

택사탕의 항산화와 혈중지질에 대한 효과

이윤진 · 이은별 · 김현지 · 양두화 · 김영준 · 안희덕
대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

The Effects of *Taeksa-tang* on Blood Lipid Profile and Anti Oxidation

Yun-Jin Lee, K.M.D., Eun-Byeol Lee, K.M.D., Hyeon-Ji Kim, K.M.D., Doo-Hwa Yang, K.M.D.,
Young-Jun Kim, K.M.D., Hee-Duk An, K.M.D.

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

Objectives We evaluated the improving effects of *Taeksa-tang* (TST) using 3T3-L1 cells and C57BL/6 mice were fed on a high-fat diet.

Methods The anti-radical activities of TST were studied using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid). The content of total polyphenol was measured using Folin-Ciocalteu reagent, whereas aluminum chloride colorimetric method was used for the content of total flavonoid. Moreover, the factors related to lipid profile and the protein expressions such as β -oxidation and anti-oxidant enzyme were analyzed using serum and western blotting of 3T3-L1 cells. Additionally, we examined lipolysis through glycerol appearance in mouse adipose tissue.

Results TST treatment showed strong free radical scavenging activities with half maximal inhibitory concentration and the presence of a amount of total polyphenol and total flavonoid. TST treatment significantly increased factors related to β -oxidation such as carnitine palmitoyl transferase-1 and uncoupling protein 2 via the phosphorylation of liver kinase B1 (LKB1) and AMP-activated protein kinase (AMPK). Moreover, the protein expressions of anti-oxidant enzyme and lipolysis were significantly elevated by TST administration. In addition, TST supplementation lowered serum malondialdehyde, triglyceride, and total cholesterol levels compared with the control group. Taken together, these data suggest that TST treatment regulated lipid parameters via the increase of β -oxidation by LKB1-AMPK signaling pathway.

Conclusions TST may have a potential remedy in the prevention and treatment of obesity. Therefore, this study may provide the scientific basis for TST use. (**J Korean Med Rehabil 2021;31(2):1-14**)

RECEIVED March 16, 2021
ACCEPTED March 30, 2021

CORRESPONDING TO

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

TEL (053) 770-2116
FAX (053) 764-0566
E-mail okee@dhu.ac.kr

Copyright © 2021 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Key words *Taeksa-tang*, 3T3-L1 cells, Lipolysis, Antioxidant, Anti-obesity agents

서론»»»»

비만이란 신체에 필요한 에너지보다 섭취가 많아 신체에 지방이 과도하게 축적된 상태로 정의할 수 있다¹⁾. 비만의 평가에는 크게 체질량 지수(body mass index,

BMI)와 체성분 측정법, 대사율 측정법 등을 사용하는데 가장 널리 사용하는 지표가 BMI이다. BMI는 체중(kg)/신장(m²)으로 계산하며, 우리나라는 WHO 아시아태평양 비만지침²⁾에 따라 BMI 25 kg/m² 이상을 비만이라 진단한다.

2018 국민건강통계에 따르면 2018년 기준 비만의 전체 유병률은 34.6%이며, 특히 2005년부터 30%를 초과한 이후 현재까지 지속적으로 증가 추세에 있다³⁾. 비만은 고혈압, 고지혈증, 당뇨병으로 대표되는 각종 성인병과 만성질환의 전 단계로 여겨지고 있으며⁴⁾ 2-5%의 체중 감소만으로도 심혈관계 질병의 발병률을 낮추는 효과가 있음이 밝혀져 2차적인 질환의 예방을 위해서라도 비만 치료에 대한 중요성이 강조되고 있다⁵⁾. 그러나 비만치료를 위해 현재 임상에서 사용하는 약제들은 지속 가능성과 장기간 복용에 대한 연구가 필요한 상황⁶⁾이므로 비만에 관해 안전하면서도 새로운 치료법의 필요성이 대두되고 있다.

澤瀉湯은 『東醫寶鑑』⁷⁾에 방광의 열로 인해 배뇨가 원활하지 않고 부종이 생기는 子淋에 사용한다고 기록되어 있다. 택사탕은 澤瀉, 桑白皮, 枳殼, 檳榔, 赤茯苓, 木通, 生薑으로 이루어져 있으며 택사탕을 이루는 각 단미제제에 대한 항산화 및 항비만 효과는 연구⁸⁻¹⁴⁾가 진행되어 있으나 택사탕에 대한 항산화, 항지질, 항비만 효과에 대한 체계적인 실험 연구는 없었다. 따라서 택사탕의 효과를 확인해 보고자 본 연구를 계획 및 진행하게 되었다.

본 연구에서는 *in vitro* 실험에서 3T3-L1 세포에 택사탕을 투여하여 항산화 관련 인자와 지질대사 관련 인자를 살펴보았으며 *ex vivo* 실험에서 택사탕이 지질대사에 미치는 영향을 보았다. 더 나아가 *in vivo* 수준에서 고지방식이로 유도된 비만 쥐에 택사탕을 투여한 후 항산화 효과와 혈중지질 감소 효과를 확인하였으며 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

본 실험에 사용된 gallic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), sodium carbonate, potassium phosphate dibasic, sodium hydroxide, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, naringin,

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), diethylene glycol, insulin, potassium phosphate monobasic, dexamethasone (Dex), dimethyl sulfoxide (DMSO), potassium persulfate는 Sigma-Aldrich (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), trypsin은 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 제품을 구입하였다. Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 1차 항체 liver kinase B1 (LKB1), phospho-LKB1 (p-LKB1), carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1), mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2), nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2), catalase, heme oxygenase-1 (HO-1)을 구매하였으며, AMP-activated protein kinase (AMPK), phospho-AMPK (p-AMPK)와 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MN, USA)에서 구입하였고, 2차 항체는 Gene Tex (City of Irvine, CA, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. Isopropyl alcohol은 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, formaldehyde solution은 Duksan Pure Chemicals (Ansan, Korea)에서 구입하였다.

2) 동물

대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 공급받은 5주령의 웅성 C57BL/6 mouse에 물과 고형사료(항생제 無첨가; Samyangsa, Seoul, Korea)를 적절히 공급하고, 12시간의 명암주기, 온도(22±2°C), 습도(50±5%)로 관리되는 사육 환경에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 투입하였다. 대구한의대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받은 후 실험을 진행하였다(승인번호: DHU2020-056).

3) 시료 제조

본 실험에 사용한 택사탕의 구성 한약제는 『東醫寶鑑』⁷⁾에 의거하여 옹기한약국(Daegu, Korea)에서 구입하여 생약규격집에 맞추어 약전규격에 적합한 것만을 사용하였다(Table I). 택사탕 42 g을 10배 정제수에 넣고 100°C에서 2시간 열수 추출하였으며 여과 후 감압 농축기로 농축하여 동결 건조 후 파우더(수율 7.6%)를

Table I. Composition of *Taeksa-tang*

Pharmacognostic name	Amount (g)
<i>Alisma orientalis</i> (Sam.) Juzep	6
<i>Morus alba</i> L.	6
<i>poria cocos</i> (Schw.) Wolf	6
<i>Citrus aurantium</i> L.	6
<i>Areca catechu</i> L.	6
<i>Akebia quinata</i> Decne.	6
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	6
Total amount	42

얻었다. 택사탕 파우더를 -80°C에 냉동 보관 후 증류수에 녹인 택사탕 물 추출물(*Taeksa-tang* water extract, TST)를 실험에 사용하였다.

4) 실험기기

본 실험에 사용된 기기는 Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Bucheon, Korea), vortex mixer, 동결건조기(FD5508; Ilshinbiobase, Yangju, Korea), 냉장고속원심분리기 (Mega17R; Hanil Scientific Inc., Seoul, Korea), 열탕추출기(DWT-1800T; Daewoong Bio, Hwaseong, Korea), microplate reader (Infinite M200 pro; Tecan, Männedorf, Switzerland), 전자채중계(CAS, Yangju, Korea), rotary vacuum evaporator (Buchi B-480; Buchi AG, Flawil, Switzerland), deep-freezer (Sanyo Co., Osaka, Japan)를 사용하였다.

2. 방법

1) Total polyphenol과 total flavonoid 함량 측정

Total polyphenol은 Folin-Denis 방법으로 함량을 측정하였다¹⁵⁾. 100 mg/mL의 TST 10 µL, distilled water 790 µL 및 50 µL의 Folin-Ciocalteu’s phenol reagent를 혼합한 후 실온에서 1분간 반응시킨다. 그 다음, 20% sodium carbonate 150 µL를 추가한 후 2시간 반응시켜 흡광도는 microplate reader로 765 nm에서 측정하였다. 표준물질인 gallic acid로 표준 검량선을 구했으며, 추출물의 total polyphenol 함량을 산출하였다.

Total flavonoid는 Lister 등¹⁶⁾의 방법으로 함량을 측정하였다. 11.1 mg/mL의 TST 100 µL에 1 N NaOH

10 µL, diethylene glycol 1 mL를 혼합한 후 37°C의 환경에서 1시간 동안 차광하여 방치한 후 microplate reader로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질인 naringin으로 표준 검량선을 구했으며, 추출물의 total flavonoid 함량을 산출하였다.

2) DPPH free 라디칼 소거능 측정

TST의 항산화능을 측정하기 위해 DPPH free 라디칼 소거법을 이용하였다¹⁷⁾. 100 µL의 60 µM DPPH 용액과 TST을 농도별로 희석한 용액 100 µL를 혼합하여 30분간 암소의 환경에서 방치한 후 microplate reader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 흡광도는 아래 식에 따라 계산하여 값을 구하였다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= \left[1 - \left(\frac{OD_{sample}}{OD_{control}} \right) \right] \times 100$$

OD_{sample}: absorbance of sample

OD_{control}: absorbance without sample

3) ABTS free 라디칼 소거능 측정

TST의 항산화능을 측정하기 위해 ABTS free 라디칼 소거능을 측정하였다¹⁸⁾. 7 mM ABTS 시약과 2.4 mM의 potassium persulfate를 잘 혼합한 다음 실온 및 암소 환경에서 약 16시간 이상 방치한 뒤 ABTS⁺를 형성시켜 415 nm에서 0.70±0.02의 흡광도 값이 되도록 ethanol로 희석하여 사용하였다. 희석된 용액 95 µL에 TST 5 µL를 넣은 후 15분 동안 방치하여 microplate reader로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 흡광도는 아래 식에 따라 계산하여 산출하였다.

ABTS radical scavenging activity (%)

$$= \left[1 - \left(\frac{OD_{sample}}{OD_{control}} \right) \right] \times 100$$

OD_{sample}: absorbance of sample

OD_{control}: absorbance without sample

4) 텍사탕의 세포 독성 확인

3T3-L1 세포를 96 well plate에 2×10^6 cells/mL 세포를 분주하여 안정화시킨 후 TST를 각 농도(0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2 mg/mL)별로 처리하여 24시간 배양하였으며, 배지를 제거하고 MTT 시약을 처리하고 4시간 반응시킨 뒤 DMSO 200 μ L를 가하였다. 흡광도는 microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 3T3-L1 세포 배양 및 분화

실험에 사용된 3T3-L1 지방 세포(American type culture collection, Manassas, VI, USA)는 5% CO₂ 배양기, 37°C (HERA Cell 150; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 DMEM 배지(1% P/S, 10% BCS)를 처리하여 6일 동안 배양하였으며, 배양시킨 다음 배양액을 10% FBS, 1 mg/mL의 insulin, 11.1 mg/mL의 IBMX, 0.1 mg/mL의 Dex이 포함된 분화유도 배양액으로 교체하고 2일 동안 배양하였다. 2일 뒤 분화유도 배양액(1 mg/mL insulin, 10% FBS)으로 교환하고 4일간 배양시킨 뒤 insulin을 첨가하지 않은 DMEM 배지(10% FBS)로 2일간 배양하였다.

6) 3T3-L1 cells western blotting

세포 분화 및 약물 처리 과정을 거친 후 세포 배양액을 제거하여 DPBS로 3회 세척하고 phosphatase inhibitor 및 protease inhibitor가 첨가된 radioimmuno precipitation assay buffer를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 세포를 수거하여 10분마다 3번 vortex하여 분쇄시킨 후 13,000 rpm (4°C)으로 30분 동안 원심분리기를 이용하여 얻은 상층액은 냉동 보관하였다. 세포 내의 HO-1, Nrf2, catalase, p-AMPK, p-LKB1, CPT-1, UCP2, β -actin의 단백질 발현 측정을 위해서 단백질 10 μ L를 8-12% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel에 분주하여 전기영동시킨 후 nitrocellulose membrane에 SDS polyacrylamide gel을 이동시켰다. 1차 antibody를 준비된 membrane에 처리하여 4°C에 overnight시킨 뒤 phosphate buffered saline with tween 20 (PBS-T)를 사용하여 6분마다 5회 세척하고, 1차 antibody가 처리된 membrane에 적합한 2차 antibody (PBS-T를 이용하여 1:3,000 희석)를 처리한 후 2시간 동안 상온에서 반응시

킨 뒤에 PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence 시약에 노출시킨 membrane을 Sensi-Q2000 Chemidoc에 감광시켜 단백질 발현량을 확인한 후, ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 이용하여 band를 정량하였다. 각각의 단백질 수준을 정상군의 단백질 수준으로 나눈 후 상대적 비로 나타내었다(represented as 1).

7) *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, 시험관 당 150 mg씩 1% free fatty acid free bovine serum albumin (Sigma-Aldrich)이 포함된 1 mL HBSS에 준비한다. 농도별로 희석한 시험 약물과 양성 대조약물인 isoproterenol (1.86 mg/mL, 7.5 mM)을 시험관에 넣은 후 1시간 동안 37°C의 환경에서 배양한다. 1시간 뒤 상층액을 얻은 후 fat이 분해되어 유출된 glycerol의 양을 Sigma-Aldrich에서 구입한 glycerol assay kit를 사용하여 측정하였다.

8) 약물투여와 군 분리

실험군은 일반사료를 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 TST 100 mg/kg 투여한 약물군(TST100), 60% HFD를 급여하고 TST를 200 mg/kg 투여한 약물군(TST200)으로 8마리씩 4군으로 군분리 하였으며, 정상군을 제외하고 모든 군에 10% fructose를 공급하였다. 정상군은 일반사료(조희분 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조지방 8.0% 이하, 인 0.4% 이상, 조단백질 22.1% 이상, 항생제 無 첨가, 칼슘 0.6% 이상; 삼양사, Seongnam, Korea)를 공급하였으며, 고지방식이군은 60% HFD를 구입하여 매일 공급하였다(Table II). 약물 투여는 체중 측정 후 증류수에 녹여 일주일간 매일 일정한 시간에 존대(zonde)를 이용하여 경구 투여를 실시하였다.

9) 간 기능 분석

Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic

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, 80Mesh	200	800
L-cystine	3	12
Corn starch	0	0
Maltodextrin 10	125	500
Sucrose	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0
Soybean 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	4057.2

pyruvic transaminase (GPT)는 assay kit (Asanpharm Co., Ltd., Seoul, Korea)로 측정하였다.

10) 혈청 내 지질 과산화물 분석

혈청 내의 지질 과산화물(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)은 Mihara와 Uchiyama의 방법¹⁹⁾을 사용하여 측정하였으며, 흡광도는 microplate reader로 540 nm에서 값을 측정하였다.

11) 혈청 내 지질 분석

7일간 TST 투여 후 mice의 심장에서 채혈한 혈액을 원심분리기를 이용하여 10분간 4,000 rpm으로 원심분리한 후 혈청을 얻었으며 혈청의 triglyceride (TG)와 total cholesterol (TC)은 Wako-Chemicals (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)의 TG assay kit와 TC assay kit를 사용하여 측정하였다.

12) 통계처리

실험 수치는 *in vitro*에서 mean±standard error of the mean, *in vivo*에서 mean±standard deviation로 나타냈고, SPSS program for windows version 25 (IBM Co., Armonk, NY, USA)로 one-way analysis of variance 검정을 실시하였으며, 각 자료의 통계적 유의성은 least significant difference method로 검증하였고, 정상군과 대조군, 대조군과 약물 투여군 사이에 유의성은 p-value<0.05 일 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

결과»»»»

1. Total polyphenol과 total flavonoid 함량

TST의 total polyphenol과 total flavonoid를 측정된 결과, total polyphenol 함량은 85.19±0.11 mg/g으로 나타났으며, total flavonoid 함량은 51.11±0.24 mg/g으로 나타났다.

2. DPPH 라디칼 소거 활성 효과

실험에 사용된 TST의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정된 결과, DPPH 소거능을 half maximal inhibitory concentration (IC₅₀)값으로 나타내었을 때 52.23±1.02 µg/mL로 나타났다(Fig. 1).

3. ABTS 라디칼 소거 활성 효과

본 실험에서 TST의 항산화능을 확인하기 위해 ABTS 소거능을 측정된 결과, ABTS 소거능을 IC₅₀값으로 나타내었을 때 62.44±5.72 µg/mL로 나타났다(Fig. 2).

4. TST가 세포 생존율에 미치는 영향

TST 처리로 3T3-L1 지방세포에 미치는 세포 독성 여부를 알아보기 위해 3T3-L1세포에 50-2,000 µg/mL 농도의 TST를 처리한 후 MTT 염색으로 세포 생존율을 분석한 결과, 대조군과 비교하였을 시 전 실험 농도에서 세포

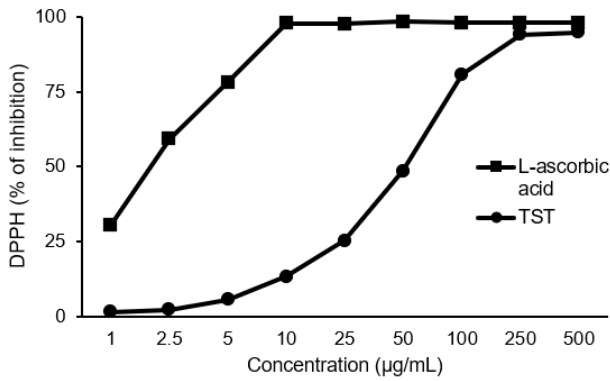


Fig. 1. Scavenging activity of TST on DPPH free radical. Each experiment was run in triplicate. Data are mean±standard error of the mean. TST: *Taeksa-tang*, DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

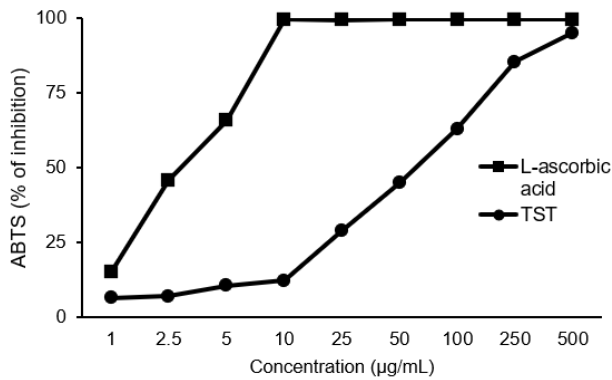


Fig. 2. Scavenging activity of TST on ABTS free radical. Each experiment was run in triplicate. Data are mean±standard error of the mean. TST: *Taeksa-tang*, ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid).

독성이 나타나지 않았기에 차후 50, 100, 200 µg/mL 농도로 실험을 진행하였다(Fig. 3).

5. *Ex vivo* lipolysis 글리세롤 배출량

TST의 지방분해 효과는 fat pad를 이용한 *ex vivo* lipolysis 실험을 통해 확인하였으며 실험 결과를 보았을 때 지방분해가 4 µg/mL의 농도에서 의미있게 촉진되는 것을 확인하였다(Fig. 4).

6. 간 기능

간 기능 지표인 GOT의 수치(IU/L)를 분석한 결과, 정상

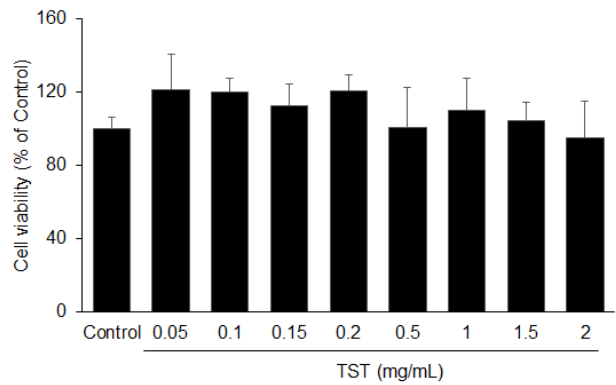


Fig. 3. Effect of TST on cell viability using 3T3-L1 cells. Cell viability was measured by MTT assay. 3T3-L1 cells were treated with 50-2,000 µg/mL of TST for 24 h. Each experiment was run in triplicate. Data are mean±standard error of the mean. There were no significant differences between Control groups and TST treated groups. TST: *Taeksa-tang*, MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

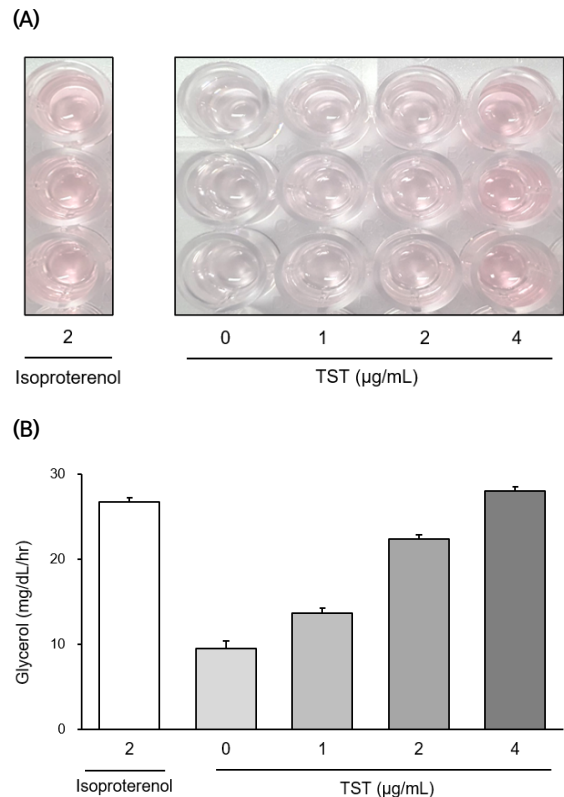


Fig. 4. Effect of TST treatment on lipolysis. Glycerol release was measured in mouse fat pad after treatment with isoproterenol and 1, 2, and 4 µg/mL of concentration TST by concentration. Each experiment was run in triplicate. Data are mean±standard error of the mean. Isoproterenol, a beta-adrenergic agonist, was used as a positive control. (A) The color changes after isoproterenol and TST treatment, (B) glycerol contents. TST: *Taeksa-tang*.

군 20.74±1.44, 대조군 40.79±9.33, TST100군 27.60±9.08, TST200군 24.62±7.97으로 나타났으며, 대조군에 비해 TST100군과 TST200군에서 수치가 감소하였으나 유의하지 않았다. 또한 GPT의 수치(IU/L)의 경우 정상군 2.98±0.75, 대조군 11.96±5.38 (p<0.01), TST100군 7.33±3.62 (p<0.05), TST200군 5.34±3.50 (p<0.05)으로 나타났으며 대조군에 비해 TST100군과 TST200군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

7. 혈청 내 지질 과산화물

혈청 내 지질 과산화물은 2-TBARS 분석법을 통한 malondialdehyde (MDA) 생성량(nmol/mL)을 측정하여 분석하였다. 정상군 2.18±0.19, 대조군은 4.35±0.30 (p<0.001), TST100군 3.55±0.24 (p<0.05), TST200군 3.40±0.14 (p<0.01)으로 나타났으며, 대조군에 비하여 TST100군과 TST200군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

8. 혈청 내 중성지방 함량

혈청 내 중성지방 함량(mg/dL)을 측정한 결과, 정상군 46.71±9.48, 대조군은 100.92±7.24 (p<0.01), TST100군 64.87±15.34 (p<0.05), TST200군은 55.00±2.21 (p<0.01)로 나타났다. 대조군에 비해 TST100군과 TST200군에

서 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

9. 혈청 내 총 콜레스테롤 함량

혈청 내 총 콜레스테롤 함량(mg/dL)을 측정한 결과, 정상군 72.68±1.17, 대조군 115.12±3.76 (p<0.001), TST100군 96.22±4.51 (p<0.05), TST200군 81.29±4.12 (p<0.001)으로 나타났으며 대조군에 비하여 TST100군과 TST200

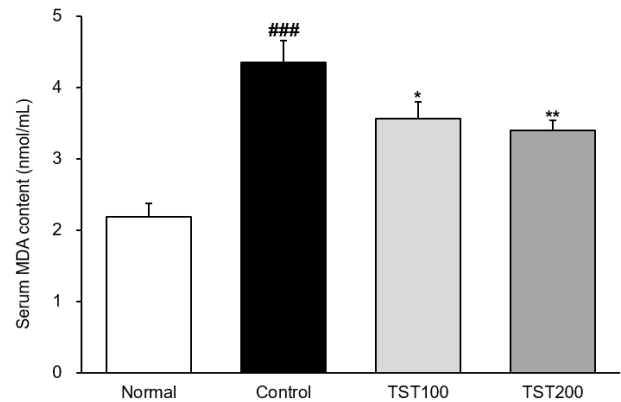


Fig. 6. Serum MDA levels measurement by TST treatment. Data are mean±standard error of the mean. (n=8/group). Normal: normal mice, Control: 60% HFD and distilled water treated mice, TST100: 60% HFD and TST 100 mg/kg treated mice, TST200: 60% HFD and TST 200 mg/kg treated mice. MDA: malondialdehyde, TST: *Taeksa-tang*, HFD: high-fat diet. Significance: ###p<0.001 vs. Normal, *p<0.05, **p<0.01 vs. Control.

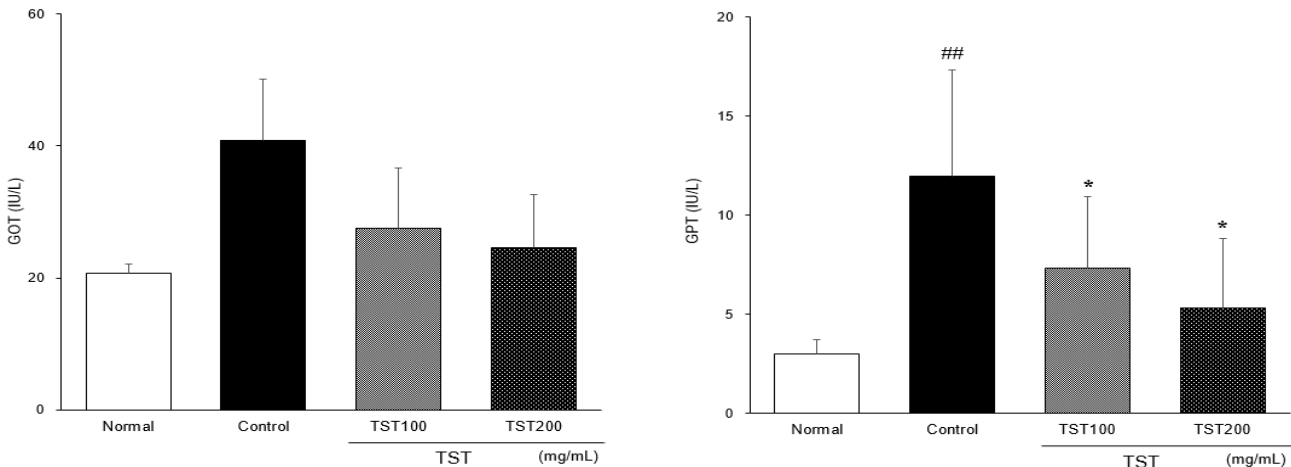


Fig. 5. Serum GOT and GPT levels measurements by TST treatment. Data are mean±standard error of the mean. (n=8/group). Normal: normal mice, Control: 60% HFD and distilled water treated mice, TST100: 60% HFD and TST 100 mg/kg treated mice, TST200: 60% HFD and TST 200 mg/kg treated mice. GOT: glutamic oxaloacetic transaminase, GPT: glutamic pyruvic transaminase, TST: *Taeksa-tang*, HFD: high-fat diet. Significance: ##p<0.01 vs. Normal, *p<0.05 vs. Control.

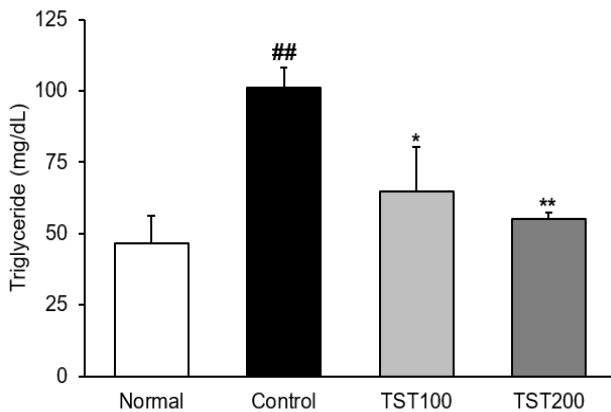


Fig. 7. Serum triglyceride levels measurements by TST treatment. Data are mean±standard error of the mean, (n=8/group). Normal: normal mice, Control: 60% HFD and distilled water treated mice, TST100: 60% HFD and TST 100 mg/kg treated mice, TST200: 60% HFD and TST 200 mg/kg treated mice. TST: *Taeksa-tang*, HFD: high-fat diet. Significance: ##p<0.01 vs. Normal, *p<0.05, **p<0.01 vs. Control.

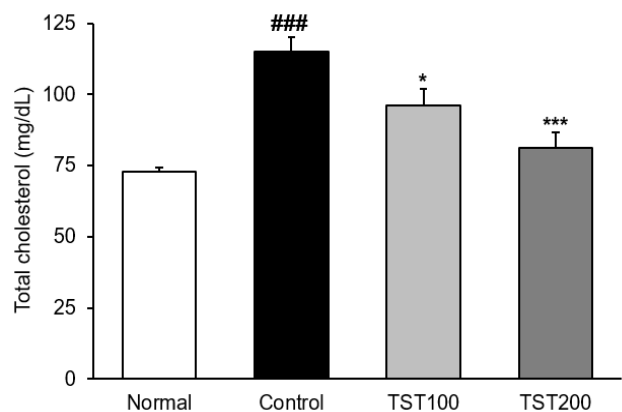


Fig. 8. Serum total cholesterol levels measurements by TST treatment. Data are mean±standard error of the mean (n=8/group). Normal: normal mice, Control: 60% HFD and distilled water treated mice, TST100: 60% HFD and TST 100 mg/kg treated mice, TST200: 60% HFD and TST 200 mg/kg treated mice. TST: *Taeksa-tang*, HFD: high-fat diet. Significance: ###p<0.001 vs. Normal, *p<0.05, ***p<0.001 vs. Control.

군 모두에서 유의하게 감소하였다(Fig. 8).

10. 지방 생성과 지방산 산화 조절 단백질의 발현

1) p-LKB1

3T3-L1 세포를 이용한 western blot을 통해 p-LKB1의 단백질 발현을 분석한 결과, 대조군 1.00±0.14에 비해 50 µg/mL 농도는 1.04±0.16, 100 µg/mL 농도에서는 1.20±0.32로 증가하는 경향만 나타났으나 대조군에 비하여 200 µg/mL 농도에서는 1.77±0.26 (p<0.05)으로 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 9).

2) p-AMPK

3T3-L1 세포를 이용한 western blot을 통해 p-AMPK의 단백질 발현을 분석한 결과, 대조군 1.00±0.14에 비해 50 µg/mL 농도에서는 1.16±0.09로 증가하는 경향만 나타났으나 대조군에 비해 100 µg/mL 농도는 1.42±0.07 (p<0.05)와 200 µg/mL 농도에서는 1.80±0.10 (p<0.001)으로 유의하게 증가하였다(Fig. 10).

11. 지방산 산화 단백질 발현량

1) CPT-1

3T3-L1 세포를 이용한 western blot을 통해 CPT-1의

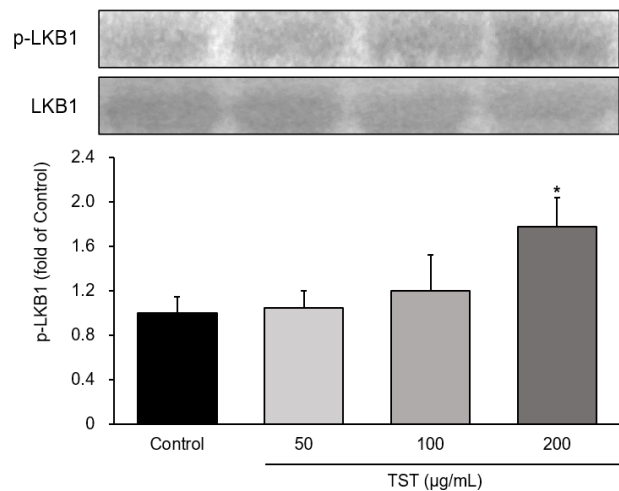


Fig. 9. Effects of TST on p-LKB1 expression. p-LKB1 expression evaluates using western blot assay (n=6, mean±standard deviation). Control: differentiated adipocytes as control, 50: TST 50 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 100: TST 100 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 200: TST 200 µg/mL treatment on differentiated adipocytes. TST: *Taeksa-tang*, LKB1: liver kinase B1, p-LKB1: p-phospho-LKB1. Significance: *p<0.05 vs. Control.

단백질 발현을 분석한 결과, 대조군 1.00±0.11에 비해 50 µg/mL 농도는 1.23±0.05로 증가하는 경향만 나타났으나, 대조군에 비하여 100 µg/mL 농도는 1.76±0.13 (p<0.001)와 200 µg/mL 농도에서는 1.85±0.12 (p<0.001)로 유의하게 증가하였다(Fig. 11).

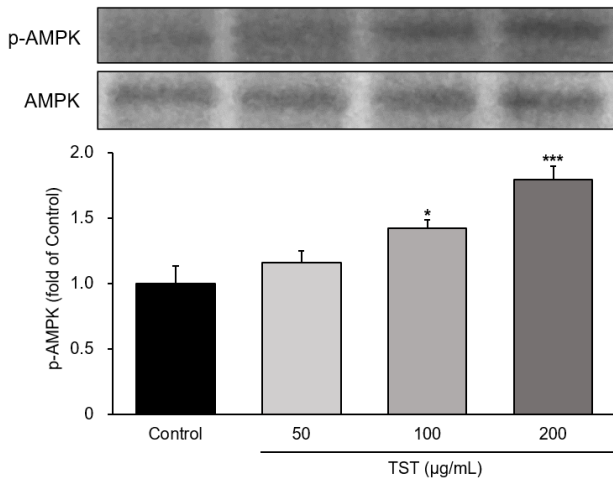


Fig. 10. Effects of TST on p-AMPK expression. p-AMPK expression evaluates using western blot assay (n=6, mean±standard deviation). Control: differentiated adipocytes as control, 50: TST 50 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 100: TST 100 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 200: TST 200 µg/mL treatment on differentiated adipocytes. TST: *Taeksa-tang*, AMPK: AMP-activated protein kinase, p-AMPK: phospho-AMPK. Significance: *p<0.05, ***p<0.001 vs. Control.

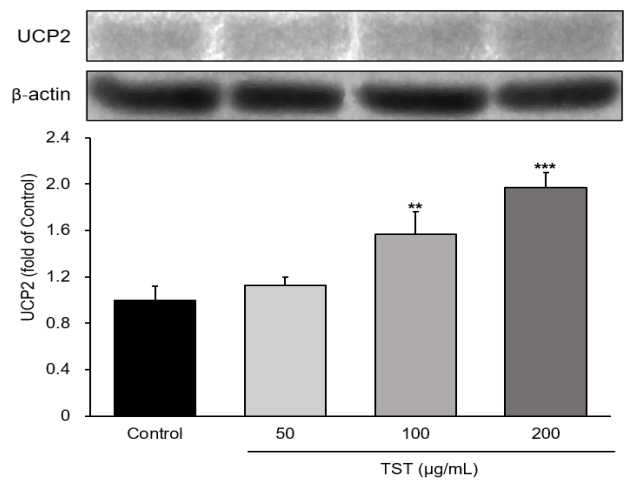


Fig. 12. Effects of TST on UCP2 expression. UCP2 expression evaluates using western blot assay (n=6, mean±standard deviation). Control: differentiated adipocytes as control, 50: TST 50 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 100: TST 100 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 200: TST 200 µg/mL treatment on differentiated adipocytes. TST: *Taeksa-tang*, UCP2: mitochondrial uncoupling protein 2. Significance: **p<0.01, ***p<0.001 vs. Control.

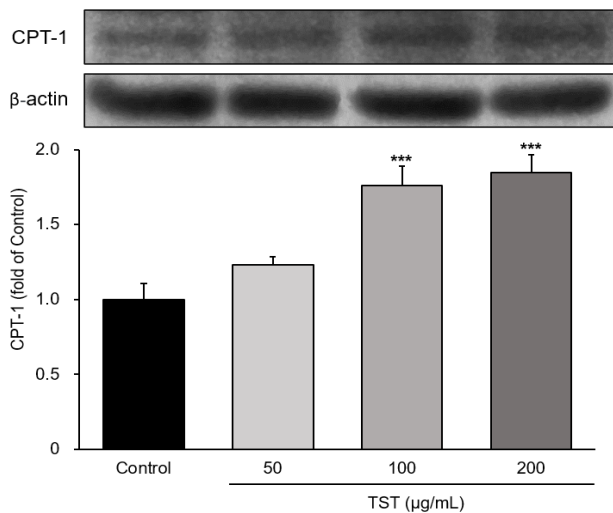


Fig. 11. Effects of TST on CPT-1 expression. CPT-1 expression evaluates using western blot assay (n=6, mean±standard deviation). Control: differentiated adipocytes as control, 50: TST 50 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 100: TST 100 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 200: TST 200 µg/mL treatment on differentiated adipocytes. TST: *Taeksa-tang*, CPT-1: carnitine palmitoyl transferase-1. Significance: ***p<0.001 vs. Control.

2) UCP2

3T3-L1 세포를 이용한 western blot을 통해 UCP2의

단백질 발현을 분석한 결과, 대조군 1.00±0.12에 비해 50 µg/mL 농도는 1.13±0.07로 증가하는 경향만 나타났으나, 대조군에 비하여 100 µg/mL 농도는 1.57±0.20 (p<0.01)와 200 µg/mL 농도에서는 1.97±0.13 (p<0.001)로 유의하게 증가하였다(Fig. 12).

12. 항산화 단백질 발현량

1) Nrf2

3T3-L1 세포를 이용한 western blot을 통해 Nrf2의 단백질 발현을 분석한 결과, 대조군 1.00±0.07에 비해 50 µg/mL 농도에서는 1.05±0.09로 증가하는 경향만 나타났으나, 대조군에 비하여 100 µg/mL 농도는 1.64±0.10 (p<0.01)와 200 µg/mL 농도에서는 2.26±0.20 (p<0.001)로 유의하게 증가하였다(Fig. 13).

2) Catalase

3T3-L1 세포를 이용한 western blot을 통해 catalase의 단백질 발현을 분석한 결과, 대조군 1.00±0.14에 비해 50 µg/mL 농도에서는 1.00±0.06로 별다른 차이가 없었으며, 대조군에 비하여 100 µg/mL 농도는 1.54±0.15 (p<0.05)와 200 µg/mL 농도에서는 2.30±0.24 (p<0.001)으로 유

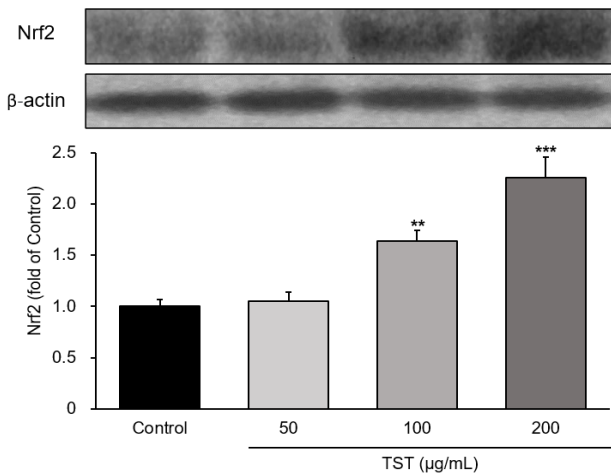


Fig. 13. Effects of TST on Nrf2 expression. Nrf2 expression evaluates using western blot assay (n=6, mean±standard deviation). Control: differentiated adipocytes as control, 50: TST 50 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 100: TST 100 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 200: TST 200 µg/mL treatment on differentiated adipocytes. TST: *Taeksa-tang*, Nrf2: nuclear factor erythroid-2-related factor 2. Significance: **p<0.01, ***p<0.001 vs. Control.

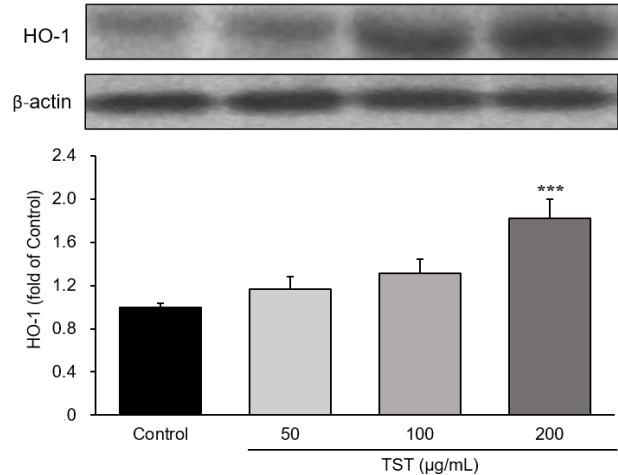


Fig. 15. Effects of TST on HO-1 expression. HO-1 expression evaluates using western blot assay (n=6, mean±standard deviation). Control: differentiated adipocytes as control, 50: TST 50 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 100: TST 100 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 200: TST 200 µg/mL treatment on differentiated adipocytes. TST: *Taeksa-tang*, HO-1: heme oxygenase-1. Significance: ***p<0.001 vs. Control.

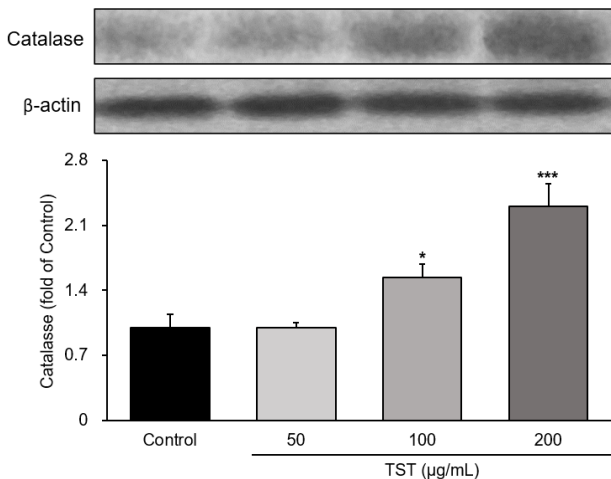


Fig. 14. Effects of TST on catalase expression. Catalase expression evaluates using western blot assay (n=6, mean±standard deviation). Control: differentiated adipocytes as control, 50: TST 50 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 100: TST 100 µg/mL treatment on differentiated adipocytes, 200: TST 200 µg/mL treatment on differentiated adipocytes. TST: *Taeksa-tang*. Significance: *p<0.05, ***p<0.001 vs. Control.

의하게 증가함을 나타냈다(Fig. 14).

3) HO-1

3T3-L1 세포를 이용한 western blot을 통해 HO-1의

단백질 발현을 분석한 결과, 대조군 1.00±0.04에 비해 50 µg/mL 농도는 1.17±0.11와 100 µg/mL 농도에서는 1.31±0.13로 증가하는 경향만 나타났으나, 대조군에 비해 200 µg/mL 농도는 1.82±0.18 (p<0.001)로 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 15).

고찰»»»»»

비만은 외관상의 문제뿐만 아니라 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 대사증후군의 발생위험을 높인다. 또한 비만으로 인해 체중이 늘어나며 근골격계 통증과 골관절염의 유병률을 높인다. 그 외에도 지방세포로 인한 호르몬의 영향으로 다낭성난소증후군, 월경이상 등의 생식 내분비계 질환도 초래할 수 있는 만큼 비만에 대한 치료와 관리는 필수적이다²⁰⁾.

비만의 치료법은 크게 행동치료, 식사치료, 운동치료, 약물치료, 수술적 치료로 나눌 수 있다²¹⁾. 그러나 대부분의 비만 환자들은 새로운 생활습관과 운동습관의 교정을 힘들어하는 경우가 많고 특히 식욕을 조절하기 어려워하므로 약물요법을 병행하여 치료하는 경우가 많다.

현재 국내에 약물치료로 승인되어 사용하고 있는 약

제는 큐시미아(Qsymia®; Alvogen Korea, Seoul, Korea) 벨빅(Belviq®; Ildong Pharmaceutical Co., Ltd., Seoul, Korea) 등이 있다. 이러한 약제들은 식욕을 억제하고 대사성질환 관리에도 효과가 있다는 점에서 장점이 있다. 그러나 장기간 사용 시 효과와 심혈관계에 미치는 영향 등에 대한 안전성 측면에서 연구의 필요성이 지속적으로 제기되고 있다. 이러한 한계점 때문에 최근 비만 치료에 있어서 새로운 치료제에 대한 수요가 큰 상황이다⁶⁾.

비만은 한의학적으로 痰, 濕, 瘀血, 脾胃積熱, 氣虛, 脾虛, 陽虛 등 다양한 병인으로 볼 수 있고, 현재 임상에서 가장 다빈도로 사용하는 변증유형은 痰飲, 瘀血, 脾虛, 食積, 濕痰, 氣虛 6가지이다¹⁾. 비만의 한의학 치료로는 크게 한약, 침, 약침, 뜸, 추나, 기공 등의 치료법이 있다. 특히 한약은 太陰調胃湯, 防風通聖散, 防己黃芪湯에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 단미제제로는 麻黃에 대한 연구가 가장 활발하며 환자에 따라 처방이 권고된다²²⁾.

택사탕은 子淋을 치료하는 처방인데 子淋이란 임산부 방광의 熱로 인해 소변이 잘 나오지 않으면서 아랫배가 아프고 몸이 붓는 것을 말한다⁷⁾. 택사탕의 구성약재를 살펴보면 澤瀉, 赤茯苓, 木通은 利小便, 清濕熱하고 枳殼, 檳榔은 調氣하며 生薑은 溫胃和胃한다²³⁾. 택사탕의 각 약제들의 항산화 및 항비만 작용이 다수의 연구⁸⁻¹⁴⁾에서 확인되었다. 따라서 효과가 입증된 약제들로 구성된 택사탕에서의 항산화 및 항지질에 대한 효과를 보고자 하였다.

본 연구의 *in vitro* 실험에서는 기본적으로 3T3-L1 cell을 사용하였다. 3T3-L1 cell은 지방세포로 분화되기 전 단계의 전지방세포(preadipocyte)이다. *In vitro* 실험의 지방조직 연구에서 가장 대중적으로 사용하는 형태의 세포이며 생쥐의 섬유모세포에서 유래한다²⁴⁾.

활성산소 제거능을 측정하기 위해서 가장 보편적으로 쓰이는 방법은 DPPH와 ABTS (2,2'-azino-bis)법이 다. DPPH에서 라디칼이 제거되면 색이 변하게 되는 성질을 이용하여 시료와 DPPH를 반응시킨 후 흡광도를 통해 시료의 활성산소 제거능력을 측정하였다²⁵⁾. 택사탕에서 DPPH를 이용하여 활성산소의 절반 소거능인 IC₅₀값을 측정했을 때 52.23±1.02 µg/mL였다. ABTS법은 라디칼이 소거되면 흡광도가 감소하는 특성을 이용

하여 항산화능을 수치화하는 것이다. TST의 ABTS IC₅₀ 값은 62.44±5.72 µg/mL로 높게 측정되었으며 DPPH와 ABTS 수치를 종합하였을 때 TST의 뛰어난 라디칼 제거능으로 우수한 항산화 효과를 보인다는 것을 알 수 있었다.

폴리페놀(polyphenol)은 우리 몸의 활성산소와 지질 과산화물질을 제거하며 하이드록실기(-OH)를 다수 포함하고 있어 병원균 단백질 내의 SH기와 결합시켜 항균작용을 기대할 수 있다²⁶⁾. 플라보노이드(flavonoid)는 폴리페놀에 속하는 성분 중 하나로 활성산소종을 제거하는 능력이 우수하여 두 성분의 함유량으로 항산화 효과를 알 수 있다²⁷⁾. TST의 폴리페놀은 85.19±0.11 mg/g이며 플라보노이드 함유량은 51.11±0.24 mg/g으로 측정되어 TST의 높은 항산화 효과를 추론해 볼 수 있었다.

Cell viability는 독성을 보는 지표로 MTT 분석법을 이용하여 측정한다. 측정 수치에서 세포가 80% 이상 생존한다면 세포독성이 없는 것으로 간주한다²⁸⁾. TST는 실험을 진행한 모든 농도에서 세포독성을 유의하게 나타내지 않아 세포독성이 없이 안전하게 사용할 수 있는 약제임을 알 수 있었다.

지방은 글리세롤(glycerol)에 3개의 지방산(fatty acid)이 붙어 있는 형태이다. 지방이 분해되면 글리세롤과 지방산의 결합이 떨어지면서 세포 중 글리세롤의 양이 증가하게 된다²⁹⁾. 본 연구에서 대조군으로 사용한 isoproterenol은 β-아드레날린을 자극하고 교감신경에 작용하여 대사를 촉진시켜 지방 분해에 관련된 연구가 진행된 물질이다³⁰⁾. 쥐에서 추출한 세포를 대상으로 진행한 *ex vivo* 실험상 TST 투여군에서 글리세롤 배출량이 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보였다. 특히 TST 4 µg/mL 농도 투여군에서는 isoproterenol 투여군과 비슷한 수준의 글리세롤 배출량을 보였다.

지속적인 고지방식을 한 경우 지질과산화물로 인해 반응성 산소종(reactive oxygen species)이 만들어지는데 이는 산화스트레스를 초래하게 된다. 이러한 활성산소에 대해 방어하는 기전에는 효소적 방어기전과 비효소적 방어기전이 있다.

대표적인 효소적 방어기전에는 catalase와 superoxide dismutase가 관여한다. 대사 과정에서 superoxide가 생성되는데 이는 과산화수소(H₂O₂)로 전환되어 세포에 유해한 영향을 미친다³¹⁾. 과산화수소의 독성은 세포질

의 퍼옥시솜(peroxisome)에서 catalase에 의해 물과 산소로 분해되며 제거된다. TST를 투여한 군의 3T3-L1 cell의 catalase 수치를 측정하였을 때 투여하지 않은 대조군에 비해 수치가 유의하게 증가한 것을 관찰할 수 있었다.

한편, 활성산소의 비효소적 방어기전은 Nrf2와 HO-1로 측정 가능하다. Nrf2는 핵 안에서 항산화 반응 요소(antioxidant response element)와 함께 작용하여 HO-1 효소를 비롯한 각종 항산화효소를 활성화시키는데 이들은 산화스트레스로부터 세포를 보호하는 작용을 한다³²⁾. 본 연구에서는 대조군에 비해 TST 투여군에서 Nrf2가 농도에 따라 유의하게 증가하였으며 HO-1의 발현량 또한 대조군에 비해 증가하였다. 따라서 TST의 투여는 활성산소의 효소적 방어기전과 비효소적 방어기전에 모두 관여하여 의미있는 항산화 효과를 나타내었다고 할 수 있다.

AMPK는 ATP를 소비하는 지방산 합성을 억제하고 ATP를 생산하는 기전인 지방산의 산화를 촉진하여 세포 내 에너지 항상성 유지에 기여한다³³⁾. AMPK는 전단계인 LKB1이 인산화되면서 활성화된다. AMPK의 지방대사는 acetyl-CoA carboxylase와 malonyl-CoA를 불활성화시키는 기전으로 이루어지는데 이에 따라 malonyl-CoA의 억제를 받던 CPT1이 활성화되면서 세포에서의 지방산 산화가 활발해진다³⁴⁾.

본 연구에서는 TST 투여군에서 LKB1, AMPK 두가지 인자 모두 대조군에 비해 증가했음을 알 수 있었다. CPT-1 인자도 대조군에 비해서 유의하게 높은 수치를 보였으므로 TST는 LKB1-AMPK 회로를 통한 지방산 산화 기전에 유의미한 효과를 발휘한다고 할 수 있겠다.

또 다른 지방산 산화기전으로는 UCP2가 관여하는 Krebs 회로가 있다. UCP2는 양성자(proton)의 수송으로 지방산과 glutamine의 kreb cycle을 거치는 산화기전에 반드시 필요하므로 UCP2의 발현량과 지방산의 산화는 비례한다고 볼 수 있다³⁵⁾. 본 연구에서 UCP2의 발현량이 TST 농도에 따라 유의한 증가를 보였으므로 TST는 지방산의 산화를 진행시키는 UCP2 유전자 발현에도 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

중성지방(TG)은 지방산과 글리세롤이 에스테르 결합을 한 형태이며 남은 잉여 지방산이 TG의 형태로 변환되어 조직에 저장된다³⁶⁾. 비만도가 증가할수록 중성지

방의 증가와 함께 콜레스테롤의 농도의 증가가 관찰된다. 또한 비만, 중성지방, 고콜레스테롤 혈증은 고혈압, 관상동맥질환, 인슐린 저항성과 연관되어 있으므로³⁷⁾ 비만치료에서 TG와 총콜레스테롤을 조절하는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서는 비만 쥐에 TST를 100 µg/mL, 200 µg/mL를 각각 투여했을 때 증류수를 투여한 대조군에 비해서 농도의존적으로 혈청 TG와 총 콜레스테롤 수치가 유의하게 감소함을 알 수 있었다.

GOT와 GPT는 간세포가 손상되었을 경우 혈청에서의 농도가 상승하게 된다. 따라서 혈청 GOT, GPT의 농도 측정을 통해 간 손상의 지표로 삼게 된다³⁸⁾. 고지방 식이를 하게 되면 간으로 보내지는 유리지방산이 늘어남과 동시에 간 내의 지방산 분해와 배출이 원활하지 못하게 된다. 따라서 사이토카인(cytokine) 작용과 반응성 산소종에 의해 간 손상의 위험성이 커진다³⁹⁾. 본 연구에서 비만 쥐에 TST를 투여했을 경우 TST 농도에 따라 GOT, GPT가 감소하는 경향을 보였다. 실험 결과에서 유의성은 없었으나 수치의 경향성을 보았을 때 TST는 간기능 개선에도 효과가 있을 것으로 추론할 수 있었다.

쥐의 혈청에서 실험한 또 다른 항산화 지표는 MDA이다. 산화스트레스로 인해 세포가 손상되어 자유라디칼이 증가하게 되면 MDA도 함께 증가하게 된다⁴⁰⁾. 혈청 내 MDA를 2-TBARS 분석법을 통해 TST를 투여한 군과 투여하지 않은 대조군을 비교해본 결과, TST 투여군의 MDA 수치가 농도에 따라 유의하게 감소함을 관찰하였다. 따라서 이 결과를 통해 본 연구에서는 TST의 항산화 효과를 세포 수준(*in vitro*) 뿐 아니라 동물의 혈청(*in vivo*)에서도 확인할 수 있었다.

결과적으로 택사당은 항산화 효과와 혈중 지질 개선에 효과가 있었으며 *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* 세 가지 수준에서 모두 항산화, 항지질 효과를 확인하였다는 점에서 의의가 있다. 특히 택사당은 LKB1-AMPK의 인산화를 촉진시켜 지질대개변수(CPT-1, UCP2)를 증가시키는 기전에 작용함을 추론해 볼 수 있었다. 그러나 실험 진행기간이 짧았다는 점, *in vivo* 연구에서 더 많은 지표를 확인하지 못했다는 점에서 한계점이 있으므로 추후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

References>>>>

1. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean Rehabilitation Medicine. 5th ed. Seoul:Koonja Publishing. 2020:322-9.
2. World Health Organization Western Pacific Region. The Asia-Pacific perspective: Redefining obesity and its treatment. Sydney: Health Communications Australia Pty. 2000:17-20.
3. Ministry of Health and Welfare, Korea Centers for Disease Control and Prevention. Korea health statistics. [Internet] 2018 [cited 2020 Oct 11]. Available from: URL: http://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04_03.do.
4. Korean Society for the Study of Obesity. Clinical obesity. 3rd ed. Seoul:Korea Medical Book Publishing Company. 2008:148-50.
5. Wing RR, Lang W, Wadden TA, Safford M, Knowler WC, Bertoni AG. Benefits of modest weight loss in improving cardiovascular risk factors in overweight and obese individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(7):1481-6.
6. Kim MK, Kim CS. Recent advances in anti-obesity agents. *Korean J Med*. 2018;93:501-8.
7. Heo J. Donguibogam. Seoul:Yeogang Publishing Company. 1994:913-4.
8. Mok JI, Kim NE, Hwangbo M, Jee SY. Anti-obesity and anti-oxidative efficacy evaluation of *Alisma orientale*. *The Journal of Applied Oriental Medicine*. 2019;19(1): 107-16.
9. Jeong HS. Efficacy of *Alismatis orientalis* rhizoma on obesity induced by high fat diet. *Kor J Herbology*. 2014;28(3):95-106.
10. Lim CY, Lim SH, Cho SI. Anti-oxidative effects of *Mori folium*, *Mori ramulus* and *Mori cortex radidis*. *Journal of Haehwa Medicine*. 2014;22(2):93-101.
11. Hong SH, Kim DK, Lee NJ, Cho JH, Kang JK, Kim YB, Park JH, Hwang SY. Anti-obesitic effect of mulberry root-bark in Zucker rats with high lipid diet induced-obesity. *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*. 2005;37(2):129-37.
12. Kang HC, Cha MY, Kim JY. A study of the antioxidant activities and whitening activities of areca semen extracts as cosmetic ingredient. *J Soc Cosmet Sci Korea*. 2015;41(3):269-77.
13. Jung EH, Kim SC, Cho IJ, Kim YW. *Akebiae caulis* inhibits oxidative stress through AMPK activation. *J Physiol & Pathol Korean Med*. 2015;29(1):18-26.
14. Kim SJ, Park SK. Antioxidative and anti-inflammatory effects of *Aurantii fructus immaturus* pharmacopuncture. *Korean Journal of Acupuncture*. 2010;27(2):13-24.
15. Folin O, Denis W. On phosphotungsticphosphomolybdic compounds as color reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1912;12:239-43.
16. 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1994;64:155-61.
17. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull*. 1989;37:2016-21.
18. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*. 1999;26(9-10):1231-7.
19. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;86(1):271-8.
20. Wadden TA, Stunkard AJ. Handbook of obesity treatment. Seoul:Med book. 2005:7-13.
21. Committee of Clinical Practice Guidelines, Korean Society for the Study of Obesity. 2018 Guidelines for the management of obesity. Paju:Chungwoon Publisher. 2018:102-55.
22. Korea Institute of Oriental Medicine. Clinical practice guideline for obesity in Korean Medicine. Seoul:Elsevier. 2016:41-90.
23. Shin MG. New editions of *Bang Yak Hap Peun*. Seoul:Yeonglim Company. 2010:319.
24. Koutnikova H, Auwerx J. Regulation of adipocyte differentiation. *Ann Med*. 2001;33:556-61.
25. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 2009;113(4):1202-5.
26. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(4):564-82.
27. 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.
28. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell viability assays. Assay guidance manual. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. 2004:1-26.
29. Cooper M, Hausman E. The cell: a molecular approach. 6th ed. Seoul:World Science. 2015:47, 457.
30. Kim KS. Pros and cons of drugs that cause weight loss. Collection of Dissertations of Autumn Conference of Korean Society for the Study of Obesity. 2004:195-208.

31. Ye SK, Jung MH. Formation and action of active oxygen. *Experimental & Molecular Medicine*. 2005;12(1):9-15.
32. Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, Kim SG, Yamamoto M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:2046-51.
33. Ha JH, Lee SH. Role of AMPK in the regulation of cellular energy metabolism. *Endocrinology and Metabolism*. 2010;25(1):9-17.
34. Assifi MM, Suchankova G, Constant S, Prentki M, Saha AK, Ruderman NB. AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289(5):794-800.
35. Emre Y, Nubel T. Uncoupling protein UCP2: when mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Lett*. 2010; 584(8):1437-42.
36. Liver System Association of Internal Medicine. *Liver system of internal medicine*. 6th ed. Seoul:Nado Publisher. 2016:307-8.
37. Cho JH, Nam MS, Lee EJ, Oh SC, Kim KR. The levels of serum total cholesterol and triglyceride in healthy Korean adults. *Korean Journal of Lipidology*. 1994;4(2): 182-9.
38. Korean Society for Laboratory Medicine. *Laboratory medicine*. 5th ed. Seoul:Beommun Education. 2016:406.
39. Kim TH, Yoo K. Obesity and fatty liver disease. *The Korean Journal of Medicine*. 2005;68(4):347-9.
40. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci Lekarskie*. 2004;57(9-10):453-5.