Silbi-san* water extract, drug group fed 60% HFD and 200 mg/kg of *Silbi-san* 30% ethanol extract.

**Results** Serum total cholesterol content and serum low density lipoprotein-cholesterol content were significantly decreased in the *Silbi-san* extract group compared to the control group, serum high density lipoprotein-cholesterol content was significantly increased in *Silbi-san* extract group.

**Conclusions** In this study, the antioxidant and fat accumulation inhibitory effects of *Silbi-san* were confirmed. (J Korean Med Rehabil 2020;30(4):41-53)

**Key words** *Silbi-san*, Antioxidants, Anti-obesity agents, Lipolysis, Pancrelipase

## 서론»»»»

비만은 체중의 과잉상태를 나타내는 것이 아니라 대사 장애로 체내에 과도하게 지방이 축적된 상태이다. 의학적으로 체지방량이 남성은 체중의 25% 이상일 때, 여성은 30% 이상일 때에 해당된다<sup>1)</sup>.

세계보건기구의 조사에 따르면 2016년 기준으로 19억 이상의 인구가 과체중이라고 보고하였다<sup>2)</sup>. 국내에서도 비만은 사회적 화두가 되고 있는데 2017년 보건복지부 국민건강영양조사에서 만 19세 이상 전체인구의 34.1%가 체질량지수 25 이상의 비만이라고 발표하였다<sup>3)</sup>.

한의학에서 비만에 대한 최초의 문헌은 『黃帝內經』

인데 비만을 肥, 肥胖, 肥人, 肉人, 肥貴人 등으로 나타내고 기름진 음식을 많이 먹는 것이 비만의 주요 원인으로 언급하였다<sup>4)</sup>. 또한 外感濕邪와 內傷七情으로 인한 氣滯, 痰濁, 水濕, 瘀血 등이 비만을 발생시킨다고 하였다<sup>5)</sup>. 한의학에서 비만 치료법에 대한 연구로는 防風通聖散, 防己黃耆湯, 太陰調胃湯 등 한약이 가장 많이 사용되었으나 實脾散을 연구한 예는 별로 없는 실정이다.

실비산은 『東醫寶鑑』<sup>6)</sup>에서 ‘治陰水發腫, 先實脾土’라고 하여 부종을 치료하려면 비장을 다스리는 것이 중요하다고 언급되었다. 저자는 실비산의 이와 같은 효능이 비만 치료에 효과가 있을 것으로 생각하여 이 연구를 시작하게 되었다. 저자는 실비산의 항산화와 지방축적 억제에 미치는 영향과 비만을 유도한 생쥐의 지질 축적에 대한 연구를 하였으며 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법»»»

### 1. 재료

#### 1) 시약

본 실험에 사용된 gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate, naringin, diethylene glycol, sodium hydroxide, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, insulin, dexamethasone (Dex), dimethyl sulfoxide (DMSO), Oil red O 시약, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), potassium persulfate, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), p-nitrophenyl butyrate (p-NPB) 이상 약품들은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, bovine calf serum (BCS), fetal bovine serum (FBS) 및 high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), penicillin/streptomycin (P/S), trypsin 이상 시약은 Hyclone사(Logan, UT, USA)에서 제품을 구입하였다. Isopropyl alcohol은 Junsei Chemical 사(Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, formaldehyde solution은 Duksan Pure Chemicals (안산, 한국)에서 구입

하였다.

#### 2) 동물

5 주령의 수컷 C57BL/6 mouse (오리엔트바이오, 성남, 한국)를 공급받아 물과 항생제를 첨가하지 않은 고형사료(삼양사, 서울, 한국)를 충분히 공급하고, 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 관례적인 체계로 온도는 22±2°C, 습도는 50±5%, 12 시간 명암주기(light:dark cycle)로 조절된 동물 사육실에서 사육하였고 사육실의 관리와 동물실험에 대해 윤리적, 과학적으로 타당성을 검토하고 효율적인 관리를 위하여 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인(승인번호: DHU2019-098)을 받았다.

#### 3) 시료의 제조

본 실험에 사용한 실비산의 구성 한약재는 『東醫寶鑑』<sup>6)</sup>에 의거하여 옹기한약국(대구, 한국)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 약전규격에 합격한 것만을 사용하였다(Table I). 실비산 159.5 g을 10배수 정제수에 넣고 100°C에서 2시간 가열하여 추출하였고, 실비산 30%에탄올 추출물은 24시간 냉침하여 추출하였다. 추출물을 여과 후 감압농축기로 농축한 후 동결 건조하여 파우더를 얻었으며, 실비산 물 추출물(water extract of

**Table I.** Composition and Amount of *Silbi-san*

Herb name	Pharmacognostic name	Amount (g)
Hubak	<i>Magnoliae Cortex</i>	3.75
Baekchul	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	3.75
Mokkwa	<i>Chaenomelis Fructus</i>	3.75
Chokwa	<i>Amomi Tsao-Ko Fructus</i>	3.75
Daebokja	<i>Arecae Semen</i>	3.75
Buja	<i>Aconiti Lateralis Preparata Radix</i>	3.75
Baekbokryeong	<i>Hoelen</i>	3.75
Mokhyang	<i>Aucklandiae Radix</i>	1.875
Geongang	<i>Zingiberis Rhizoma Siccus</i>	1.875
Jagamcho	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	1.875
Sanggang	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	4
Daejo	<i>Jujubae Fructus</i>	4
Total amount (g)		39.875

*Silbi-san*, SSW)은 22.78 g 수율 14.33%이었고, 실비산 30%에탄올 추출물(30% EtOH extract of *Silbi-san*, SSE)은 19.08 g 수율 12%이었다. 실비산 파우더는 -80°C에서 보관한 후 실험 직전에 사용하였다.

#### 4) 실험기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기(DWT-1800T; 대웅바이오, 화성, 한국), rotary vacuum evaporator (Buchi B-480; Flawil, Switzerland), deep-freezer (Sanyo Co., Osaka, Japan), 동결건조기(FD5508; 일신, 동두천, 한국), 냉장 고속원심분리기(Mega17R, 한일과학, 김포, 한국), vortex mixer 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) DPPH 라디칼 소거능 측정

실비산의 free radical 소거능 측정을 위해 DPPH free radical 소거법을 이용하였다<sup>7)</sup>. 0.2 mM DPPH 용액 100  $\mu$ L와 實脾散을 농도별로 희석시킨 용액 100  $\mu$ L를 섞어서 37°C에서 30분간 암소상태로 유지한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였다. 흡광도는 아래의 식에 따라 계산하여 산출하였다.

DPPH radical scavenging activity (%) =

$$\{(OD_{control} - OD_{sample})/OD_{control}\} \times 100$$

OD<sub>control</sub>: 실비산이 들어가지 않은 경우 흡광도

OD<sub>sample</sub>: 실비산이 들어간 경우 흡광도

### 2) ABTS 라디칼 소거능 측정

실비산의 항산화 효능을 알아보기 위해 ABTS free radical 소거능을 측정하였다<sup>8)</sup>. 7 mM ABTS 용액과 2.4 mM의 potassium persulfate를 섞어서 실온의 암소 상태에서 약 16시간 이상 유지하여 ABTS<sup>+</sup>을 형성시킨 후 415 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되게 에탄올로 희석하였다. 희석된 용액 95  $\mu$ L에 실비산 5  $\mu$ L를 가하여 15분 동안 유지한 후 흡광도를 측정하였으며, L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였다. 흡광도는 아래의 식에 따라 계산하여 산출하였다.

ABTS radical scavenging activity (%) =

$$\{(OD_{control} - OD_{sample})/OD_{control}\} \times 100$$

OD<sub>control</sub>: 실비산이 들어가지 않은 경우 흡광도

OD<sub>sample</sub>: 실비산이 들어간 경우 흡광도

### 3) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법<sup>9)</sup>을 이용하여 측정하였다. 각 실비산 10  $\mu$ L (100  $\mu$ L/mL)과 distilled water 790  $\mu$ L 및 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50  $\mu$ L를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨다. 그 후 20% sodium carbonate 150  $\mu$ L를 더하여 2시간 반응시킨 후 UV 분광광도계(spectrophotometer)(Infinite M200; Tecan, Salzburg, Austria)로 765 nm에서 흡광도를 측정하여 실비산의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드 함량은 Lister 등<sup>10)</sup>의 방법을 이용하여 측정하였다. 추출한 실비산 100  $\mu$ L (11.1 mg/mL)에 diethylene glycol 1  $\mu$ L 및 1 N NaOH 10  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 차광하여 유지한 후 UV 분광광도계로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 naringin을 사용하여 표준 검량선을 얻었으며 실비산의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

### 4) 3T3-L1 세포 배양 및 분화

지방세포 3T3-L1 세포주는 American type culture collection (ATCC; Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기(HERA Cell 150; Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA)에서 10% BCS, 1% P/S를 포함한 DMEM 배지를 처리하여 8일간 배양하였으며 배양시킨 후 배양액을 분화유도 배양액(10% FBS, 1 mg/mL insulin, 0.1 mg/mL Dex, 11.1 mg/mL IBMX)으로 바꾸고 2일간 배양하였다. 2일 후 분화유도 배양액(10% FBS, 1 mg/mL insulin)으로 교환하고 2일간 배양시킨 뒤 insulin을 첨가하지 않은 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 배양하였다.

### 5) 실비산의 세포 독성 확인

3T3-L1 세포를 96 well plate에 2×10<sup>6</sup> cells/mL 세포를 분주하여 안정화시킨 후 실비산 추출물을 각 농도 (100, 250, 500, 1000, 2000  $\mu$ g/mL)별로 처리하여 MTT

분석법을 이용하였다. 실비산 추출물을 처리하여 24시간 배양하였으며 배지를 제거하고 MTT시약을 처리하고 4시간 반응시킨 뒤 DMSO 200  $\mu$ L를 가하였다. 흡광도는 UV 분광광도계로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 6) Oil red O 염색

3T3-L1 세포에서 실비산 추출물이 지방축적에 대한 영향을 확인하기 위하여 Oil red O 염색법을 수행하였다. 세포 분화 중에 실비산 추출물을 각각의 농도(100  $\mu$ g/mL)별로 2일 주기로 한 번씩 배지를 교환하며 처리하였다. 8일 후 세포 배양액을 제거하고 DPBS로 3회 세척 후 5% 포르말린으로 2시간 고정시키고 증류수로 세척하여 지방구를 Oil red O 염색시약으로 염색하였다. 염색된 세포를 현미경으로 관찰하였으며 염색된 지방세포의 지방 함량을 측정하기 위해 건조 후 100% isopropyl alcohol로 지방을 추출하여 510 nm 파장에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다.

#### 7) Pancreatic lipase 활성 억제 실험

Pancreatic lipase 활성 억제는 Kim 등<sup>11)</sup>의 방법을 응용하여 측정하였다. Enzyme buffer (10 mM 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 6.8)에 porcine pancreatic lipase를 2.5 mg/mL 농도로 녹였다. Tris buffer (100 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.0)를 준비하여 lipase가 섞여 있는 enzyme buffer 6  $\mu$ L와 tris buffer 169  $\mu$ L를 혼합하였다. 시료를 다양한 농도별(50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 250  $\mu$ g/mL, 500  $\mu$ g/mL, 1 mg/mL)로 준비한 후 buffer 혼합물 175  $\mu$ L에 시료(증류수와 실비산) 20  $\mu$ L를 혼합하고, 37°C에서 15분간 배양하였다. Substrate solution (10 mM p-nitrophenyl butyrate in N,N-dimethylformamide [DMF])를 5  $\mu$ L 첨가한 후 다시 37°C에서 30분간 배양하고, ELISA 405 nm에서 측정하여 IC<sub>50</sub>값을 산출하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \{(B-b)/(A-a) * 100\}$$

A and B: 기질로 작용하는 p-NPB (in DMF) 5  $\mu$ L를 넣은 well

a and b: p-NPB를 넣지 않은 DMF 5  $\mu$ L를 넣은 well

A and a: 시료로 증류수 20  $\mu$ L를 넣은 well

B and b: 시료로 실비산 20  $\mu$ L를 넣은 well

#### 8) Ex vivo lipolysis assay

웅성 mouse (25~30 g)로부터 epididymal fat pad를 떼어낸 후 Hank's balanced salt solution buffer (HBSS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 넣는다. 떼어낸 fat pad는 세절 (20 mg/piece)하고, 시험관당 150 mg씩 1% free fatty acid free bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co.)이 포함된 1 mL HBSS에 준비한다. 다양한 농도로 희석한 시험 약물 및 양성 대조약물인 isoproterenol (7.5 mM, 1.86  $\mu$ g/mL)을 시험관에 첨가한 후 1시간동안 37°C에서 배양한다. 1시간 후 상층액을 채취하여 fat이 분해되어 유출된 glycerol의 양을 glycerol assay kit (Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 측정한다.

#### 9) 약물투여와 실험군 분리

실험군은 일반사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제 무첨가, 삼양사)를 급여한 정상군(normal), 60% high fat diet (HFD; Diet 12492; Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA)를 급여하고 증류수를 투여한 대조군(control), 60% HFD를 급여하고 SSW를 200 mg/kg 투여한 약물군 *Silbi-san* water extract administration group (SSWG), 60% HFD를 급여하고 SSE를 200 mg/kg 투여한 약물군 *Silbi-san* 30% ethanol extract administration group (SSEG)으로 총 4군으로 각 군당 난괴법으로 10마리씩 배속시켰다. 고지방식이군에게 매일 약물을 증류수에 녹여 일정한 시각에 7일간 존데(zonde)를 이용하여 경구투여하였다(Table II).

#### 10) 혈청 지질 분석

7일 동안 약물투여 후 마우스의 심장에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 마우스 혈청의 triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL)-cholesterol은 TG, TC, HDL-cholesterol assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)의 프로토콜에 따라 측정하였다. 그 외 low density lipoprotein (LDL)-cholesterol은 아래와 같은 Friedewald 공식을 이용하여 산출하였다<sup>12)</sup>.

$$\text{LDL-cholesterol} = \text{TC} - \text{HDL-cholesterol} - (\text{TG}/5)$$

**Table II.** The Ingredients of 60% High Fat Diet

Product #	D12492	
	gm%	kcal%
Protein	26.2	20
Carbohydrate	26.3	20
Fat	34.9	60
Total		100
kcal/gm	5.24	
Ingredients	gm	kcal
Casein, 80 Mesh	200	800
L-cystine	3	12
Corn starch	0	0
Maltodextrin 10	125	500
sucrose	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0
Soyabean oil	25	225
Lard	245	2,205
Mineral mix S10026	10	0
DiCalcium phosphate	13	0
Calcium carbonate	5.5	0
Potassium citrate	16.5	0
Vitamin mix V10001	10	40
Choline bitartrate	2	0
FD&CBlueDye#1	0.05	0
Total	773.85	4057

11) 혈청 지질과산화 측정

체내에 불포화지방산과 활성산소종이 결합하면서 일어나는 지질 과산화는 산화적 스트레스의 지표로 쓰이는데 이 과정에서 생성되는 malondialdehyde (MDA)를 측정함으로써 지질 과산화를 간접적으로 평가할 수 있다. 혈청 지질과산화(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)는 Mihara와 Uchiyama의 방법을 사용하여 측정하였다<sup>13)</sup>. 흡광도는 UV 분광광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

12) 통계처리

모든 수치는 mean±standard error of the mean으로 표시하였으며, SPSS program for windows version 22 (IBM Co., Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance로 검정한 후 각 자료의 통계적 유의성은

Dunnett's multiple comparison test로 검증하였고, 대조군과 투여군 사이에 p-value<0.05일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과»»»»

1. DPPH 라디칼 소거능

실험에 사용된 실비산의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, 농도 의존적으로 DPPH 소거능이 증가하였다. DPPH 소거능을 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었을 때 SSW 252.52±0.84 µg/mL, SSE 122.13±0.54 µg/mL로 나타났다(Fig. 1).

2. ABTS 라디칼 소거 활성 효과

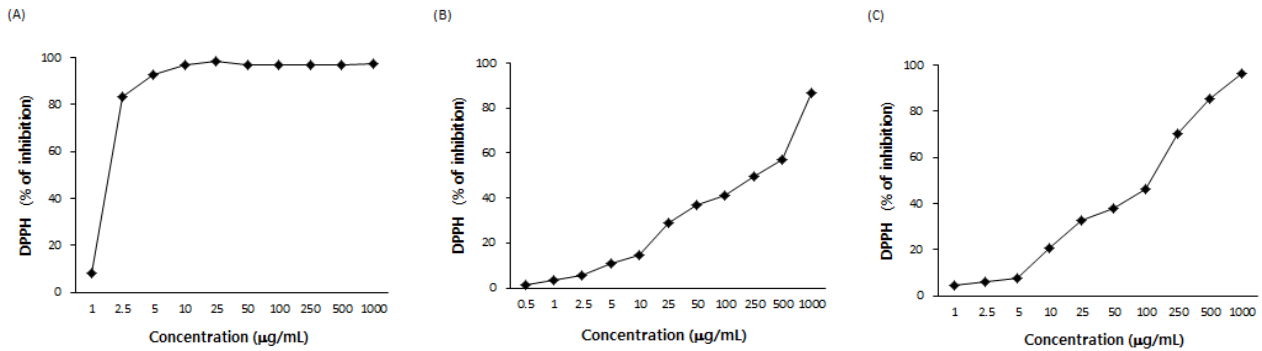
실험에 사용된 실비산의 항산화 활성을 확인하기 위해 ABTS 소거능을 측정한 결과, 농도 의존적으로 ABTS 소거능이 증가하였다. ABTS 소거능을 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었을 때 SSW 287.68±0.36 µg/mL, SSE 160.12±1.64 µg/mL로 나타났다(Fig. 2).

3. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정 결과

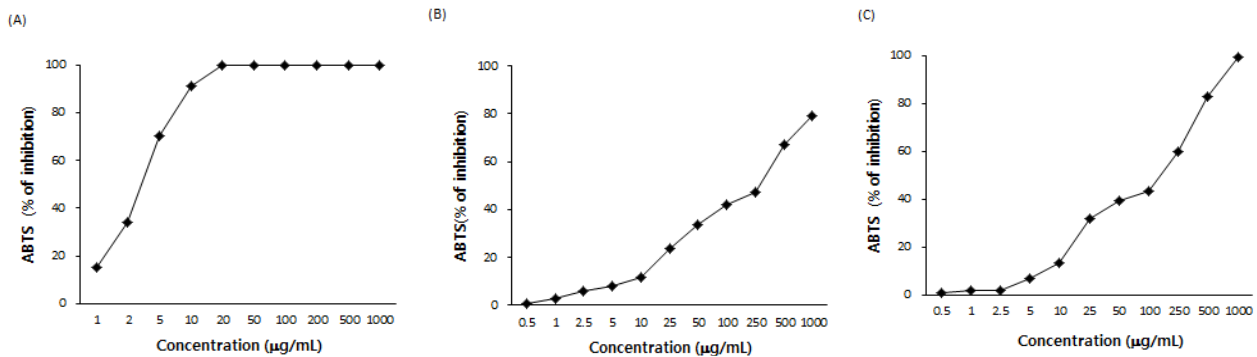
실비산의 총 폴리페놀 및 플라보노이드를 측정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 SSW 22.69±0.16 mg/g, SSE 24.22±0.08 mg/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 SSW 4.68±0.17 mg/g, SSE 5.16±0.08 mg/g으로 나타났다 (Table III).

4. 3T3-L1 세포의 지방축적에 미치는 영향

3T3-L1 세포에 SSW와 SSE 100 µg/mL 농도로 처리한 다음 Oil red O로 염색하고 광학현미경을 통해 관찰하였다. 그 결과, SSW와 SSE를 처리한 군에서는 대조군에 비해서 지방축적의 정도가 감소한 것으로 관찰되었다(Fig. 3).



**Fig. 1.** Scavenging activity of *Silbi-san* on DPPH free radical. (A) DPPH free radical scavenging activity of L-ascorbic acid, (B) DPPH free radical scavenging activity of SSW, (C) DPPH free radical scavenging activity of SSE. DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*.



**Fig. 2.** Scavenging activity of *Silbi-san* on ABTS free radical. (A) ABTS free radical scavenging activity of L-ascorbic acid, (B) ABTS free radical scavenging activity of SSW, (C) ABTS free radical scavenging activity of SSE. ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*.

**Table III.** Total Polyphenol and Total Flavonoid Contents of SSW and SSE

Name	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
SSW	22.69±0.16	4.68±0.17
SSE	24.22±0.08	5.16±0.08

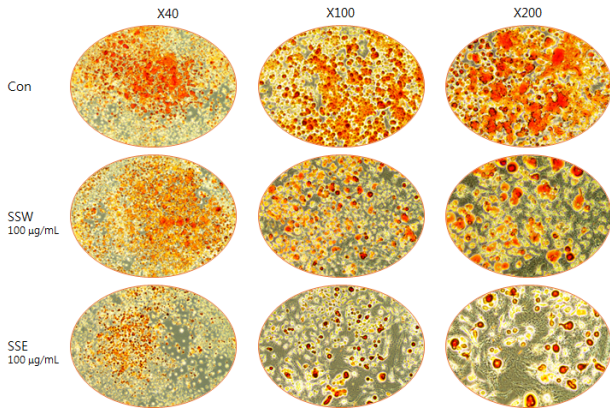
All values are mean±standard error of the mean of triplicate experiments.  
 SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*.

### 5. 세포 생존율에 미치는 영향

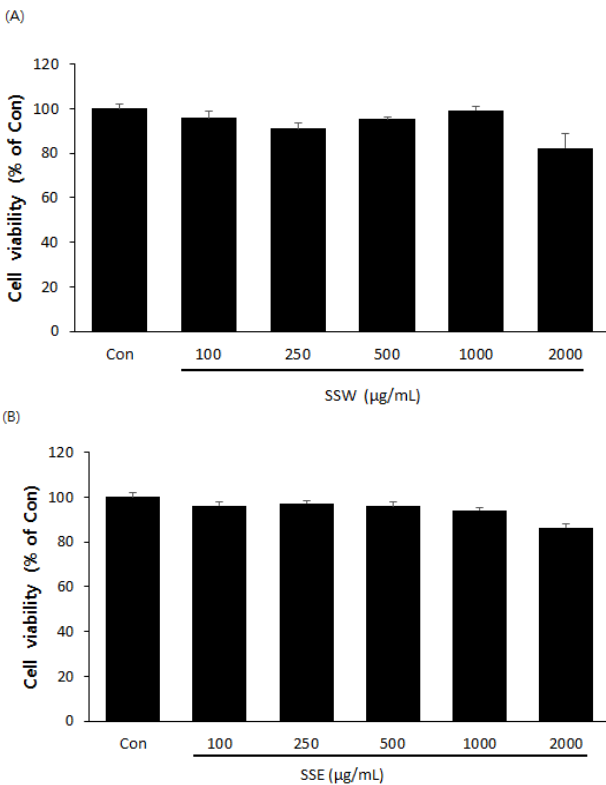
3T3-L1세포에 100-2,000 µg/mL 농도의 SSW와 SSE를 각각 처리하고 MTT 염색법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 대조군과 비교하였을 시 전 실험농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다. 하지만 2,000 µg/mL 농도에서 82.36±6의 생존율을 보였으며 차후 실험에서는 100-250 µg/mL 농도로 실험을 진행하였다(Fig. 4).

### 6. *In vitro* pancreatic lipase 활성 저해 효과

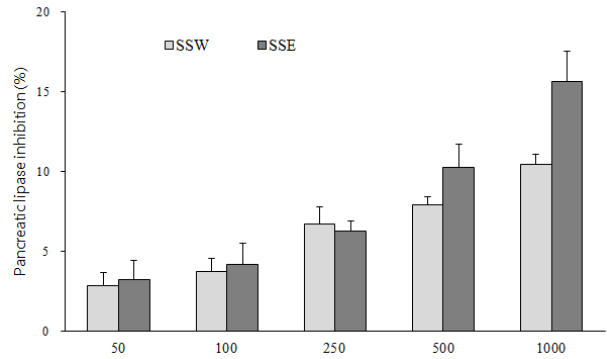
Pancreatic lipase 활성 저해 효과를 검증하기 위해 SSW과 SSE의 처리 후 비교 분석한 결과 SSW과 SSE의 농도에 따른 pancreatic lipase 활성 억제는 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 5).



**Fig. 3.** Inhibitory effects of SSW and SSE on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Intracellular lipids were stained with Oil red O. Oil red O dye was dissolved in isopropyl alcohol and detected at 510 nm. Con: control, SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*.



**Fig. 4.** The effects of SSW and SSE on cell viability in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with 100-2,000 mg/mL of SSW and SSE for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay. Values are shown by mean±standard error of the mean of triplicate experiments. There were no significant differences between control groups and SSW and SSE treated groups. (A) Cell viability of SSW, (B) Cell viability of SSE. Con: control, SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*, MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.



**Fig. 5.** Comparative analysis of SSW and SSE on pancreatic lipase inhibitory activity. Values were expressed as mean±standard error of the mean of triplicate experiments. The significance between SSW and SSE didn't show. SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*.

### 7. Ex vivo lipolysis 글리세롤 배출량

SSW과 SSE의 지방분해효과를 fat pad를 이용하여 ex vivo lipolysis 실험을 통해 확인한 결과 지방분해가 1 µg/mL의 농도에서 유의하게 촉진되었다(Fig. 6A).

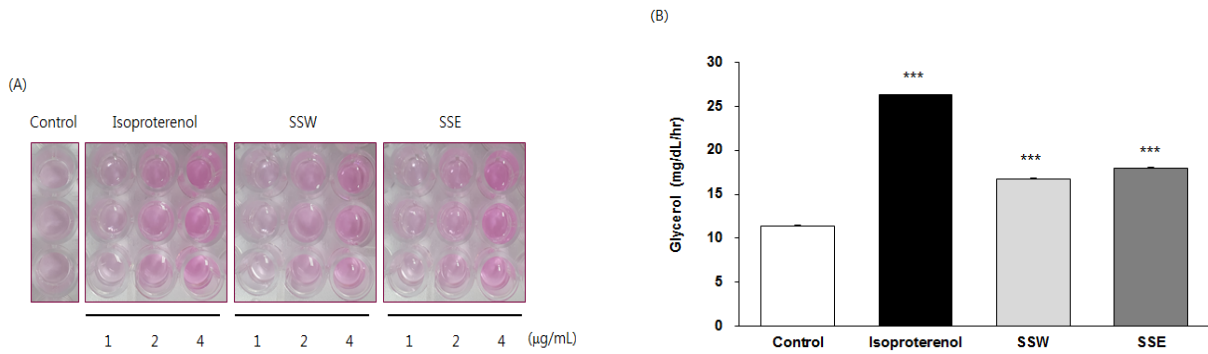
1 µg/mL의 농도에서의 글리세롤 배출량(mg/dL/hr)은 Control 11.39±0.16에 비해 Isoproterenol 26.32±0.02, SSW 16.81±0.11, SSE 18.01±0.08로 유의하게 감소되었다(Fig. 6B).

### 8. 혈청 중성지방 함량

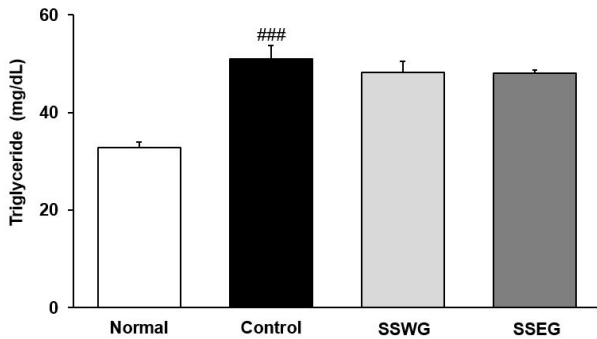
혈청 내 triglyceride 함량을 측정된 결과, 정상군 32.84±1.17 mg/dL에 비하여 대조군 50.94±2.80 mg/dL (p<0.001)은 유의성 있게 증가하였고, SSWG 48.27±2.28 mg/dL, SSEG 48.01±0.68 mg/dL은 대조군에 비해 감소했으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

### 9. 혈청 총콜레스테롤 함량

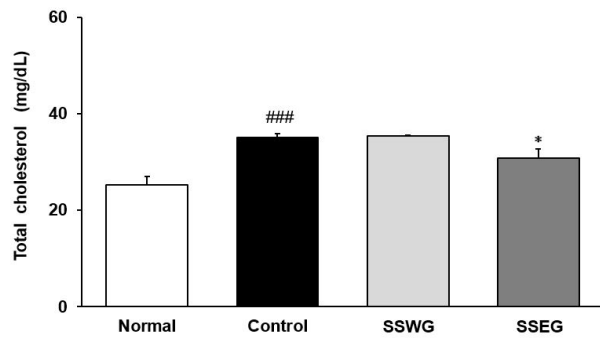
혈청 내 total cholesterol 함량을 측정된 결과, 정상군 25.23±1.72 mg/dL에 비하여 대조군 35.01±0.83 mg/dL (p<0.001)은 유의성 있게 증가하였고, SSWG 35.33±0.24 mg/dL, SSEG 30.77±1.87 mg/dL (p<0.05)로 대조군 대비 SSEG에서 유의하게 감소하였다(Fig. 8).



**Fig. 6.** The Effects of SSW and SSE on lipolysis in the mouse fat cells. Glycerol release was measured in mouse fat cells after treatment with isoproterenol, SSW and SSE by a various concentration (1, 2, 4 mg/mL). Values were expressed as mean±standard error of the mean of triplicate experiments. Isoproterenol (a beta adrenergic agonist) was used as positive control. (A) the color change associated with isoproterenol, SSW and SSE concentration, (B) Lipolytic activity of SSW and SSE. \*\*\*p<0.001 vs control groups. SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*.



**Fig. 7.** Serum triglyceride levels measurements. All data are expressed means±standard error of the mean, n=10 mice per group. Significance: ###p<0.001 compared with normal group. Normal: general feed treated mice, control: 60% HFD and distilled water treated mice, SSWG: 60% HFD and *Silbi-san* water extract 200 mg/kg treated mice, SSEG: 60% HFD and *Silbi-san* 30% EtOH extract 200 mg/kg treated mice. SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*, HFD: high fat diet.



**Fig. 8.** Serum total cholesterol levels measurements. All data are expressed means±standard error of the mean, n=10 mice per group. Significance: ###p<0.001 compared with normal group and \*p<0.05 compared with control group. Normal: general feed treated mice, control: 60% HFD and distilled water treated mice, SSWG: 60% HFD and *Silbi-san* water extract 200 mg/kg treated mice, SSEG: 60% HFD and *Silbi-san* 30% EtOH extract 200 mg/kg treated mice. SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*, HFD: high fat diet.

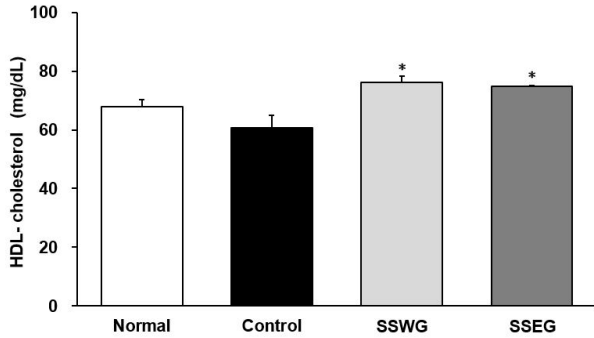
### 10. 혈청 HDL-cholesterol 함량

혈청 내 HDL-cholesterol 함량 변화를 측정된 결과, 정상군 67.89±2.39 mg/dL, 대조군 60.64±4.27 mg/dL, SSWG 76.13±2.25 mg/dL (p<0.05), SSEG 74.72±0.39 mg/dL (p<0.05) 으로 나타나 대조군에 비해 SSWG과 SSEG에서 유의하게 증가했다(Fig. 9).

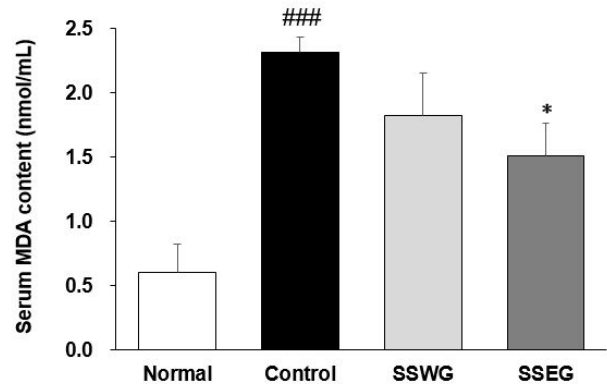
### 11. 혈청 LDL-cholesterol 함량

혈청 내 LDL-cholesterol 함량 변화를 측정된 결과, 정상군 10.53±1.24 mg/dL에 비하여 대조군 16.09±0.98 mg/dL (p<0.05)은 유의하게 증가하였으며, SSWG 15.23±0.63 mg/dL, SSEG 12.05±1.25 mg/dL (p<0.05)으로 대조군 대비 SSEG에서 유의하게 감소하였다(Fig. 10).

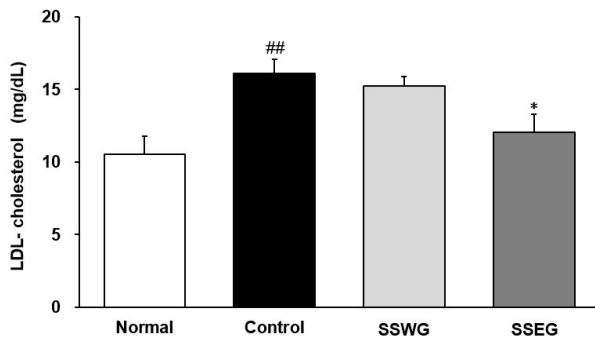




**Fig. 9.** Serum HDL-cholesterol levels measurements. All data are expressed means±standard error of the mean, n=10 mice per group. Significance: \*p<0.05 compared with control group. Normal: general feed treated mice, control: 60% HFD and distilled water treated mice, SSWG: 60% HFD and *Silbi-san* water extract 200 mg/kg treated mice, SSEG: 60% HFD and *Silbi-san* 30% EtOH extract 200 mg/kg treated mice. SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*, HDL: high density lipoprotein, HFD: high fat diet.



**Fig. 11.** Serum MDA content measurements. All data are expressed means±standard error of the mean, n=10 mice per group. Significance: ###p<0.001 compared with normal group and \*p<0.05 compared with control group. Normal: general feed treated mice, control: 60% HFD and distilled water treated mice, SSWG: 60% HFD and *Silbi-san* water extract 200 mg/kg treated mice, SSEG: 60% HFD and *Silbi-san* 30% EtOH extract 200 mg/kg treated mice. SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*, MDA: malondialdehyde, HFD: high fat diet.



**Fig. 10.** Serum LDL-cholesterol levels measurements. All data are expressed means±standard error of the mean, n=10 mice per group. Significance: ##p<0.01 compared with normal group and \*p<0.05 compared with control group. Normal: general feed treated mice, control: 60% HFD and distilled water treated mice, SSWG: 60% HFD and *Silbi-san* water extract 200 mg/kg treated mice, SSEG: 60% HFD and *Silbi-san* 30% EtOH extract 200 mg/kg treated mice. SSW: water extract of *Silbi-san*, SSE: 30% EtOH extract of *Silbi-san*, LDL: low density lipoprotein, HFD: high fat diet.

## 12. 혈청 지질 과산화물 분석

혈청 지질 과산화물 MDA 분석은 2-TBARS 생성량 (nM/mL)을 측정하여 판단하였다. 정상군 0.60±0.22, 대조군 2.32±0.12, SSWG 1.82±0.34, SSEG 1.51±0.25로 나타났다. 실비산 투여는 혈액 지질 과산화물을 감소시켰고 특히 SSEG에서만 유의하게 감소되었다(Fig. 11).

## 고찰»»»»

비만이란 체내에 지방이 필요 이상으로 과도하게 축적된 상태를 말하는데 대한비만학회의 판정기준으로 체질량지수(kg/m<sup>2</sup>) 25 이상부터 1단계 비만으로 정의한다. 국민건강영양조사에 따르면 남자의 경우 2012년에는 36.3%, 2017년에 41.6%의 유병률을 보여 최근 증가 추세를 보였고, 여자는 2012년 28%, 2017년에 25.6%로 조사되어 일정한 유병률을 유지하고 있었다<sup>4)</sup>.

기존의 여러 연구 결과들은 비만이 단순히 비정상적인 외모를 일으키는 외관상의 문제뿐만 아니라 제2형 당뇨병, 심혈관계질환, 뇌졸중, 암과 같은 심각한 질병들을 사망의 위험까지 높이는 중요한 건강위험 요인이라는 사실을 보여주고 있다<sup>15)</sup>.

비만에 관한 연구는 다른 의학 분야와는 달리 운동, 영양, 심리사회적 요인 등 복합적인 요소들이 많아서 다양한 분야에서 연구가 이루어지는데 세계비만학회에서는 생리, 유전학, 행동적 측면 및 예방, 소아비만, 역학과 건강에 미치는 영향, 에너지 균형의 조절, 관리 및 치료 등의 주제로 연구하고 있다<sup>16)</sup>.

한의학에서는 비만의 치료에 한약이 많이 사용되고

있으며 그 중 사상체질방이 많이 응용되며 麻黃을 포함한 防風通聖散, 太陰調胃湯, 薏苡仁湯 淸肺瀉肝湯, 加味太陰調胃湯 등에 대한 연구가 있었다. 2000년 이후에는 사상처방 및 體減薏苡仁湯, 防風通聖散의 임상적 효과에 대한 보고가 활발히 이루어졌다<sup>17)</sup>.

실비산은 厚朴, 白朮, 木瓜, 草果, 大腹子, 附子, 白茯苓, 木香, 乾薑, 炙甘草, 生薑, 大棗로 구성된 처방으로 溫陽健脾, 化濕消腫, 行氣利水하는 효능이 있다. 또한 실비산은 腰以下의 水腫, 胸腹脹滿, 身腫, 身涼不渴, 手足冷, 小便清白, 大便稀薄, 氣色枯白, 言語低怯, 舌苔厚膩濕潤, 脈沈遲한 증상이 있는 ‘陰水’를 치료한다<sup>18)</sup>. 실비산의 구성약물 중에서 厚朴 추출물의 3T3-L1 세포에 대한 지방 생성억제 효능<sup>19)</sup>, 木瓜의 항비만 효능<sup>20)</sup>, 草果의 항비만 효과<sup>21)</sup>, 白茯苓이 비만유도 흰쥐의 체중과 지방조직에 미치는 영향<sup>22)</sup>, 木香의 항비만 활성화에 대한 보고<sup>23)</sup> 등 단일약제에 대한 연구는 있었으나 실비산 복합제에 대한 연구는 부족한 실정이어서 이에 연구를 하게 되었다.

먼저 실비산의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성 효과와 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. DPPH assay는 짧은 시간 내에 항산화 효과를 측정할 수 있는 방법으로 천연물로부터 항산화 물질을 탐색하는데 많이 이용되고 있다<sup>24)</sup>. DPPH 소거능을 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었을 때 SSW 252.52±0.84 µg/mL, SSE 122.13±0.54 µg/mL로 나타났다. 이는 SSE가 SSW보다 DPPH 라디칼 소거 활성이 더 우수하다는 것을 보여주었다(Fig. 1). ABTS assay는 DPPH assay와 같이 항산화 물질의 소거능을 측정하는 방법으로 실험방법이 간편하고 극성시료와 비극성 시료의 항산화능 측정을 모두 할 수 있어 DPPH assay에 비해 다양하게 사용된다<sup>25,26)</sup>. ABTS 소거능을 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었을 때 SSW 287.68±0.36 µg/mL, SSE 160.12±1.64 µg/mL로 나타났다. ABTS 소거능을 측정한 결과, 농도 의존적으로 ABTS 소거능이 증가하였다. 이는 SSE가 SSW보다 ABTS 소거능이 더 우수하다는 것을 보여주었다(Fig. 2). 강력한 항산화 비타민인 L-ascorbic acid는 항산화 효능을 비교하는 기준이 된다<sup>27)</sup>. 본 연구에서는 실비산과 비교하기 위해 L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였다, 또, 실비산을 추출하기 위한 용매로 물과 30% 에탄올을 선택하였는데 용매에 따른 효능 차이

가 있었으며 Jeon 등<sup>28)</sup>, Weon 등<sup>29)</sup>의 보고에서도 에탄올 추출물에서 효과가 더 좋은 것으로 나타났다.

폴리페놀 화합물은 flavonoid, isoflavone, catechin, tannin, anthocyanin 등으로 식물계에 광범위하게 분포되어 있고 폴리페놀 화합물에 있는 히드록실기(-OH)의 강력한 결합력으로 활성산소를 없애고 지질과산화에 의해 발생하는 체내 순환장애와 노화를 억제하는 항산화 기능을 갖고 있다<sup>30)</sup>. 플라보노이드는 효소적 또는 비효소적으로 지질과산화를 억제한다<sup>31,32)</sup>. DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성은 폴리페놀 화합물의 농도가 높을수록 증가하므로 폴리페놀 화합물의 총량을 측정하는 것은 항산화능을 평가하는 좋은 지표가 된다<sup>33)</sup>. 실비산의 총 폴리페놀 및 플라보노이드를 측정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 SSW 22.69±0.16 mg/g, SSE 24.22±0.08 mg/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 SSW 4.68±0.17 mg/g, SSE 5.16±0.08 mg/g으로 SSE가 SSW보다 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 더 높게 나타났다(Table III).

다음으로 실비산의 3T3-L1 지방세포에 미치는 영향, 세포 독성 유무, pancreatic lipase 활성 저해, lipolysis 글리세롤 배출량, 혈청 지질인자 및 지질 과산화물 등을 측정하였다.

분화된 3T3-L1 지방세포에 실비산을 처리한 Oil red O 염색에서 SSW와 SSE를 처리한 군에서는 대조군에 비해서 지방축적의 정도가 감소한 것으로 관찰되었으며 SSE가 SSW보다 지방축적 억제 효능이 더 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 3).

Lipase는 대부분 췌장에서 분비되는 소화효소로 지방을 가수분해하여 흡수 가능한 형태로 분해한다<sup>34)</sup>. 분해된 글리세롤과 지방산은 에너지원으로 쓰이고, 남은 지방은 중성지방으로 합성되어 체내에 축적된다. 따라서 lipase 활성의 저해는 체내 지방흡수를 억제시켜 지방을 대변으로 배출한다<sup>35)</sup>. 체내지방의 흡수와 분해에 관한 효과를 검증하기 위해 pancreatic lipase 활성 억제 실험과 Ex vivo lipolysis 글리세롤 배출량을 측정하였다. Pancreatic lipase 활성 저해 효과를 검증한 결과, 두 실비산의 농도에 따른 pancreatic lipase 활성 억제는 SSE가 SSW에 비해 농도 의존적으로 우수하였다(Fig. 5). 지방분해효과를 fat pad를 이용한 ex vivo lipolysis 실험을 통해 확인한 결과 지방이 분해된 글리세롤 배출량이 1 µg/mL의 농도에서 유의성 있게 촉진되는 것을 확인

하였다(Fig. 6).

이상지질혈증은 체내 지질대사가 정상적으로 이루어지지 않아 혈중 지질 농도가 비정상적으로 증가한 상태이며 산화된 LDL-cholesterol은 백혈구의 화학주성을 증가시키고, 벽세포에서 chemoattractant cytokines를 생성시켜 혈관벽에 동맥경화가 잘 발생하도록 한다<sup>36)</sup>. 이상지질혈증을 치료할 때 일차적인 목표는 LDL-cholesterol의 수치를 낮추는 것이다. 고지혈증 치료에 있어 LDL-cholesterol을 낮추는 것 외에도 HDL-cholesterol을 증가시키고 triglyceride를 낮추는 것도 중요한데, 특히 HDL-cholesterol은 콜레스테롤 역수송 과정으로 독립적으로 지질을 제거하며 그 외에도 항산화, 항염증, 항응고 작용 및 혈관내피세포 보호 기능이 있어 관상동맥 질환의 발생 위험을 낮춘다<sup>36)</sup>.

지질대사 과정에서의 실비산의 작용을 살펴보기 위해 혈청 지질 인자를 측정하였다. 혈청 내 triglyceride 함량은 대조군 50.94±2.80 mg/dL, SSWG 48.27±2.28 mg/dL, SSEG 48.01±0.68 mg/dL로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7). 혈청 내 total cholesterol 함량은 대조군 35.01±0.83 mg/dL, SSWG 35.33±0.24 mg/dL, SSEG 30.77±1.87 mg/dL (p<0.05)로 대조군과 비교하여 SSEG에서 유의적으로 감소하였다(Fig. 8). 혈청 내 HDL-cholesterol 함량은 정상군 67.89±2.39 mg/dL, 대조군 60.64±4.27 mg/dL, SSWG 76.13±2.25 mg/dL (p<0.05), SSEG 74.72±0.39 mg/dL (p<0.05)로 대조군과 비교하여 SSWG, SSEG에서 유의하게 증가하였다(Fig. 9). 혈청 내 LDL-cholesterol 함량은 대조군 16.09±0.98 mg/dL, SSWG 15.23±0.63 mg/dL, SSEG 12.05±1.25 mg/dL (p<0.05)로 대조군에 비해 SSEG에서 유의하게 감소하였다(Fig. 10).

생체 내에서 과잉으로 축적된 체지방조직과 과산화 지질이 생산하는 염증성 매개물질 및 cytokines는 생체 전반의 기능에 영향을 나타내는 것으로 보고되어 비만으로 인한 각종 질병의 예방 및 치료를 위해 이러한 물질의 적절한 제어가 매우 중요하다. 혈청 지질 과산화물 MDA 분석은 2-TBARS 생성량(nM/mL)을 측정하여 판단하였다. 정상군 0.60±0.22, 대조군 2.32±0.12, SSWG 1.82±0.34, SSEG 1.51±0.25로 나타났다. 실비산 투여는 혈액 지질 과산화물을 감소시켰고 특히 SSEG에서만 유의성 있는 감소를 보여주었다(Fig. 11).

이상의 결과에서 실비산 추출물은 DPPH 라디칼 소

거 활성, ABTS 라디칼 소거 활성이 우수한 것으로 관찰되었고, 일정량 이상의 폴리페놀 및 플라보노이드를 함유하고 있어 항산화 효과가 있다고 생각한다. 또한 세포 독성이 없으며, 3T3-L1 세포에서 지방축적을 억제하는 효능, Pancreatic lipase 활성 저해 효과, 글리세롤 배출 촉진작용이 있었다. 혈청 중성지방, 총콜레스테롤, LDL-cholesterol, 지질 과산화물을 감소시켰고, HDL-cholesterol을 증가시키는 효과와 체지방의 축적을 억제하고 배설을 촉진하는 효과가 있었으므로 향후 비만 치료 연구에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결론»»»»

實脾散의 항산화 및 지방축적 억제에 대한 효과를 확인하기 위해 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정하여 실비산의 농도 의존적 소거능 증가를 확인하였다.
2. SSE가 SSW보다 실비산의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 더 높게 나타났다.
3. 실비산 처리군이 대조군에 비해서 3T3-L1 세포에서 지방축적의 정도가 감소하였고 3T3-L1 세포의 전 실험농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다.
5. Pancreatic lipase 활성 억제는 SSE가 SSW에 비해 농도 의존적으로 우수하였다.
6. Lipolysis 글리세롤 배출량은 1 mg/mL의 농도에서 유의성 있게 촉진되었다.
7. 혈청 중성지방 함량은 대조군에 비해 감소했으나 유의성이 없었고, 혈청 총콜레스테롤 함량과 혈청 LDL-cholesterol 함량은 대조군에 비해 SSEG에서 유의적으로 감소하였으며 혈청 HDL-cholesterol 함량은 대조군에 비해 SSWG, SSEG에서 유의하게 증가했다.
8. 실비산 투여는 혈청 지질 과산화물을 감소시켰고, 특히 SSEG에서 유의하게 감소했다.

이상의 결과를 볼 때 실비산은 항산화 효능과 지방축적 억제 효과가 있어서 향후 추가적인 연구를 통해 비만을 예방하고 치료하는데 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## References>>>>

1. Korea Institute of Oriental Medicine. Clinical practice guideline for obesity in Korean Medicine. Seoul:Elsevier. 2016:30.
2. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight. Geneva:WHO. 2018 [cited 2019 Oct 31]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
3. Korea National Statistical Office. Prevalence of obesity. Seoul:Korea national statistical office. 2017 [cited 2019 Oct 31]. Available from: <http://m.kosis.kr/mobService/data/NewSeriesJipyoListInfo01.do?parmMainJipyo=514&preListNm=%EB%B3%B4%EA%B1%B4%C2%B7%EB%B3%B5%EC%A7%80&checkFlag=N>.
4. Wang B. Hwangjenaegyongsomun. Seoul:Daesungmunhwasa. 1994:93.
5. Kim S, Jin SH, Kim TH. A study on etiological factors, symptoms of a disease, and treatments of obesity based on Dong-Yi Bo Gam. J Korean Med. 1998;19(2):125-36.
6. Heo J. Donguibogam. Seoul:beobinmunhwasa. 1999:1306.
7. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem Pharm Bull. 1989;37(8):2016-21.
8. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999;26(9-10):1231-7.
9. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem. 1912;12:239-43.
10. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JR. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. J Sci Food Agric. 1994;64(2):155-61.
11. Kim JH, Kim HJ, Park HW, Youn SH, Choi DY, Shin CS. Development of inhibitors against lipase and alpha-glucosidase from derivatives of monascus pigment. FEMS Microbiol Lett. 2007;276(1):93-8.
12. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18(6):499-502.
13. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem. 1978;86(1):271-8.
14. Korea Disease Control and Prevention Agency. Korea national health & nutrition examination survey, Youth health behavior survey in 2018. 2018 [cited 2019 Oct 31]. Available from: [https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04\\_04.do](https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04_04.do).
15. Korean Society for the Study of Obesity. Clinical obesity. Seoul:Korea Medical Book Publishing Company. 2008:143, 180.
16. Tak YJ, Lee YS, Lee JS, Kang JH. The trend of obesity-related researches in Korea:from 1984 to 2002. Korean J Obes. 2004;13(1):1-13.
17. Hwang MJ, Shin HD, Song MY. Literature review of herbal medicines on treatment of obesity since 2000; mainly about Ephedra Herba. J Korean Med Obes Res. 2007;7(1):39-54.
18. Shin JY. Bangyakhappyeon commentary. Gyeonggido: Sungbosa. 2005:134.
19. Kim HJ, Lee YM, Kim YH, Won SI, Choi SA, Choi SW. Inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes with Magnolia officinalis extracts. J Soc Cosmet Scientists Korea. 2009;35(2):117-23.
20. Kim DH, Kwon BR, Kim SJ, Kim HJ, Jeong SI, Yu KY, Kim SY. Anti-obese effects and signaling mechanisms of Chaenomeles sinensis extracts in 3T3-L1 pre-adipocytes and obese mice fed a high-fat diet. Herb Formula Sci. 2017;25(4):457-69.
21. Lee JA, Park YJ, Jeong WS, Hong SS, Ahn EK. Anti-obesity effect of Amomum taso-ko ethanol extract in 3T3-L1 adipocytes. J Appl Biol Chem. 2017;60(1):23-8.
22. Ryu EK, Chung SH, Lee JS, Kim SS, Shin HD. Effects of Poria cocos extract on the changes of the weight, epididymal fat tissue, serum and m-RNA in visceral fat of the obese rats induced by fat diet. J Oriental Rehab Med. 2000;10(2):81-98.
23. Yoon TS, Sung YY, Jang JY, Yang WK, Ji YU, Kim HK. Anti-obesity activity of extract from Saussurea lappa. Korean J Medicinal Crop Sci. 2010;18(3):151-6.
24. Que F, Mao L, Zhu C, Xie G. Antioxidant properties of chinese yellow wine, its concentrate and volatiles. LWT-Food Science and Technology. 2006;39(2):111-7.
25. Kim MJ, Park EJ. Feature analysis of different in vitro antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2011;40(7):1053-62.
26. Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (sorghum bicolor) and sorghum products. J Agric Food Chem. 2003;51(23):6657-62.
27. Pohanka M, Pejchal J, Snopkova S, Havlickova K, Karasova JZ, Bostik P, Pikula J. Ascorbic acid: an old

- player with a broad impact on body physiology including oxidative stress suppression and immunomodulation: a review. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12(1):35-43.
28. Jeon WY, Lee MY, Lim HS, Shin IS, Kim YJ, Jin SE, You SR, Seo CS, Kim JH, Ha HK, Jeong SJ, Kim OS, Shin NR, Kim SS, Shin HK. Experimental studies on the inflammation-related diseases pharmacological effect of water and 70% ethanol extracts from Socheongnyong-tang. *Herb Formula Sci*. 2012;20(2):13-28.
  29. Weon JB, Lee JW, Eom MR, Jung YS, Ko HJ, Lee HY, Park DS, Chung HC, Chung JY, Ma CJ. Effect of water and ethanol extracts *Codonopsis lanceolata* on spatial learning and memory in mice. *Yakhak Hoeji*. 2014;58(5):287-93.
  30. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313-52.
  31. Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol*. 2012;44(3):337-42.
  32. Lee SJ, Chung HY, Lee IK, Yoo ID. Isolation and identification of flavonoids from ethanol extracts of *artemisia vulgaris* and their antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol*. 1999;31(3):815-22.
  33. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011;24(7):1043-8.
  34. Lee SH. Evaluation of asymptomatic hyperamylasemia and hyperlipasemia. *Korean J Pancreas Biliary Tract*. 2017;22(3):103-13.
  35. Woo SE, Kwon JH, Yang SY, Park HJ, Kim HK. Development of egg yolk antibody specific to the pancreatic lipase domain for anti-obesity. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2008;36(4):299-306.
  36. Lsselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. *Harrison's principles of internal medicine*. Seoul: MIP. 2006:1554-63, 2500-12.