加味清肺瀉肝湯이 고지방식이 비만생쥐의 체지방에 미치는 영향

금선오 · 이하일 · 이종하 · 윤용일 · 권영미¹ · 송용선

원광대학교 한의과대학 한방재활의학교실, ¹원광대학교 한의과대학 영상의학과

Effects of Gami-Cheongpyesagan-Tang on Body Fat in High Fat Diet-Fed Obese Mice

Seon-Oh Keum, Ha-Il Lee, Jong-Ha Lee, Yong-Il Yoon, Young-Mi Kwon¹, Yung-Sun Song

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University,

¹Department of Radiology, College of Korean Medicine, Wonkwang University

Received: October 7, 2015

Revised: November 27, 2015

Accepted: November 30, 2015

Correspondence to: Yung-Sun Song
Department of Rehabilitation Medicine
of Korean Medicine, College of Korean
Medicine, Wonkwang University, 99
Garyeonsan-ro, Deokjin-gu, Jeonju
54887, Korea
Tel: +82-63-270-1070
Fax: +82-63-270-1594
E-mail: yssong@wku.ac.kr

Copyright © 2015 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: This study was designed to investigate the effect of Gami-cheongpyesagan-tang extract (GCST) on high fat diet-induced obesity in rats.

Methods: The mice were divided into six groups; normal diet control, high fat diet control (HFD), HFD + GCST administrated group (100, 200, and 400 mg/kg) and olistat-administrated group. Obesity was induced by high fat diet (45%) for 7 weeks in mice, and GCST was administrated orally every day for 7 weeks. The body weight, food intake, and serological markers such as total cholesterol, triglyceride, lipid contents, leptin, adiponectin and glutamic oxaloacetic transaminase/glutamic pyruvic transaminase were measured in mice. The mRNA expression of obese-associated genes such as sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c, fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase (SCD-1), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α , COA oxidase (ACO), and carnitine palmitoyltransferase (CPT-1 α) was analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction.

Results: The administration of GCST at 400 mg/kg, significantly reduced the increase of body weight and food intake as well as food efficiency compared to HFD group. GCST decreased the serum levels of triglyceride, total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol, leptin in HFD control group and inhibited lipid accumulation in liver and adipose tissues, but did not increase high-density lipoprotein-cholesterol. In the liver tissues of GCST administrated HFD group, the mRNA levels of SREBP-1c, FAS and SCD-1 were decreased and the mRNA levels of PPAR- α , ACO, and CPT-1 α were increased.

Conclusions: These results indicate that GCST could improve high fat diet induced obesity through inhibiting the hyperlipidemia in fatty Liver. It suggest that GCST may be used clinically for declining the accumulation of body fat with hyperlipidemia.

Key Words: Gami-cheongpyesagan-tang (GCST), Obesity, High fat diet, Leptin, Adiponectin, Hyperlipidemias

서론

비만은 만성 대사성질환의 원인으로 유전적, 환경적 요인과 식습관의 변화 등 다양한 원인들이 관여하는 증후군으로, 과도한 에너지 섭취로 체내대사활동으로 소비되고 남은 것이 지방조직에 중성지방으로 축적되어 발생된다. 지방조

직이 필요량 이상으로 과도하게 축적되면 정상적인 생리적 및 생화학적 기능에 영향을 미쳐 대사이상 증상을 야기한다^{1,2)}. 체내 과도한 지방의 축적 및 혈중 지질농도의 증가는 당뇨병, 고혈압, 심혈관 질환을 포함한 만성질환을 유발하게 되는 원인으로 알려져 있으며, 피하조직 이외의 부위에 축적된 복부비만은 당 및 지질대사에 장애를 초래하는 인슐린

비의존형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등의 대사성질환과 심혈관 질환의 발병률과 사망률을 증가시킨다고 보고되고 있다³⁻⁶⁾.

한의학적으로 비만은 『內經』에 “膈肉堅皮滿者肥”로 최초로 언급된 이래 肥, 肥人, 肥白人, 肌膚盛, 肥貴人, 肥胖으로 표현되어 왔으며⁷⁾, 원인은 穀氣勝元氣, 脾胃俱旺, 脾胃俱虛, 脾困邪勝, 痰飲, 氣虛, 血實氣虛, 華食, 數食甘味와 膏粱厚味가 있다고 하였다⁸⁾. 치법으로는 虛證에는 健脾, 益氣, 補腎, 溫陽, 養陰 등을 주로 활용하였고, 實證에는 祛濕, 化痰, 利水, 活血, 化痰, 疏導法 등을 주로 활용하였다^{9,10)}. 이러한 비만의 치료법에는 한약제제, 體鍼, 藥鍼, 耳鍼, 전기지방분해침, 氣功療法, 節食療法, 蒸氣療法, 추나요법 및 매선요법 등이 다양하게 이용되고 있다^{8,11)}.

비만에 대한 한방처방으로 體減薏苡仁湯, 防己黃芪湯, 防風通聖散, 實脾飲, 小青龍湯, 越鞠丸, 分心氣飲, 薏苡仁湯 및 二陳湯 등이 있으며, 사상처방으로는 太陰調胃湯, 調胃升清湯, 清心蓮子湯, 麻黃發表湯, 淸肺瀉肝湯, 寒多熱少湯 및 藿香正氣散 등에 대한 실험적 효과가 보고되었다^{7,12-14)}.

淸肺瀉肝湯은 <太陰人 肝受熱 裏熱病論>에 기재된 熱多寒少湯에 大黃을 加味한 처방으로 『東醫四象新編』¹⁵⁾에서 처음 기재된 후 太陰人の 肝熱太盛하고 肺燥太枯하여 발생하는 燥熱病證에 斂肺通便시킬 목적으로 創方되어 太陰人の 熱鬱, 鬱痰, 熱痰, 消渴, 中風, 歷節風, 燥熱症 등에 응용되어 왔다¹⁶⁾. 淸肺瀉肝湯과 관련된 연구로는 Ahn 등¹⁷⁾의 대장암 성장억제에 미치는 영향, Park 등¹⁸⁾의 혈소판응집 억제작용, Choi 등¹⁹⁾의 급성기 중풍환자에 대한 개선효과, Hong 등²⁰⁾의 세포손상에 대한 보호 효과, Jeong 등²¹⁾의 腦虛血損傷에 개선효과, Kim 등²²⁾의 CCL₄로 유발된 간 손상에 미치는 효과, Kim과 Song 등²³⁾의 면역반응과 항 알레르기 효과가 연구 보고된 바 있으며 한편 대사성질환인 당뇨²⁴⁾와 비만²⁵⁻²⁸⁾에 대하여도 유의한 효과가 있다고 보고된 바 있다. 하지만 Bae 등²⁷⁾에 의해 보고된 淸肺瀉肝湯의 장기 투여 시 체중 감소를 야기하였지만 체중 감소효과는 미약하였다. 일반적으로 淸肺瀉肝湯은 임상 통계 연구에서 급성기 중풍에 가장 많이 사용되는 처방 중 하나이며²⁹⁾, 비만효과에 대한 임상적 활용을 위해 加味처방에 대한 연구는 미흡한 상태이다.

이에 저자는 淸肺瀉肝湯을 비만과 관련질환 등을 알아보기 위하여 본 처방에 麻黃을 추가한 加味淸肺瀉肝湯을 이용하여 고지방식이 사료를 제공하여 유발되는 비만증 실험 마우스에서 체중, 혈중지질 농도 및 체내 지방축적 등에 미치는 영향의 변화를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였다. 加味淸肺瀉肝湯 (Gami-cheongpyesagan-tang, GCST)의 기본방인 淸肺瀉肝湯은 『東醫四象新編』¹⁵⁾을 기준으로 하였으며 加味淸肺瀉肝湯에 들어가는 약재는 Table 1과 같다.

2) 시약

실험동물의 비만 및 간지방증을 유도하기 위한 고지방식은 45%의 지방을 함유하는 D12451사료를 중앙실험동물 (Central Lab. Animal Inc., Seoul, Korea)에서 구입하였으며 그 구성은 Table 2와 같다. 혈청 및 간 조직 내의 지질을 분석하기 위한 시약은 (주)아산제약(Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 또한 실험동물의 혈청 내 leptin 함량을 정량하는 ELISA kit는 Enzo Life Sciences 사 (Farmingdale, NY, USA)에서, adiponectin을 분석하기 위

Table 1. Prescription of Gami-Cheongpyesagan-tang

Variable	Pharmacognostic name	Weight (g)
Herbal name		
Ge Gen	<i>Puerariae Radix</i>	16
Huang Qin	<i>Scutellariae Radix</i>	8
Gao Ben	<i>Angelicae Tenuissimae Radix</i>	8
Lai Fu Zi	<i>Raphani Semen</i>	4
Jie Geng	<i>Platycodi Radix</i>	4
Sheng Ma	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	4
Bai Zhi	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	4
Da Huang	<i>Rhei Rhizoma</i>	4
Ma Huang	<i>Ephedrae Radix</i>	8
Total amount		60

Table 2. Composition of High Fat Diet

Ingredient	Weight (g)	Calorie (kcal)*
Casein, 80 mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn starch	72.8	291
Maltodextrin 10	100	400
Sucrose	172.8	691
Cellulose, BW200	50	0
Soybean oil	25	225
Lard	177.5	1,598
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium phosphate	13	0
Calcium carbonate	5.5	0
Potassium citrate, 1 H2O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline bitartrate	2	0
FD&C RedDye #40	0.05	0
Total	858.15	4,057

*Protein 20 kcal%, carbohydrate 35 kcal%, fat 45 kcal%.

한 용도의 ELISA kit는 ALPCO사(Salem, NH, USA)에서 제조한 제품을 사용하였다. 조직 내 total RNA를 추출하기 위하여 사용한 Trizol용액 및 mRNA 분석을 위한 cDNA합성 kit는 Invitrogen (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 본 실험에 사용된 기타 시약들은 Sigma-Aldrich사(St Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다.

3) 검체 조제

加味淸肺瀉肝湯 두 접 분량(120 g)을 취하여 약 15배 부피의 증류수 1,800 ml를 가하여 100°C에서 2시간씩 2회 환류 추출한 후, 그 열수 추출물을 Whatmann paper filter로 여과하였다. 여과물을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 감압하에 농축하고 동결 건조하여 加味淸肺瀉肝湯 추출물 46.85 g을 얻었다. 加味淸肺瀉肝湯 추출물은 실험동물에게 투여하기 위해 성인 표준체중에 준하여 마우스 체중당 적정 1일 투여량을 산출하였다. 加味淸肺瀉肝湯 추출물은 실험동물에게 투여하기 위해 성인 표준체중에 준하여 마우스 체중당 적정 1일 투여량을 산출하여 加味淸肺瀉肝湯 추출물을 마우스 체중당 100, 200 및 400 mg/kg으로 정하여 사용 직전 검체를 조제하였다.

4) 실험동물

C57BL/6J계 수컷 6주령을 (주)샘타코(Samtako Inc.,

Osan, Korea)에서 구입하여 1주간 동물사육실 환경에 충분히 적응 및 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 실험 당일까지 고형사료와 음수를 자유롭게 섭취하도록 하고, 온도는 20°C±2°C와 습도 50%±10%를 유지하였다. 점등 및 소등은 12시간을 주기로 반복하였다. 본 동물실험은 동물실험윤리준칙(승인번호 CBNU 2015-0010)을 준수하며 수행되었다.

2. 방법

1) 비만유도 및 검액 투여

C57BL/6J계 수컷 마우스의 적응기간이 끝난 후 7주령이 되었을 때, 22 g 내외의 마우스를 그룹당 5마리로 난괴법에 준하여 총 6개군으로 나누어 실험을 수행하였다. 정상식이군의 사료는 오리엔트사(OrientBio, Seongnam, Korea)의 5L79사료(guaranteed analysis: crude protein, 18%; crude fat, 5%; crude fiber, 5%; ash, 8%)를 사용하였고, 고지방식이군의 사료는 마우스의 비만 및 지방간증을 유도하기 위하여 45%의 지방을 함유하는 Research diets사(New Brunswick, NJ, USA)의 D12451 사료를 사용하였다. 그룹은 일반 식이를 섭취시키는 정상식이군과 고지방식이군 및 고지방식이 + 加味淸肺瀉肝湯 100 mg/kg 투여군(ami-cheongpyesagan-tang extract [GCST] 100), 고지방식이 + 加味淸肺瀉肝湯 200 mg/kg 투여군(GCST 200), 고지방식이 + 加味淸肺瀉肝湯 400 mg/kg 투여군(GCST 400)과 양성대조군인 고지방식이 + Orlistat 20 mg/kg 투여군(Orlistat)으로 분리하였다. 고지방식은 실험시작일로부터 7주간 급여하였고, 검체는 고지방식이를 급여하는 전 기간 동안 1% carboxymethyl cellulose가 포함된 정수에 용해하여 하루 1회 동일한 시각에 경구투여하였고, 실험이 종료된 후에 실험동물을 희생하여 비만 및 지방간증 관련 지표들을 분석하였다.

2) 체중 및 식이섭취량 측정

실험동물의 체중은 1주에 1회, 식이섭취량은 주 2회 같은 시각에 저울을 이용하여 측정하였다. 식이효율은 다음과 같은 계산식에 의하여 산출하였다.

식이효율(food efficiency) (%) = 체중 증가량(g) / 식이섭

취량(g) × 100

3) 혈액 및 조직 채취

혈액 및 조직을 채취하기 위해서 실험이 종결된 후 실험 동물을 diethyl ether로 마취하여 경추 탈골법으로 희생시켰다. 그 다음 개복하여 23 gauge needle의 주사기를 이용하여 복부대정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 조직은 혈액 채취 후 간 조직 및 백색지방과 비장, 신장 조직을 생리식염수로 세척한 후 페이퍼타올에 잔여물을 제거하고 무게를 측정하였다. 간조직의 일부분은 형태학적 분석을 위하여 4% 포름알데하이드 용액으로 고정하였으며, 나머지 조직은 유전자 분석 시료로서 액체질소에 급속 동결하여 실험하기 전까지 -80°C에 보관하였다.

4) 혈청 분리 및 간 조직의 지질 추출

실험동물로부터 채취한 혈액을 상온에서 30분 동안 방치하고 3,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 간 조직에서의 지질 추출은 Folch 방법³⁰⁾에 준하여 30 mg의 간조직을 phosphate buffered saline용액에 균질화한 후 클로로포름과 메탄올을 2:1의 비율로 첨가하고 상온에서 방치한 후 원심분리하여 분리된 용액의 용매를 증발시키고, 1 ml의 isopropanol로 녹여 시료를 준비하였다.

5) 혈청 및 간 조직의 지질 함량 분석

혈청에서 중성지방(triglyceride) 및 총 콜레스테롤(total-cholesterol) 함량은 (주)아산제약에서 제공하는 아산셋트 중성지방 측정용시약과 총콜레스테롤 측정용시약을 사용하였다. 5 ml tube에 효소시액을 300 µl 분주하고 혈청 시료 2 µl를 분주하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 계산하였다. 간 조직으로부터 추출한 지질의 총 지질 함량은 Frings와 Dunn³¹⁾의 방법을 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였으며, 중성지방과 총 콜레스테롤은 혈청과 같은 방법으로 측정하였다.

6) 혈청 내 GOT 및 GPT 분석

간 손상에서의 지표표 나타내는 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase (GPT)를 측정하기 위하여 (주)아산제약의 지오티 · 지피티

(GOT · GPT) 측정용 시액을 이용하였다. GOT 측정용 기질액과 GPT 측정용 기질액 100 µl를 37°C에서 5분간 방치한 후 혈청 20 µl와 각각 혼합하여 GOT는 37°C에서 60분, GPT는 30분을 다시 방치하였다. 그 후 정색시액 100 µl와 혼합하고 실온에 20분 방치한 후 0.4 N NaOH용액 1 ml을 섞어주고 실온에서 10분간 방치한 후 505 nm에서 흡광도를 측정하여 GOT 및 GPT의 양을 산출하였다.

7) 혈청 내 leptin 함량 측정

혈청 내 leptin 함량을 측정하고자 Mouse leptin ELISA kit (Enzo Life Sciences)를 사용하였다. 혈청을 1:32의 비율로 assay buffer로 희석한 후에 plate의 각 well에 100 µl씩 분주하여 1시간 동안 반응시킨 후에 wash buffer를 이용하여 plate를 3번 세척하였다. 세척 후에 남아 있는 잔여물은 완전히 털어내고, blank를 제외한 모든 well에 antibody를 100 µl씩 분주하였으며 상온에서 다시 1시간 동안 반응시켰다. Wash buffer를 이용하여 3번 세척한 뒤 blank를 제외하고 blue conjugate를 100 µl 첨가하고 상온에서 다시 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 plate를 wash buffer로 3번 세척해주고 substrate 용액을 각 well에 100 µl씩 분주한 뒤, 30분 동안 방치시킨 후 stop solution을 100 µl 넣고 microplate reader (zeniyth 200rt; Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals-Siezenheim, Austria)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

8) 혈청 내 adiponectin 함량 측정

혈청 중의 adiponectin 함량을 측정하고자 HMW and total adiponectin ELISA kit (ALPCO)를 이용하였다. 먼저 혈청 10 µl를 Protease buffer 100 µl와 sample pretreatment buffer와 강하게 혼합하였다. 혼합액 10 µl를 dilution buffer 1 ml에 첨가하여 시료를 준비하였다. 시료 50 µl를 plate의 각 well에 분주한 후, 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 wash buffer를 사용하여 3번 세척하고, biotin이 표지된 monoclonal Ab를 각 well에 50 µl씩 분주하였다. 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후, wash buffer로 3번 세척하고 50 µl의 Enzyme이 표지된 streptavidin을 각 well에 분주하였으며 30분 동안 상온에서 반응시켰다. Wash buffer로 3번 세척한 후 substrate solution을 50 µl씩

넣어주고, 빛을 차단한 상태로 10분 동안 방치하였다. 최종적으로 50 μ l의 stop solution을 분주 후 microplate reader (zeniyth 200 rt; Anthos Labtec Instruments GmbH)를 사용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 간 조직염색(H&E)

조직학적 분석을 위하여 H&E 염색을 실시하였다. 4% 포름알데하이드 용액으로 48시간 동안 고정된 간조직을 카세트에 넣고 흐르는 물에 세척하였다. 탈수를 위해서 50, 70, 80, 90, 100% ethanol 용액을 차례로 담근 후 Xylene으로 투명화하였다. 준비된 조직을 파라핀을 침투시켜 파라핀 블록을 제작한 후 microtome으로 4 μ m의 두께로 박절하였다. 각각의 조직절편들은 Xylene으로 파라핀을 제거하여 함수과정을 거친 후 hematoxylin 시액을 1분간, eosin 시액은 3분간 처리하여 염색한 후 다시 탈수과정을 거쳐 mounting 용액으로 커버글라스를 이용하여 봉입하였다. 염색된 슬라이드의 관찰을 위해 광학현미경(CX21; Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다.

10) 복부지방 분석

실험이 종료된 후 실험동물의 전산화 단층 촬영(micro-computerized axial tomography, micro-CT)을 위하여 8 시간 동안 식이와 음수의 공급을 중단하고 마우스를 선정하여 졸레틸(zoletil) 2 mg/kg을 복강주사를 통하여 마취하였다. 마우스가 안정화된 후 보정 장치에 고정하여 실험동물용 전산화 단층 촬영장치 Skyscan-1076 micro-CT scanner (Skyscan, Aartselaar, Belgium)를 이용하여 마우스의 복부를 촬영하였다. 18 μ m pixel size와 48 kV/200 μ A의 조건에서 0.5 mm의 알루미늄 필터를 이용하여 각 슬라이드당 0.46초의 시간 동안 조사하였으며, 복부 촬영 후에 CTAn 프로그램을 이용하여 threshold 값을 전체복부는 255/50, 지방은 60/50을 지정하여 부피를 계산하고 전체복부 중의 지방이 차지하는 비율을 산출하였다.

11) 간 조직에서 total RNA 추출

-80°C에 보관된 간조직을 Trizol 용액 1 ml을 넣고 Homogenizer를 사용하여 잘 분쇄하여 혼합하였다. 혼합된 total RNA 용액을 상온에 10분간 방치한 뒤, 200 μ l의

chloroform을 넣어주고 흔들어 준 후에 3분간 상온에 반응시켰다. 그 후 12,000 rpm, 4°C 조건에서 원심분리하고, 중간 하얀 막 윗부분에 형성된 투명한 상층액을 취하여 새 1.5 ml tube에 옮긴 후, 500 μ l의 isopropanol을 첨가해 RNA를 침전시켰다. 10분 동안 다시 상온에 방치한 후 12,000 rpm, 4°C, 10분간 원심 분리하여 pellet을 제외한 나머지 용액을 제거하였다. 75% ethanol로 pellet을 세척하고 공기 중에서 두어 에탄올을 제거하였다. 건조된 RNA pellet을 20 μ l의 DEPC-treated water에 녹인 뒤, 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA량을 정량하였다.

12) Real time RT-PCR

간 조직으로부터 추출한 총 2 μ g의 total RNA로부터 cDNA를 합성하기 위해 Super script III First synthesis system kit (Invitrogen)를 이용하였다. RNA 2 μ g을 Oligo (dT)₂₀ 및 dNTP와 1.5 ml tube에 넣고 65°C에서 5분 동안 반응시킨 후에 얼음에 1분간 방치하였다. 10 $\times$ buffer와 MgCl₂, DTT, RNase 저해제 및 RTase가 혼합된 용액을 각 RNA mixture에 분주하고, 50°C에서 50분간 반응하였다. 그 후 85°C의 water bath에서 5분 동안 반응시킨 후 cDNA 합성을 종결하였다. 마지막으로 1 μ l의 RNase H를 넣고 37°C에서 20분 동안 반응하여 불필요한 RNA를 제거하였다. 합성된 cDNA로부터 지방산 합성 및 β -산화와 관련된 유전자의 발현을 확인하기 위해 각 유전자 특이적인 primer를 제작하였다. SYBR Green polymerase chain reaction (PCR) Master Mix (Life Technologies [Thermo Fisher Scientific Inc.], Waltham, MA, USA) 및 ABI real-time PCR system (Applied Biosystem Inc., Foster City, CA, USA)을 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. PCR은 95°C에서 10분 동안 초기 변성을 한 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 40 cycles 조건으로 PCR하였으며, house-keeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA 발현량으로 표준화하였다. 본 실험에서 사용된 primer의 염기서열들은 Table 3에 나타내었다.

13) 통계분석

실험을 통해 얻은 모든 수치들은 mean $\pm$ standard error

Table 3. Sequences and Product Size of Primers for Real-Time Polymerase Chain Reaction

Gene	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')	Product size (bp)
SREBP-1c	CTTCTGGAGACATCGCAAC	GGTAGACAACAGCCGCATC	278
SCD-1	TCGCCCCTACGACAAGAACA	CCGGTCGTAAGCCAGGCCCA	190
FAS	GCGGTGTGAAAACGAACCTT	CTGTCTGGGCATAACGGTCT	119
PPAR- α	GCAGTGGAAGAATCGGACCT	CAACCCGCCCTTTTGTCTATAC	121
ACO	TCCAGACTTCCAACATGAGGA	CTGGGCGTAGGTGCCAATTA	286
CPT-1 α	GATGTTCTTCGTCTGGCTTGA	CTTATCGTGGTGGTGGGTGT	126
GAPDH	CATGGCCTTCCGTGTTT	CCTGGTCCTCAGTGTAGC	152

SREBP-1c: sterol regulatory element-binding protein-1c, SCD-1: stearoyl-CaP desaturase, FAS: fatty acid synthase, PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor, ACO: acyl CoA oxidase, CPT-1 α : carnitine palmitoyltransferase-1 α , GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

of mean 값으로 표시하였으며, 통계분석을 위해 GraphPad Prism software ver. 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) 프로그램을 사용하였다. 대조군과 실험군의 차이를 검증하고자 t-test를 실시하였고, P-value는 0.05 이하인 값을 기준으로 유의성을 판정하였다.

결 과

1. 고지방식이 마우스의 체중, 식이효율, 백색지방 및 간 조직의 무게에 미치는 영향

고지방식이 마우스에서 加味清肺瀉肝湯 (GCST)이 체중 증가에 미치는 영향을 조사하였다. 실험동물 그룹은 정상식이군, 고지방식이군, 고지방식이군에 加味清肺瀉肝湯 100 mg/kg 투여군, 加味清肺瀉肝湯 200 mg/kg 투여군 (GCST 200), 加味清肺瀉肝湯 400 mg/kg 투여군 및 양성대조군으로 고지방식이군에 Orlistat 20 mg/kg 투여군 (n=5)으로 나누고, 고지방식이를 제공하는 7주간 매일 1회 GCST를 경구 투여하면서 체중 변화를 측정하였다.

7주 동안 고지방식이를 섭취시킨 고지방식이군에서는 체중 증가량이 13.0 ± 1.13 g으로 정상식이군의 체중 증가량 5.4 ± 0.95 g에 비해 현저하게 증가한 것으로 나타났다. 고지방식이와 함께 GCST를 100 및 200 mg/kg 투여한 군에서는 각각 11.8 ± 1.34 g, 10.3 ± 2.10 g, 400 mg/kg 투여군에서는 9.5 ± 0.48 g으로 양성대조군인 Orlistat 투여군과 비슷한 수준으로 대조군에 비해 유의하게 체중 증가량이 감소하였다 ($P < 0.05$). 따라서 GCST는 투여농도 의존적으로 고지방식이에 의한 체중 증가를 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 1A).

고지방식이 마우스의 체중 증가에 밀접한 관련이 있는 1일 식이효율을 조사하였다. 그 결과, 정상식이군의 식이효율은 $3.35\% \pm 0.59\%$, 고지방식이군은 $10.62\% \pm 0.92\%$ 로 고지방식이 후 식이효율이 현저히 증가하는 것으로 나타났다. 고지방식이와 함께 GCST를 100 및 200 mg/kg 용량으로 투여한 군은 각각 $10.82\% \pm 1.22\%$, $9.50\% \pm 1.94\%$ 로 유의한 차이는 보이지 않았으나 400 mg/kg 투여군에서는 $8.53\% \pm 1.94\%$ 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 ($P < 0.05$) (Fig. 1B).

체내의 장기적인 에너지 저장 기능을 가지고 있는 백색지방조직과 간조직에서의 지방축적에 대한 GCST의 효과를 조사하였다. 그 결과, 고지방식이군은 정상식이군에 비하여 1.971 ± 0.197 g으로 백색지방의 무게가 74% 증가된 것으로 나타났다. GCST 100 mg/kg 투여군은 1.858 ± 0.132 g, GCST 200 mg/kg 투여군 1.611 ± 0.342 g, 400 mg/kg 투여군은 1.453 ± 0.084 g으로, 특히 400 mg/kg 투여군에서 고지방식이군과 비교하여 백색지방조직의 무게가 26% 감소하여 유의적인 감소를 나타내었다 ($P < 0.05$), 한편 양성대조군인 Orlistat 투여군은 1.331 ± 0.132 g을 나타내어 대조군에 비해 32% 감소함으로써 의한 감소 효과를 나타내었다 ($P < 0.05$).

간조직의 무게는 정상식이군에 비하여 고지방식이군에서 20%가 증가되어 1.119 ± 0.104 g을 나타내었으며, GCST 100 mg/kg 투여군이 1.01 ± 0.072 g, 200 mg/kg 투여군 0.913 ± 0.047 g, 400 mg/kg 투여군은 0.885 ± 0.021 g으로 유의적인 감소를 나타내었다 (Fig. 1C-1, C-2).

Fig. 1. (A) Effect of GCST on body weight gain in high fat diet induced obesity mice. Data are shown as means $\pm$ standard errors of mean (SEM) (n=5). *P<0.05 vs. HFD control group. (B) Effect of GCST on food efficiency in high fat diet induced obesity mice. Data are shown as means $\pm$ SEM (n=5). *P<0.05, †P<0.01 vs. HFD control group. (C) Effect of GCST on white adipose tissue (WAT) and liver weight in high fat diet-induced obesity mice. Data are shown as means $\pm$ SEM (n=5). *P<0.05 vs. HFD control group. ND: normal diet, HFD: high fat diet, GCST: Gami-cheongpyesagan-tang.

2. 혈청 내 triglyceride, total-cholesterol, HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol에 미치는 영향

GCST가 고지방식이로 인한 마우스의 혈청 내 중성지방 증가에 대하여 감소 효과가 있는지 조사하였다. 실험동물의 혈청에서 중성지방을 측정한 결과, 정상식이군보다 고지방식이군에서 35%가 증가된 151.52 ± 11.39 mg/dl를 나타내었다. 혈청 내 중성지방의 함량은 GCST 투여군 중 GCST 100 및 200군에서는 고지방식이군과 유의한 차이가 없었으며, GCST 400군에서는 고지방식이군에 비해 21%가 감소된 118.94 ± 13.56 mg/dl로 측정되어 유의한 억제효과가 나타났다(P<0.05). 양성대조군 Orlistat군은 43%가 감소한 86.11 ± 6.16 mg/dl를 나타내어 고지방식이로 유도된 혈청 내 중성지방의 증가를 유의하게(P<0.01) 억제하였다(Fig. 2A).

GCST가 고지방식이로 인한 마우스의 혈청 내 총 콜레스테롤 증가에 대하여 감소 효과가 있는지 조사하였다. 고지

방식이군의 혈청 내 총 콜레스테롤 함량은 112.74 ± 5.49 mg/dl로 정상식이군 83.27 ± 3.55 mg/dl에 비하여 26%가 상승하였다. 혈청 내 콜레스테롤 함량은 GCST 투여군 중 GCST 100 및 200군에서는 고지방식이군과 유의한 차이가 없었으며, GCST 400군에서 20%가 감소한 90.63 ± 7.48 mg/dl의 농도를 나타내어 유의한 억제 효과를 보였다(P<0.05). 양성대조군인 Orlistat군은 72.81 ± 1.88 mg/dl로 나타나 고지방식이로 인한 혈청 내 총 콜레스테롤 증가를 유의하게(P<0.01) 감소시켰다(Fig. 2B).

GCST가 고지방식이로 인한 마우스의 혈청 내 high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol 감소에 대하여 증가 효과가 있는지 조사하였다. 정상식이군의 HDL-cholesterol 함량은 36.29 ± 5.93 mg/dl이며, 고지방식이군에서 32.39 ± 3.08 mg/dl를 나타내어 약 12% 감소하였다. GCST 100과 200, 400군에서는 각각 32.68 ± 3.99 , 34.63 ± 3.68 , 34.39 ± 4.33 mg/dl로 GCST를 실험동물에 투여함으

Fig. 2. (A) Effect of GCST on serum triglyceride levels in high fat diet-fed mice. Data are shown as means $\pm$ standard errors of mean (SEM) (n=5). * $P < 0.05$, $^{\dagger}P < 0.01$ vs. HFD group. (B) Effect of GCST on serum total cholesterol levels in high fat diet-fed mice. Data are shown as means $\pm$ SEM (n=5). * $P < 0.05$, $^{\dagger}P < 0.01$ vs. HFD group. (C) Effect of GCST on serum high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol levels in high fat diet-fed mice. Data are shown as means $\pm$ SEM (n=5). (D) Effect of GCST on serum low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels in high fat diet-fed mice. Data are shown as means $\pm$ SEM (n=5). * $P < 0.05$ vs. HFD group. ND: normal diet, HFD: high fat diet, GCST: Gami-cheongpyesagan-tang.

로써 혈청 내 HDL-cholesterol의 농도가 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의성은 없었다. Orlistat군 또한 HDL-cholesterol에서는 고지방식이군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 2C).

GCST가 고지방식으로 인한 마우스의 혈청 내 low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol 증가에 대하여 감소 효과가 있는지 조사하였다. 고지방식이군의 혈청 내 LDL-cholesterol은 46.01 ± 7.06 mg/dl로 정상식이군의 27.26 ± 6.32 mg/dl에 비해 41% 증가하였다. GCST 투여군인 GCST 100 및 200군에서는 고지방식이군과 유의한 차이가 없었으나, GCST 400군에서는 29%가 감소하여 유의하게 억제하였다($P < 0.05$). 양성대조군인 Orlistat군에서도 21.69 ± 3.32 mg/dl를 나타내어 고지방식으로 인한 혈청 내 LDL-cholesterol에 대해 유의한($P < 0.05$) 억제효과를 나타내었다(Fig. 2D).

3. 혈청 내 leptin, adiponectin에 미치는 영향

비만증과 밀접한 대사조절 호르몬인 leptin의 혈중 농도를 살펴보고자 GCST가 고지방식으로 인한 마우스의 혈청 내 leptin의 혈중 농도변화에 미치는 영향을 조사하였다. 고지방식이군의 혈청 내 leptin 함량은 169.27 ± 12.61 pg/ml를 나타내어 정상식이군의 83.61 ± 1.89 pg/ml에 비하여 51% 상승하여 유의하게 증가하였다. GCST 투여군인 GCST 100, 200, 400군은 각각 11%, 30%, 36% 감소한 수치인 150.70 ± 16.53 , 118.56 ± 13.95 , 108.36 ± 6.24 pg/ml를 나타내어 투여 농도의존적으로 고지방식으로 유도된 혈청 내 leptin 농도를 억제하는 것을 확인하였으며, 특히 GCST 400군은 양성대조군인 Orlistat군보다 더 유의한($P < 0.01$) 억제효과를 나타내어 현저한 감소 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 3A).

GCST가 고지방식이를 섭취한 비만마우스의 혈청 내 adiponectin의 혈중 농도변화에 미치는 영향을 조사하였다. 정상식이군의 혈청 내 adiponectin 농도는 90.41 ± 2.51

Fig. 3. (A) Effect of GCST on serum leptin levels in high fat diet-fed mice. Data are shown as means $\pm$ standard errors of mean (SEM) (n=5). (B) Effect of GCST on serum adiponectin levels in high fat diet-fed mice. Data are shown as means $\pm$ SEM (n=5). *P < 0.05, †P < 0.01 vs. HFD group. ND: normal diet, HFD: high fat diet, GCST: Gami-cheongpyesagan-tang.

Fig. 4. Effect of GCST on serum glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) levels in high fat diet-fed mice. Data are shown as means $\pm$ standard errors of mean (n=5). ND: normal diet, HFD: high fat diet, GCST: Gami-cheongpyesagan-tang.

μg/ml인 것에 비하여 고지방식이군은 64.36 ± 5.18 μg/ml를 나타내어 약 40% 감소하였다. GCST 투여군 중 GCST 100군에서는 고지방식이군과 유의한 차이가 없었지만 GCST 200 및 400군은 각각 23%, 32% 증가한 수치인 79.02 ± 1.45 , 84.82 ± 2.23 μg/ml를 나타내어 유의한(P < 0.05) 증가를 보였다(Fig. 3B).

4. 혈청 내 GOT 및 GPT에 미치는 영향

간 조직 손상 및 감염으로 나타나는 간 기능 이상을 확인하는 일반적인 방법으로 GOT와 GPT 등의 혈중 함량을 측정하여, GCST가 고지방식이 마우스의 혈청 내 GOT 및 GPT의 혈중 농도 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 고지방식이군의 GOT 및 GPT를 분석한 결과, 40.25 ± 4.35 IU/L와 23.11 ± 3.00 IU/L로 정상식이군에 비하여 유의하게 증가하였다. 고지방식이와 함께 GCST를 투여한 군인

GCST 100, 200, 400군은 GOT가 각각 36.57 ± 6.47 , 36.61 ± 10.16 , 38.10 ± 12.11 IU/L를 나타내어 고지방식이군에 비해 감소하는 경향을 나타냈으나 통계적으로 유의하지 않았다. GPT는 GCST 100, 200, 400군이 각각 22.58 ± 2.08 , 23.09 ± 4.99 , 23.23 ± 5.42 IU/L로 고지방식이군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

5. 복부지방 축적에 미치는 영향

GCST가 고지방식이 마우스의 복부지방 축적에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 마우스의 복부를 micro-CT로 촬영하여 각 군의 지방 부피를 측정된 결과, 정상식이군에 비하여 고지방식이군의 복부 지방의 부피는 35% 증가한 수치를 나타내어 유의한 증가를 보였다(P < 0.05). 고지방 식이와 함께 GCST를 투여한 군 중 GCST 100 및 200군은 고지방식이군과 복부 지방 부피에 대하여 유의한 차이가 없었으

나 GCST 400군에서는 11%로 유의하게($P<0.05$) 감소되었다(Fig. 5).

6. 지질축적에 대한 간 조직 형태 변화에 미치는 영향

GCST가 고지방식이 마우스의 지질축적에 대한 간 조직 형태 변화에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 고지방식이 섭취에서 동반되는 간 크기와 무게의 증가는 간조직의 지방 축적에 기인한다. 정상식이군의 간 조직은 세포의 밀집도가 크고 지방구가 거의 관찰되지 않고 붉은색을 띠는 반면 고지방식이군의 간 조직에서는 지방구의 크기 및 개수가 현저히 증가하였으며, 조직 전체적으로 퍼져있는 양상을 나타내어 고지방식이로 인한 전형적인 비알코올성 지방간의 형태

를 보였다. GCST 투여군에서는 투여농도 의존적으로 지방구가 감소하여 지방간 형태를 개선하는 것으로 나타났으며 양성대조군인 Orlistat군에서는 거의 정상식이군에 가깝게 간 조직에서 지방 형성이 나타나지 않았다(Fig. 6).

7. 간 조직 내 total lipid, triglyceride, total-cholesterol 함량에 미치는 영향

GCST가 고지방식이 마우스의 간 조직 내 total lipid 함량에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 실험동물 간조직의 총 지질을 추출하여 측정된 결과, 고지방식이군은 113.16 ± 13.91 mg/g으로 측정되어 정상식이군의 함량 55.34 ± 7.89 mg/g에 비해 약 51%가 증가되었다. 고지방식이와 함께

Fig. 5. Effect of GCST on fat mass in high fat diet-fed mice. Data are shown as means $\pm$ standard errors of mean ($n=5$). * $P<0.05$, † $P<0.01$ vs. HFD group. ND: normal diet, HFD: high fat diet, GCST: Gami-cheongpyesagan-tang.

Fig. 6. Effect of GCST on hepatic lipid accumulation in high fat diet-fed mice using H&E staining ($\times 100$). That arrows mean hepatocytes and fat globules. ND: normal diet, HFD: high fat diet, GCST: Gami-cheongpyesagan-tang.

GCST를 투여한 군 중 GCST 100 및 200군은 각각 11, 21%가 감소된 100.64 ± 19.94 , 89.28 ± 19.50 mg/g을 나타내었지만 통계적 유의성은 없었고, 특히 GCST 400군은 72.16 ± 14.66 mg/g으로 36%의 총 지질 함량이 감소되어 유의하게($P < 0.05$) 간 조직 내의 총 지질함량을 감소시켰다(Fig. 7A).

GCST가 고지방식이 마우스의 간 조직 내 triglyceride 함량에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 간 조직 내의 중성지방의 함량을 측정한 결과, 고지방식이군은 60.51 ± 8.31 mg/g으로 정상식이군의 함량 29.28 ± 4.14 mg/g과 비교하여 52% 증가한 수치를 나타내었다. 고지방식이와 함께 GCST를 투여한 군에서는 GCST 100 및 200군은 각각 3, 30%가 감소된 58.70 ± 4.80 , 42.36 ± 5.77 mg/g을 나타내었으며, GCST 400군에서는 37%가 감소된 38.06 ± 3.20 mg/g의 함량으로 고지방식이군에 비해 유의하게($P < 0.05$) 간 조직 내 중성지방의 함량을 감소시켰다(Fig. 7B).

GCST가 고지방식이 마우스의 간 조직 내 total-cholesterol 함량에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 간 조직 내의 총 콜레스테롤 함량을 측정한 결과, 고지방식이군은 4.92 ± 0.72 mg/g으로 정상식이군의 함량 1.84 ± 0.46 mg/g에 비하여 63% 증가하였다. 고지방식이와 함께 GCST를 투여한 군인 GCST 100 및 200군에서는 각각 4.94 ± 0.48 mg/g과 3.60 ± 0.47 mg/g을 나타내어 고지방식이군과 유의한 차이가 없었다. 그러나 GCST 400군에서는 61%가 감소된 1.93 ± 0.29 mg/g의 수치로 나타나 간 조직 내 총 콜레스테롤을 유의하게 감소시켰으며($P < 0.01$),

양성대조군인 Orlistat군과 비슷한 수준까지 감소되어 유의한 총 콜레스테롤 축적 억제효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 7C).

8. 간 조직 내 지방산 합성 및 β -산화 관련 유전자의 발현에 미치는 영향

GCST가 고지방식이 마우스의 간 조직 내 지방산 합성관련 유전자인 sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CaP desaturase (SCD-1) 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 지방산 합성을 조절하는 주요 전사인자 중 하나인 SREBP-1c는 정상식이군보다 고지방식이군의 간 조직에서 약 6배 유의하게 증가하였으며, FAS 및 SCD-1 또한 각각 8배, 6배 mRNA 발현이 현저히 증가되었다. 고지방식이와 함께 GCST를 투여한 GCST 100 및 200군에서는 고지방식이군과 SREBP-1c 및 FAS, SCD-1의 mRNA 발현에 유의한 차이가 없었으나, GCST 400군에서는 지방산 합성관련 유전자인 SREBP-1c ($P < 0.05$), FAS ($P < 0.05$), SCD-1 ($P < 0.01$) 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 8A).

GCST가 고지방식이 마우스의 간 조직 내 지방산의 β -산화 관련 유전자인 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- α), acyl CoA oxidase (ACO), carnitine palmitoyltransferase-1 α (CPT-1 α) 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 지방산의 β -산화 관련 유전자 중 대표적인 유전자인 PPAR- α 는 정상식이군보다 고지방식이군에서 60% 감소하였으며, ACO 및 CPT-1 α 도 각각 52%, 61%가 감소

Fig. 7. (A) Effect of GCST on hepatic total lipid content in high fat diet-fed mice. Data are shown as means $\pm$ standard errors of mean (SEM) ($n=5$). * $P < 0.05$ vs. HFD group. (B) Effect of GCST on hepatic triglyceride content in high fat diet-fed mice. Data are shown as means $\pm$ SEM ($n=5$). * $P < 0.05$ vs. HFD group. (C) Effect of GCST on hepatic total cholesterol content in high fat diet-fed mice. Data are shown as means $\pm$ SEM ($n=5$). † $P < 0.01$ vs. HFD group. ND: normal diet, HFD: high fat diet, GCST: Gami-cheongpyesagan-tang.

Fig. 8. (A) Effect of GCST on hepatic mRNA expression of lipogenesis-related genes in high fat diet-fed mice using real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis. Data are shown as means $\pm$ standard errors of mean (SEM) (n=5). *P < 0.05, †P < 0.01 vs. HFD group. (B) Effect of GCST on hepatic mRNA expression of β -oxidation-related genes in high fat diet-fed mice using real-time PCR analysis. Data are shown as means $\pm$ SEM (n=5). *P < 0.05 vs. HFD group. ND: normal diet, HFD: high fat diet, GCST: Gami-cheongpyesagan-tang, SREBP-1c: sterol regulatory element-binding protein-1c, PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor, FAS: fatty acid synthase, ACO: acyl CoA oxidase, SCD-1: stearoyl-CoA desaturase, CPT-1 α : carnitine palmitoyltransferase-1 α .

한 수준으로 mRNA 발현이 저해되었다. 고지방식이와 함께 GCST를 투여한 GCST 100 및 200군에서는 고지방식이 군과 PPAR- α 및 ACO, CPT-1 α 의 mRNA 발현에 유의한 차이가 없었으나 GCST 400군에서는 지방산 β -산화 관련 유전자인 PPAR- α , ACO, CPT-1 α 의 발현이 유의하게(P < 0.05) 증가하였다(Fig. 8B).

고 찰

비만은 만성 대사성질환의 유발빈도를 증가시키는 대표

적인 원인으로 당뇨병, 고지혈증, 고혈압 및 관상동맥 질환 등의 합병증과 밀접한 상관관계가 있어 광범위하고 심각한 건강상의 문제를 초래하고 있으며 사망률이 높다⁵⁾. 서양의 학에서는 비만증의 원인을 과식, 잘못된 식사습관, 운동부족, 유전, 인슐린 분비과잉, 지방세포의 증식과 비대 등으로 보고 있다. 그 외에 갑상선 기능저하증, 포만중추의 손상, 성선자극호르몬 분비저하증, 부신피질 스테로이드의 장기 사용에 따른 약물부작용 등을 원인으로 볼 수 있다¹⁾. 현재 우리나라에서 체중 감량을 위해 장기간 사용이 허가된 약제는 지방질 분해 효소인 lipase 억제제인 올리스타트

(orlistat)뿐이고, 단기간 사용이 허가된 약제로는 중추신경계에 작용하여 식욕을 억제 하는 펜터민(phentermine), 디에틸프로피온(diethylpropion), 펜디메트라진(phendimetrazine), 마진돌(mazindol)이 있다³²⁾. 그러나 이들은 서양인에 비해 탄수화물을 주로 섭취하고 있어 한국인의 체질에 적합하지 않고 치료효과 대비 부작용이 커서 최근 사용이 금지되었다³³⁾. 이러한 이유로 천연물로부터 비만 치료제제를 얻어내려는 추세가 증가하고 있으며 특히 한약재를 비만에 이용하려는 시도가 많이 증가하였다. 최근 연구를 통해 비만에 효과적인 약재로 人蔘, 桔梗, 冬瓜子, 熟地黄, 大黃, 枸杞子, 蒼朮 등과³⁴⁾, 한약혼합제제의 연구가 보고되어 있다³⁵⁾.

한의학에서 비만의 형태에 대한 언급은 『靈樞衛氣失常篇』에서 肥人, 膏人, 肉人의 구분을 한 것이 처음인데, 肥膏肉의 형태적 구분으로 사람의 肥瘦大小와 血氣多少를 구분한다고 하였다. 오늘날의 肥滿은 그 중 肥人과 膏人에 해당한다고 볼 수 있다. 한의학에서 비만의 원인은 脾, 肝, 腎의 부조화로 인하여 유발되는 氣虛, 脾虛, 腎虛, 脾胃實熱, 肝氣鬱滯, 氣滯血瘀, 食積痰飲, 脾濕痰濁, 多痰 등으로 분류하고 있으며⁸⁾, 비만증의 변증은 肝鬱, 食積, 脾虛, 痰飲, 瘀血 등의 6개의 유형으로 한방비만 임상에서 가장 많이 쓰이는 변증으로 나타났다³⁶⁾. 또한 변증별 치료법으로 脾虛에는 健脾利濕, 肝鬱에는 疎肝利氣, 胃熱에는 淸熱利濕, 瘀血에는 利氣活血, 痰飲에는 健脾化痰, 陽虛에는 溫腎健脾하는 치료법이 이용되며, 비만의 치료에 많이 이용되는 한약처방 중에는 부기를 빼주는 이뇨효과가 있는 성분과 식욕을 억제하거나 에너지 소비를 증가시키는 약재들이 비만환자의 체지방 조절에 사용되고 있다³⁷⁾.

본 연구에서 이용된 加味淸肺瀉肝湯은 葛根, 黃芩, 藁本, 蘿蔔子, 桔梗, 升麻, 白芷, 大黃을 함유하는 淸肺瀉肝湯 기본처방에 麻黃 8 g을 추가하여 8가지 약재로 구성되어 있다. 加味淸肺瀉肝湯에 포함되는 약재 중 葛根은 發表解肌, 透發麻疹, 升陽止瀉 生津止渴의 효능을 갖고 있으며, 黃芩은 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 止血安胎의 효능을 갖고 있으며, 藁本是 發表散寒, 祛風勝濕, 止痛 등 효능을 갖고 있으며, 蘿蔔子是 降氣祛痰, 行滯消食的 효능을 갖고 있어 食積不和, 中焦氣滯로 인한 胃脘痞滿, 噯氣吞酸, 腹痛泄瀉, 裏急後重 등의 병증을 다스린다. 桔梗은 宣肺祛痰, 利

咽排膿 등의 효능을 갖고 있으며, 升麻는 解表透疹, 淸熱解毒, 升舉陽氣 등의 효능을 갖고 있으며, 白芷는 祛風除濕, 消腫排膿, 通竅止痛 등의 효능을 갖고 있으며, 大黃은 功積導滯, 瀉火解毒, 行瘀通經. 淸利濕熱 등의 효능을 갖는다. 加味약재인 麻黃은 肺와 膀胱으로 귀경하며 發汗解表, 宣肺定喘, 利水通淋, 溫散寒邪 등의 효능이 있고 보고되었다³⁸⁾. 淸肺瀉肝湯은 太陰人의 肝熱太盛하고 肺燥太枯하여 발생하는 燥熱病證에 斂肺通便시킬 목적으로 創方되어 太陰人의 熱鬱, 鬱痰, 熱痰, 消渴, 中風, 歷節風, 燥熱症 등에 응용되어 왔다¹⁶⁾. 사상의학에서 太陰人은 가장 체격이 크고 肌肉이 풍부하며, 肝大肺小한 성질로 吸聚之氣가 크고 呼散之氣가 부족하여 쉽게 비만해질 수 있고, 실제로 비만과 관계있는 체지방량, 체지방률, 복부지방률, 체질량지수(body mass index) 등의 항목에서 사상체질 중 태음인이 가장 유의성 있게 높게 나타나 太陰人이 비만체형과 가장 상관성이 있다고 볼 수 있다³⁹⁾. 이에 저자는 태음인의 비만한 체형과 관련하여 비만처방에 있어서 태음인 사상처방을 응용하고자 太陰人 비만을 肝大肺小하여 吸聚之氣가 강하고 呼散之氣가 부족하여 발생하는 太陰人 裏病症의 肝燥熱 증상으로 보아 發汗解表, 宣肺定喘, 利水通淋, 溫散寒邪 등의 효능이 있는 麻黃을 加味한 加味淸肺瀉肝湯을 비만치료에 효과적이라 추론하였다.

淸肺瀉肝湯의 항 비만연구를 살펴보면 Song 등²⁵⁾ 절식요법 시행 후 체지방률을 감소시키고 근육량 및 기초대사량을 유의하게 증가시켰다고 보고하였고, Bae 등²⁷⁾은 비만유도 흰쥐에서 체중, 장기 및 지방조직의 무게, 혈중지질농도, leptin, 인슐린 농도를 유의하게 감소시키고 및 UCP2 발현량을 증가시켰다고 보고하였다. 그러나 일반적 적정 약물투여기간이 4주 이상으로 볼 때 6주간의 투여 후 항 비만효과는 관찰되지 않았으며 8주 이상 장기투여 시 체중 감소 효과를 보였다는 것은 비만치료제로 활용하기에 효과가 미약하다고 생각되어 본 연구에서는 7주간의 투여로 결과를 확인하였으며, 지방산의 산화 및 합성 관련 유전자를 분석하여 비만기전에 대해 연구하였다. 비만치료에 사용되는 약재로는 일반적으로 부기를 빼주는 이뇨효과가 있는 성분과 식욕을 억제하거나 에너지 소비를 증가시키는 약재들이 사용되고 있으며 그 중에 麻黃이 가장 빈도가 높다¹⁴⁾. 麻黃에는 ephedrine과 d-pseudoephedrine 등의 성분이 함유되어 주

로 교감신경 자극을 통한 심혈관계, 기관지와 위장관의 평활근, 중추신경의 adrenergic effect로 인한 것이며, 이노작용, 혈관수축작용 및 열생산촉진제로서 주로 효과가 나타나고 風水浮腫에 사용된다고 알려져 있다^{40,41)}.

이에 저자는 淸肺瀉肝湯에 麻黃을 가미하여 비만증의 체지방 감소 및 비만과 동반되는 지방간, 고지혈증에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 고지방식이로 유발된 비만 마우스의 체중의 경우 정상식이군에 비교하여 체중 증가를 보였으며, 고지방식이 대조군과 비교해서 GCST 200과 400 mg/kg를 투여한 실험군에서 유의적으로 감소하였다. 식이효율의 경우 고지방식이를 제공한 마우스는 정상식이군에 비교하여 높은 식이효율을 보였으며, GCST 100 및 200 mg/kg 투여군은 고지방식이군과 식이효율에 대하여 유의한 차이가 없었으나 400 mg/kg 투여군에서는 현저하게 감소되었다. 식이이용률은 식이섭취량에 대한 체중 증가량으로 식이효율이 낮다는 것은 같은 양의 식이를 섭취하더라도 체중 증가가 적다는 것을 의미한다. 이 결과로써 加味淸肺瀉肝湯 투여가 고지방식이 마우스의 체중증가를 농도 의존적으로 억제하는 효과가 있으며, 식이효율을 감소시키는 효과를 확인하였다. 한편 혈청 중 triglyceride와 total cholesterol 함량이 증가의 변화는 비만의 유무를 판단할 수 있는 근거가 될 수 있다⁵⁾. 고지방식이를 섭취한 마우스는 정상식이군에 비하여 혈청 중 triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol의 함량이 증가하고 HDL-cholesterol 함량이 감소하였으며, 고지방식이 대조군과 비교해서 GCST 400 mg/kg 경구투여한 실험군에서만 혈청 중 triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol 함량이 유의적으로 감소하였다. 그러나 혈청 중 HDL-cholesterol 함량은 고지방식이 대조군과 유의한 차이가 없는 것을 확인하였다. 본 연구결과와 유사하게 Kim 등⁴²⁾은 태음조위탕가미방에서 비만 예방 및 치료효과에 대해 보고하였는데, 麻黃을 가미한 처방에서 체중 및 혈중 지질함량을 감소시키는 효과가 높아진다고 보고하였다.

Triglyceride는 전신 조직의 주성분으로 체내 에너지저장에 관여하며, total cholesterol은 인지질(phospholipid)과 함께 세포막의 성분으로 그리고 각종 호르몬 생산의 원료나 담즙산의 전구체로 중요한 지질이며, 대부분은 간에서 합성되지만 동맥경화증, 당뇨병, 신장질환, 췌장염, 갑상선 기능

저하증 등에서 높은 수치를 나타낸다. LDL-cholesterol은 혈청 콜레스테롤의 2/3를 운반하는데 주로 간에서 말초로 콜레스테롤을 운반하는 저밀도 지질단백이며, HDL-cholesterol은 지질단백 중 가장 큰 비중을 차지하며 간 및 소장에서 합성되어 혈중으로 유출되거나 담즙산으로서 장관으로 배설되고 다시 장을 통해 흡수된다⁴³⁾. HDL-cholesterol은 항동맥경화작용이 있어서 관상동맥질환의 방어인자로서 중요하며, 저HDL콜레스테롤혈증은 관상동맥질환의 중요한 위험인자이다. 비만성 고지혈증은 고중성지방성 고지혈증과 함께 각종 성인병의 주요 원인으로 인식되어 왔다. 고지혈증, 비만, 당뇨병, 담석증에서 흔히 혈중 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도가 증가하며 반면 HDL-콜레스테롤 혈중농도는 감소하는 경향을 보이게 되며, 혈중 HDL 농도가 감소하면 관상동맥질환 발생 위험 신호가 된다⁴⁴⁾. 따라서 加味淸肺瀉肝湯은 혈중지질 함량을 감소시켜 비만으로 야기되는 고지혈증 및 관상동맥질환을 낮추는 효과가 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서 고지방식이를 제공한 마우스에서 지방조직 및 간조직의 무게 및 지방축적수준을 측정한 결과 고지방식이 대조군에 비교하여 GCST 100 및 200 mg/kg 투여군은 고지방식이군과 백색지방 및 간무게에 대하여 유의한 차이가 없었으나 400 mg/kg 투여군에서 유의하게 감소되었다. 특히 micro-CT를 통해 복부 지방의 부피를 계산하여 체지방 정도를 측정하였을 때, 고지방식이군이 정상식이군과 비교하여 35% 증가하였으며, 고지방식이 대조군에 비교하여 GCST 100 및 200 mg/kg 투여군들은 고지방식이군과 복부 지방 부피에 대하여 유의한 차이가 없었으나 400 mg/kg 투여군에서는 11%가 감소되어 유의하게 감소되었다. 한편 간조직 중의 총지질, triglyceride, total cholesterol 함량이 정상식이군과 비교하여 고지방식이 대조군의 간조직에서 지방공포가 증가하며, 총 지질량, 중성지방, 총 콜레스테롤 함량이 현저히 증가를 보였다. GCST 투여군에서는 400 mg/kg 투여군에서 간 조직의 지방공포가 뚜렷이 감소하였으며, 간 조직 내의 총 지질, 중성지방, 총 콜레스테롤 함량이 유의적으로 감소하였다. 비만도 평가는 다양한 방법을 적용하고 있다. 일반적으로 비만은 사람에 따라 체중 증가보다 체지방의 증가, 특히 지방간 및 복강 내 축적되는 지방조직의 증가는 건강상으로 더 위험요인이 될 수 있다고 알

려져 있다³⁾. 고지방식이 섭취할 경우 간 조직 지방조직 및 근육조직에서 지방이 축적된다. 체지방은 형태나 작용에 따라 백색지방조직과 갈색지방조직으로 구분되는데, 부고환에 위치하는 백색지방조직은 주로 체내 잉여에너지를 지방으로 저장하며, 경부와 견갑부에 있는 갈색지방은 열을 생산하는 기능을 한다고 알려져 있으며⁴⁵⁾, 백색지방 증량이 증가할수록 체중이 늘게 된다. 한편 복부 백색지방조직에서는 염증반응이 동반될 수 있으며, 지방조직을 중심으로 대식세포수가 증가하고, 활성화된 대식세포와 지방세포에서 염증유발 cytokines의 분비가 증가하여 비만에 동반된 인슐린 저항성을 유발한다는 가설이 제기되고 있다⁴⁶⁾. 이와 같이 加味清肺瀉肝湯 투여로 인해 백색지방조직과 간 조직에서 지방축적이 감소한다는 결과는 인슐린 저항성을 개선할 수 있을 것으로 생각된다.

최근 지방세포가 단순한 지방의 저장 장소이면서 아디포넥틴, 렙틴 및 다양한 염증성물질들을 분비하는 내분비기관의 하나로 간주되면서 이들의 생체 내 기능과 비만 및 이와 관련된 대사 질환의 연관성을 밝히는 연구가 활발하다⁴⁷⁾. 아디포넥틴은 혈당강하, 항염증, 항동맥경화작용 등의 긍정적인 효과를 보이는 유일한 사이토카인으로서 비만 또는 인슐린 저항성 당뇨병이 심할수록 감소하고 심혈관 질환의 발생기전에 관여한다고 알려져 있으며, 아디포넥틴이 간과 근육에 직접 작용하여 인슐린 저항성을 개선시키는 것으로 추론되고 있다^{48,49)}. 렙틴은 지방세포에서 분비되는 호르몬으로 식욕을 억제하고 포만감을 느끼게 하여 에너지 대사를 조절하며 인슐린 저항성과 체지방량과 밀접한 관련이 있다⁵⁰⁾. 비만 환자에서는 아디포넥틴의 감소와 렙틴의 증가가 관찰되며 최근에는 렙틴 대 아디포넥틴의 비가 비만 및 2형 당뇨병 환자에서의 동맥경화 지표로 사용될 수 있다고 보고하였다^{51,52)}. 본 실험에서 고지방식을 섭취한 실험군에서 정상식이군과 비하여 렙틴의 혈중농도가 증가하였고, 아디포넥틴은 감소하였으며, 고지방식이 대조군에 비교하여 GCST 100 및 200 mg/kg 투여군은 렙틴과 아디포넥틴 농도 변화에 유의한 차이가 없었으나 400 mg/kg 투여군에서는 렙틴이 36%가 감소되고, 아디포넥틴이 32% 증가하여 유의한 차이를 보였다. 본 결과로서 加味清肺瀉肝湯 투여가 고지방식이 마우스의 대사조절 호르몬 렙틴 및 아디포넥틴의 혈중농도를 조절하는 것을 확인하였으며 혈중 렙틴 농

도가 이미 높아져 있고 렙틴의 투여에 별로 반응하지 않는 비만환자의 렙틴 저항성을 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

지방세포 분화과정에서는 인슐린 반응에 의해 C/EBPs, PPAR- γ , SREBP0-1 등의 전사인자의 발현이 증가한다고 알려져 있다⁵³⁻⁵⁵⁾. 간에서 지질을 생합성하는 데 관여하는 주요 전사인자로 알려진 SREBP1은 지방산과 콜레스테롤의 생합성 효소들(FAS, ACC, SCD-1, ATP citrate lyase)의 mRNA 발현을 증가시키며, 이 과정에서 발현된 지방산합성 효소(FAS)는 acetyl-CoA와 malonyl-CoA로부터 palmitate의 합성을 촉진시키고, NADPH 존재하에 장쇄 포화지방산으로 전환시키는 역할을 하며, 세포내 지질합성 및 축적에 중요한 역할을 한다고 보고되었다⁵⁶⁾. SCD-1은 포화지방산인 stearic acid로부터 단일 불포화 지방산인 oleic acid로 전환시키는 역할을 하는 효소이며, 비만에서 증가된다고 알려져 있다⁵⁷⁾. 본 연구에서 마우스의 간조직을 취하여 지방 합성에 관여하는 인자를 분석한 결과 정상식이군과 비교하여 고지방식이 섭취 마우스는 지방산 합성 관련 유전자들의 발현이 SREBP-1c, FAS, SCD-1의 발현이 증가하였다. 한편 GCST 투여군에서는 고지방식이 대조군 비교하여 농도의 존적으로 SREBP-1c, FAS, SCD-1의 발현이 감소하였으며 400 mg/kg 고농도 투여군에서만 SREBP-1c, FAS, SCD-1의 발현이 유의적인 감소를 나타내었다. 이 결과로부터 加味清肺瀉肝湯이 지방세포 형성 및 세포내 지질축적 감소시키는 효과가 있는 것으로 생각된다.

인슐린 저항성이 주된 발병기전인 제2형 당뇨병 환자에서 아디포넥틴이 감소되어 있으며 인슐린 감작제 중의 PPAR- γ agonist인 TZDs에 의해 아디포넥틴의 mRNA 발현, 혈중농도가 증가하는 것으로 알려져 있다^{58,59)}. 아디포넥틴이 간과 근육에 직접 작용하여 인슐린 저항성을 개선시키는 기전으로 간과 근육에서 adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMP kinase)를 활성화하여 acetyl CoA carboxylase (ACC)를 억제하여 지방산 산화를 촉진한다고 보고되었다^{60,61)}. 한편 간조직에서 PPAR- α 는 지방산의 수송 및 지방산 결합과 활성화에 관여하는 유전자들의 발현을 증가시키고 지방산의 흡수 및 이용, 분해대사를 촉진시키며 피옥시좀 및 미토콘드리아에서 지방산의 β -산화를 촉진시킨다고 알려져 있다. PPAR- α 의 활성화로 발현이 촉진된다. β -산화에 관여하는 효소는 ACO, CPT-1a 등은

지방산을 소비하여 체지방 감소에 관여한다고 보고되고 있다⁶²⁾. 따라서 본 실험에서 지방산 산화 관련 유전자들의 mRNA 발현량을 측정하였다. 고지방식이 마우스는 정상식이군과 비교하여 지방산 산화 관련 유전자 PPAR- α , ACO, CPT-1 α 의 mRNA 발현이 감소하였으며, GCST 투여군에서는 고지방식이 대조군 비교하여 PPAR- α , ACO, CPT-1 α 의 mRNA 발현이 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 그러나 대조약물투여군에서는 지방산 산화 관련 유전자의 발현이 증가되지 않았으나 400 mg/kg 고농도 투여군에서만 유의적으로 증가하였다. 이 결과로써 加味淸肺瀉肝湯의 체지방 감소 및 항비만효과가 지방 분해대사를 촉진시키는 작용에 의한 것으로 생각된다.

이상의 실험으로 유의성 있는 결과를 종합하면 고지방식이 대조군과 비교하여 GCST 400 mg/kg을 7주간 투여한 실험군에서만 체중, 혈중지질, 백색지방조직 및 간조직 중량, 복부지방량 및 간조직 지질량 등을 감소시켰다. 또한 간 손상등의 부작용 없이 식이 조절 호르몬 렙틴 혈중농도와 지방산 합성 활성인자 SREBP-1c, FAS, SCD-1 등의 발현을 유의하게 감소시켰다. 한편 에너지 소비 대사를 조절하는 아디포넥틴 혈중농도와 지방산 산화 및 소비에 관여하는 인자 PPAR- α , ACO, CPT-1 α 등의 발현량을 유의적으로 증가시켰다. 따라서 加味淸肺瀉肝湯은 렙틴 저항성, 인슐린 저항성을 감소시키는 작용과 더불어 체내 지방축적 억제 및 체지방 대사를 촉진하여 비만증 및 고지혈증 등을 치유하는 데 활용할 수 있다고 생각된다.

결론

고지방식으로 마우스에 비만 및 지방간증을 유도하고 加味淸肺瀉肝湯을 투여하여 체중 증가량, 식이효율, 백색지방 및 간조직의 무게, 복부 단층 및 간 조직의 형태학적 변화, 혈청 내에서 지질 함량, leptin, adiponectin, 간 조직에서 지질 함량과 지방산 합성 및 산화에 관한 유전자 발현에 대하여 분석하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 고지방식이에 의해 증가된 체중, 식이효율, 백색지방 및 간조직의 무게가 加味淸肺瀉肝湯 투여군에서 감소하였다.
2. 고지방식으로 증가된 혈청 내 중성지방, 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도가 加味淸肺瀉肝湯 400 mg/kg

투여군에서 유의하게 감소하였다.

3. 고지방식으로 유도된 혈청 내 leptin 농도는 加味淸肺瀉肝湯 투여량에 농도의존적으로 감소하였으며, adiponectin 농도는 加味淸肺瀉肝湯 투여량에 의하여 증가하였다.

4. 고지방식으로 인한 증가되는 혈청 내 GOT, GPT 농도에 대하여 加味淸肺瀉肝湯 투여군에서 유의한 차이는 없었다.

5. 실험동물의 전산화 단층 촬영 분석에서 고지방식이군과 비교하여 복부 지방 부피가 加味淸肺瀉肝湯 400 mg/kg 투여군에서 유의하게 감소되었다.

6. 간조직의 형태학적 분석에서 고지방식으로 인한 지방간형태가 加味淸肺瀉肝湯 400 mg/kg 투여군에서 정상식이군 수준으로 감소되었다.

7. 고지방식으로 인해 증가한 간 조직의 총 지질, 중성지방, 총콜레스테롤 함량이 加味淸肺瀉肝湯 400 mg/kg 투여군에서 유의하게 감소되었다.

8. 간조직의 지방산 합성 및 산화 관련 유전자 발현 분석에서는 加味淸肺瀉肝湯 400 mg/kg 투여군에서 간조직의 SREBP-1c, SCD-1, FAS의 발현이 유의하게 감소하였으며, PPAR- α , ACO, CPT-1 α 의 발현이 유의하게 증가하였다.

이상의 결과를 종합하였을 때, 加味淸肺瀉肝湯은 비만 및 비만과 동반되는 지방간, 고지혈증과 같은 비만 관련 질환의 예방과 치유에 대하여 효과적인 처방으로 사용될 수 있으며 향후 지속적인 임상연구가 필요할 것으로 생각된다.

References

1. Min HG. Clinical endocrinology. Seoul : Korea medicine. 1990 : 475-87.
2. Wilson JD, Daniel MD, Foster W, Williams MD. Textbook of endocrinology. 7th ed. Philadelphia : W. B. Saunders Company. 1985 : 1081-98.
3. Björntorp P. The associations between obesity, adipose tissue distribution and disease. Acta Med Scand Suppl. 1988 ; 723 : 121-34.
4. Visscher TL. The public health impact of obesity. Annu Rev Pub Health. 2001 ; 22 : 355-75.
5. Lee HK. Diseases associated with obesity. J Nut Health. 1990 ; 23(5) : 341-6.
6. Yang KM. Relationship between the assessment of obesity and cardiovascular diseases. JKFN. 2002 ; 7(2) : 1-8.

7. Yoon YS, Keum OS, Lee WS, Kim IH, Lee HI, Yong YS. Effects of Cheongshimyeonja-tang on body weight and serum lipid levels in high fat diet induced obese mice. *Herb Formula Sci.* 2014 ; 22(1) : 123-39.
8. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean medicine rehabilitation. 4th ed. Seoul : Koonja Publishing Inc. 2015 : 298-317.
9. Kim HG, Keum BT. The bibliographical study on causes, mechanisms and the chief virtues on obesity. *J Daejeon Orient Med Coll.* 1992 ; 1(2) : 61-71.
10. Hwang MY, Kim WH. The study of oriental pothological physiology on obesity. *J Daegu Orient Med Coll East West Med.* 1984 ; 8(3) : 77-83.
11. Heo SY, Kang HS. The study and treatment of East-West medicine on obesity. *J Orient Rehab Med.* 1997 ; 7(1) : 272-83.
12. Song YS, Lee MJ, Jeong SH, Lee JS, Kim SS, Shin HD. Effects of Bangkihwangkitang, Bangkihwangkitang with Lycii fructus and Lycii fructus on the weight of obese rats. *J Orient Rehab Med.* 1991 ; 1(1) : 25-43.
13. Lee ES, Kim SS, Jeong SH, Lee JS, Shin HD. Effects of Bangkihwangkitang on adipose tissue of liver and epididymis and serum lipid. *J Orient Rehab Med.* 1995 ; 5(1) : 1-10.
14. Hwang MJ, Shin HS, Song MY. Review of literature on herbal medicines for the treatment of obesity in Korea: mainly papers since 2000. *Orient Rehab Med.* 2006 ; 16(3) : 65-81.
15. Won JS. Dongeuisasangshinpyeon. Seoul : Jonghapseuiwonsa. 1974 : 66-7.
16. Lee JM. Dongeuisusebowon. Seoul : Henglim Publishing Inc. 1986 : 7-13, 115, 137-8.
17. Ahn HM, Han SY, Kim JH, Rho TW, Chong MS, Kim YK. Effects of Cheongpyesagan-tang and YKK012 on in vitro and in vivo colon cancer cell growth with and without CPT-11. *Kor J Herbol.* 2015 ; 30(1) : 33-43.
18. Park YJ, Kim SJ, Yang GE, Lee MJ, Lee JS, Kang DH, et al. Anti-platelet aggregation effect of Cheongpyesagan-tang in vitro. *Korean J Orient Int Med.* 2010 ; 31(4) : 714-21.
19. Choi DJ, Jung WS, Moon SK, Cho KH, Kim YS, Bae HS. The clinical efficacy of Chungpyesagan-tang on acute stroke. *J Korean Orient Med.* 2002 ; 23(4) : 9-14.
20. Hong SG, Joo KB, Jin KY, Mo KS, Wuk CD. Protective effects of Chungpesagan-tang against ischemia/reperfusion induced cell injury. *Korea Inst Orient Med.* 2000 ; 54(1) : 111-7.
21. Jeong CG, Kim EY, Shin JW, Sohn YJ, Lee HS, Jung HS, et al. Effect of Chungpaesagan-tang on ischemic damage induced by middle cerebral artery occlusion in diabetic rats. *J Korean Orient Med.* 2005 ; 26(2) : 217-30.
22. Kim JY, Shin MR, Heo WY, Kim DR, Weon JJ. The effects of Chungpyesagan-tang on the recovery of liver function in rat injured by CCl₄. *J Sasang Const Med.* 2005 ; 17(1) : 130-41.
23. Kim DL, Song YB. An experimental study of the effect by Chongshimyonjatang and Chongpyesagantang on immune response and anti-allergic reaction to rats and mice. *J KyungHee Orient Med Coll.* 1991 ; 14 : 131-60.
24. Koo JS. Effects of Chungpyesagantang on the diabetic rats induced by streptozotocin. *J Korean Orient Pediatr.* 1997 ; 11(1) : 227-48.
25. Song MY, Kim SS, Shin HD. The clinical study about the effect of Chugpaesagan-tang and Taeumjou-tang on Taeumin obesity after fasting therapy. *J Orient Rehab Med.* 1998 ; 8(1) : 34-56.
26. Kim EY, Sul YK, Choi JJ, Jeon SH, Kim H, Kim JW. Effect of Cheongpesagan-tang on the change of inhibitory effect against lipase activity and weight loss, plasma and UCP1, 2mRNA expression in db/db mouse. *J Sasang Const Med.* 2007 ; 19(1) : 171-85.
27. Bae JH, Lee JS, Chung SH, Kim SS, Shin HD. Effect of Cheongpesagan-tang on the changes of the weight, plasma and UCP mRNA expression in obese SD rats induced high fat feed. *J Orient Rehabil Med.* 2002 ; 12(1) : 133-56.
28. Huh SY, Kang HS. Experimental study on the effect of Chungpesagantang in obese rats. *Orient Rehab Med.* 1998 ; 8(2) : 106-18.
29. Hwang JH, Jang ES, Yoo JH, Lee SW. Clinical study on the utilization of Yeoldahanso-tang and Cheongpyesagan-tang. *Korean Inst Orient Med.* 2008 ; 14(2) : 101-6.
30. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J Biol Chem.* 1975 ; 226 : 497-509.
31. Frings CS, Dunn RT. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo- phospho-vanillin reaction. *Am J Clin Pathol.* 1970 ; 53 : 89-91.
32. Kim KS, Park SW. Drug therapy for obesity. *Korean J Obes.* 2012 ; 21(4) : 197-202.
33. Kim SG, An GH, Yoon SW, Lee YC, Ha SD. A study on dietary supplement to reduce obesity by the mechanism of decreasing lipid and carbohydrate absorption. *Korean J Food Sci Technol.* 2003 ; 35(3) : 519-26.
34. Jin KS. Analysis of the tendency to research for obesity. MS Thesis. Daejeon: Graduate School of Daejeon University. 2004.
35. Gang SA, Jang GH, Park SG, Lim JP, Jeon H, Choi H, et al. Effects of herbal composition on obese a high fat diet. *Kor J Herbol.* 2003 ; 18(4) : 59-64.
36. Park WH, Yun YC, Yun KS, Park TY, Kim HJ, Won SC, et al. Review on the study of oriental obesity pattern identification: focused on Korean research papers. *J Orient Rehabil Med.* 2014 ; 24(2) : 84-93.
37. Kang SA, Jang KH, Park SK, Lim JP, Jeon H, Cui X, et al. Effects of herbal composition on obese rats fed high diet. *Kor J Herbol.* 2003 ; 18 : 59-64.

38. Shin MG. Herbal medicine. Seoul : Younglim Publishing. 2006 : 322, 341, 352, 400-1, 582-3, 720-1, 724, 749, 785.
39. Moon SH, Sin SH, Kim HJ, Kim JY. A relationship of the obesity and body composition analysis by Sasang constitution. *J Orient Rehabil Med.* 2002 ; 12(4) : 1-10.
40. Jeong BS, Shin MG. Dohaehyangyak unabridged dictionary. Seoul : Younglim Publishing. 1990 : 116-9.
41. Song YK, Lim HH. Clinical application of ma huang in the obesity treatment. *J Soc Kor Med Obe Res.* 2007 ; 7(1) : 1-7.
42. Kim KS, Lee DU, Kim YL, Hwang MJ, Kim GW, Koo BS. Anti-obesity and anti-hyperlipidemic effects of Taeyumjowee-tang and its modified prescription. 2007 ; 9(1) : 57-74.
43. Lee GN, Kwon OH. The clinical pathology file. The 3rd ed. Seoul : Uihakmunhwasa. 2000 : 155-99.
44. Tomkin GH. Atherosclerosis, diabetes and lipoproteins. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2010 ; 8 : 1015-29.
45. Avram AS, Avram MM, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased status: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J Am Acad Dermatol.* 2005 ; 53 : 671-83.
46. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003 ; 112(12) : 1821-30.
47. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 ; 11 : 327-32.
48. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 ; 86 : 1930-5.
49. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet.* 2002 ; 360 : 57-8.
50. Fasshauer M, Paschke R. Regulation of adipokines and insulin resistance. *Diabetologia.* 2003 ; 46 : 1594-603.
51. Diamond FB Jr, Cuthbertson D, Hanna S, Eichler D. Correlates of adiponectin and the leptin/adiponectin ratio in obese and non-obese children. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2004 ; 17 : 1069-75.
52. Satoh N, Naruse M, Usui T, Tagami T, Suganami T, Yamada K, et al. Leptin-to-adiponectin ratio as a potential atherogenic index in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2004 ; 27 : 2488-90.
53. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 1998 ; 273 : 30057-60.
54. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, et al. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 1996 ; 15 : 5336-48.
55. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002 ; 109 : 1125-31.
56. Nepokroeff CM, Lakshmanan MR, Porter JW. Fatty acid synthase from rat liver. *Methods Enzymol.* 1975 ; 35 : 37-44.
57. Cameron PJ, Rogers M, Oman J, May SG, Lunt DK, Smith SB. Stearoyl coenzyme A desaturase enzyme activity and mRNA levels are not different in subcutaneous adipose tissue from angus and American wagyu steers. *J Anim Sci.* 1994 ; 72 : 2624-8.
58. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes.* 2001 ; 50 : 2094-99.
59. Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology.* 2002 ; 143 : 998-1007.
60. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.* 2001 ; 7 : 947-53.
61. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 ; 98 : 2005-10.
62. Huang J, Jia Y, Fu T, Viswakarma N, Bai L, Rao MS, et al. Sustained activation of PPARalpha by endogenous ligands increases hepatic fatty acid oxidation and prevents obesity in ob/ob mice. *FASEB J.* 2012 ; 26(2) : 628-38.