

원저

## 五苓散加減方이 3T3-L1 adipocyte의 leptin 및 leptin receptor 함량과 differentiation에 미치는 영향

강중원, 최도영, 박동석, 이재동  
경희대학교 한의과대학 침구학교실

### The Effects of *Oryungsan-gagampang* on Leptin Levels, Leptin Receptor Levels and Differentiation of 3T3-L1 Adipocyte

Jung-Won Kang, Do-Young Choi, Dong-Suk Park, Jae-Dong Lee

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, KyungHee University

**Objectives :** This experimental study was designed to investigate the effects of *Oryungsan-gagampang* on leptin and leptin receptor levels and differentiation of 3T3-L1 adipocyte.

**Methods :** After 3T3-L1 adipocytes were incubated with various concentrations of *Oryungsan-gagampang* and Reductil(r) for 7 days, leptin and leptin receptor levels in 3T3-L1 adipocytes were measured by ELISA. To elucidate the mechanism of inhibitory effects of *Oryungsan-gagampang* on obesity, the 3T3-L1 adipocytes after oil red O staining were taken by digital photo system.

**Results :** 1. *Oryungsan-gagampang* 1,000  $\mu\text{g/ml}$  significantly increased leptin levels in 3T3-L1 adipocytes in comparison with the control group ( $p<0.05$ ), and *Oryungsan-gagampang* 0.1 10, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  significantly increased leptin receptor levels in 3T3-L1 adipocytes in comparison with the control group ( $p<0.05$ ).

2. *Oryungsan-gagampang* inhibited of differentiation of 3T3-L1 adipocytes.

**Conclusions :** *Oryungsan-gagampang* showed significant effects on inhibiting differentiation of 3T3-L1 adipocytes, and increasing leptin levels and leptin receptor levels in 3T3-L1 adipocytes. Therefore, *Oryungsan-gagampang* could be used to treat obesity, but further studies are required.

**Key Words:** *Oryungsan-gagampang*, obesity, 3T3-L1 adipocyte, leptin, leptin receptor, differentiation

### 緒論

비만은 단순히 과잉체중의 상태를 말하는 것이 아니라, 대사 장애로 인해 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 말한다. 즉, 칼로리의 섭취가 신체활동과 성장 등에 필요한 에너지보다 초과되어 중성지방의 형태로 지방조직에 과잉 축적되어 열량불균형으로 나

· 접수 : 2005년 5월 13일 · 논문심사 : 2005년 5월 8일  
· 채택 : 2005년 5월 28일  
· 교신저자 : 이재동, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한방병원 침구과  
(Tel; 02-958-9208, E-mail; ljdacu@khmc.or.kr)

타나게 되는 것을 뜻한다. 한편 한의학적으로 비만은 膏粱厚味, 先天稟賦, 久臥久坐, 外感, 內傷 등으로 인한 氣虛, 氣滯, 濕痰, 血瘀 등에 의해 발생하는 것으로 생각되어져 왔다<sup>1)</sup>.

비만은 생리적인 기능을 저하시킬 뿐만 아니라, 뇌졸중, 동맥경화, 심근경색 등의 심혈관계 질환, 당뇨, 간경변증 등 만성질환의 빈도를 증가시키고, 퇴행성 관절염, 전립선, 유방, 대장 및 자궁내막암, 수면 무호흡, 우울증 등의 발병 위험도를 높여서 사망률을 증가시키는데, 실제 동물실험에서도 비만동물이 정상동물에 비하여 수명이 짧으며, 비만동물을 열량 제한했을 때 수명이 연장되는 효과를 관찰할 수 있다<sup>2)</sup>.

특히 비만은 관절에 중량을 부하하는 스트레스로 작용하여 체질량지수가 증가함에 따라 무릎이나 고관절 같은 체중부하관절에서의 퇴행성 관절염의 발병이 증가하게 되는데, 실제 체질량지수가 2 kg/m<sup>2</sup> 감소하면 발생위험도가 50% 감소하게 된다<sup>3)</sup>. 또한 비만이 체중부하관절이 아닌 관절에서의 퇴행성 관절염의 발병률도 높인다는 보고도 있는데<sup>4)</sup>, 이러한 것들은 퇴행성 관절염의 발병 및 임상양상, 진행과정에 전반적인 영향을 미치는 비만에 대한 적극적인 관리가 필수적이며<sup>5)</sup>, 또한 비만에 대한 적절한 관리 없이 퇴행성 관절염으로 인한 증상의 호전을 기대할 수 없음을 시사하고 있다.

현재 여러 학계에서 비만에 관련된 다양한 실험 및 임상 연구가 활발히 진행되고 있지만, 비만과 밀접한 관련이 있는 퇴행성 관절염 등과 같은 근골격계 질환의 관련성에 관한 임상 연구 및 그 사전 연구

로서의 실험 연구에 대한 자료 축적이 아직까지는 미비한 실정이어서 이에 대한 보다 꾸준한 학문적인 관심이 요구되고 있다.

이에 본 연구에서는 비만과 퇴행성 관절염의 관계에 대한 임상 연구의 사전 실험 연구로서 현재 비만 치료에 많이 사용되며 利水化氣 滲濕하는 효능을 가진 五苓散에 調胃升清湯의 구성 약물 중 薏苡仁, 蘿菔子, 麻黃을 가미한 五苓散加減方이 3T3-L1 adipocyte에 미치는 영향을 알아보기 위해 *in vitro* assay에서 배양액 내 leptin 및 leptin receptor 함량과 3T3-L1 adipocyte의 differentiation에 대한 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 실험재료

#### 1) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약 중에서 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin, penicillin, trypsin-EDTA, sodium bicarbonate, Hepes는 Gibco/BRL사에서, phosphate buffered saline (PBS), dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), insulin, dimethylsulfoxide (DMSO), Oil Red O, isopropanol, ethanol, NP-40는 Sigma사 (USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용한 kit는 Leptin ELISA kit (CRYSTAL CHEM INC.)와 Leptin Receptor ELISA kit (BioVender Laboratory Medicine, INC.)이었다.

Table1. Prescription of *Oryungsan-gagampang*

	Ingredients	Dose (g)
五苓散加減方	茯苓 ( <i>Poria</i> )	4
	猪苓 ( <i>Polyporus</i> )	4
	澤瀉 ( <i>Alismatis Rhizoma</i> )	4
	肉桂 ( <i>Cinnamomi Cortex</i> )	4
	白朮 ( <i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i> )	4
	薏苡仁 ( <i>Coicis Semen</i> )	12
	蘿菔子 ( <i>Raphani Semen</i> )	6
	麻黃 ( <i>Ephedrae Herba</i> )	4
	Total Amount	42

실험에 사용된 기기는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Emax, Molecular Devices), centrifugal separator (Allegra™ X-12R Centrifuge, BECKMAN COULTER), water bath (BS-10, Lab. Companion), inverted microscope 및 digital photo system (Axiovert 200, Carl Zeiss), incubator (NAPCO 6500, BMS), clean bench (수공양행), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan) 등이었다.

### 2) 세포배양<sup>9)</sup>

실험에 사용된 3T3-L1 adipocyte는 American Type Culture Collection (ATCC CL 173)에서 구입하였는데, 이 세포를 표준배양액 (DMEM containing 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin)을 이용하여 T75 cm<sup>2</sup> 배양용기에서 3일에 한번씩 계대 배양하였으며 passage 7까지 사용하였다.

### 3) 약제

실험에 사용된 약재인 五苓散加減方은 <傷寒論精解><sup>7)</sup>에 수록된 五苓散에 調胃升清湯의 구성 약물 중에서 薏苡仁, 蘿藦子, 麻黃을 선택하여 加減한 것으로 경희대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선해서 사용하였으며, 그 처방의 내용과 1첩의 분량은 다음과 같다 (Table 1).

또한 五苓散加減方과 기존 비만치료에 사용되는 약물을 비교하기 위한 양성대조군의 의미로서 Reductil® (Sibutramine Hydrochloride 10 mg, 한국에보트)<sup>8)</sup>을 경희의료원 동서협진센터에서 연구용으로 처방전을 발급받아 구입하여 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 검액의 제조

먼저 五苓散加減方 6첩 분량 (252 g)을 증류수 1,000 ml와 함께 3,000 ml round flask에 넣고 냉각기를 부착하여 120분간 가열하여 전탕액을 만들고, 또한 남은 五苓散加減方을 다시 증류수 1,000 ml와 함께 넣어 120분간 가열하여 만든 재탕액과 혼합하였다. 그리고 그 혼합액을 여과지로 여과하고 rotary vacuum evaporator로 감압농축을 실시하여 약 700 ml

로 농축한 후, freeze dryer로 동결건조하여 20.9 g (수율 8.64%)의 시료를 얻어 실험에 사용하였다.

### 2) 실험군의 분류

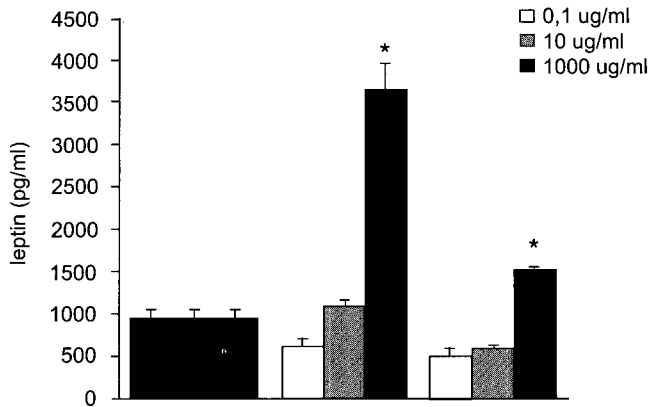
3T3-L1 adipocyte를 분화시키기 위해 배양과정을 거친 뒤, 7일 동안 Diff. Media를 처리한 대조군 (n=6), 五苓散加減方을 각각 0.1, 10, 1,000 µg/ml의 용량으로 처리한 五苓散加減方 처리군 (n=3), 양성 대조군의 의미로서 Reductil® 각각 0.1, 10, 1,000 µg/ml의 용량으로 처리한 Reductil® 처리군 (n=3)의 3가지 군으로 나누었다.

3) 3T3-L1 adipocyte의 differentiation<sup>9,10,11)</sup>과 Oil Red O staining<sup>12)</sup> 먼저 3T3-L1 adipocyte를 adipocyte로 분화시키기 위하여 이들 동안 1 µM dexamethasone, 10 µg/ml insulin, 0.2 mM isobutylmethylxathine이 포함된 배양액에서 배양하고 난 뒤, 다시 5 µg/ml이 포함된 분화유도배지로 교환하여 이들 동안 배양하였다. 그 후 五苓散加減方 및 Reductil® 각각 0.1, 10, 1,000 µg/ml의 용량으로 처리하고 이들에 한번씩 배양액을 교환하여 7일 동안 배양하였다. 이후 배양액을 모아 leptin과 leptin receptor를 정량하였고, Oil Red O staining을 실시하였다.

Oil Red O staining은 세포를 1시간동안 10% formalin에 고정된 뒤 물로 3회동안 세척한 뒤 건조시켰다. 세포를 0.6% Oil Red O 용액으로 15분간 반응시켜 염색하였고 물로 세척한 후 digital photo system (배율×10)으로 촬영하였으며, 4% NP-40 용액 100 µl를 첨가하여 용해시킨 후 흡광도 520 nm에서 정량하였다.

### 4) 배양액 내 leptin 함량 측정

배양액에서의 leptin 함량은 Leptin ELISA kit를 이용하여 정량하였다. leptin 항체가 coating된 96-well plate에 배양액 50 µl와 Guinea pig anti-mouse IgG 50 µl를 분주하고 4℃에서 12시간 반응시켰다. 그 뒤 washing buffer로 5회 세척하고 horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-Guinea pig IgG 100 µl를 분주한 다음 4℃에서 3시간동안 반응시켰다. 이후 washing buffer로 다시 7회 세척하고 TMB substrate solution 100 µl를 넣어 실온에서 30분 동안 반응하여



**Fig. 1.** Effects of Oryungsan-gagampang on leptin level in 3T3-L1 adipocytes. The 3T3-L1 adipocytes were incubated with various concentrations of Oryungsan-gagampang and Reductil® as described in the Materials and Methods for 7 days. Diff. Media (control): Group treated with differentiated medium containing 1  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin, 0.2 mM isobutylmethylxathine (n=6). Med: Group treated with Oryungsan-gagampang 0.1, 10, 1,000  $\mu$ g/ml in 3T3-L1 adipocytes (n=3). Reductil: Group treated with Reductil® 0.1, 10, 1,000  $\mu$ g/ml in 3T3-L1 adipocytes (n=3). The level of leptin was measured by ELISA. Results are shown as mean $\pm$ SD. \*: Statistical significance as compared with Diff. Media (Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ).

발색시키고, 1 N sulfuric acid 100  $\mu$ l를 넣어 반응을 종료시켰다. 흡광도 450 nm에서 ELISA reader로 측정하고, standard curve와 비교하여 leptin의 함량을 계산하였다.

#### 5) 배양액 내 leptin receptor 함량 측정

배양액에서의 leptin receptor 함량은 Leptin Receptor ELISA kit를 이용하여 정량하였다. leptin receptor 항체가 coating된 96-well plate에 배양액 100  $\mu$ l를 분주하고 shaker에서 300 rpm으로 흔들어주면서 실온에서 1시간 반응시켰다. 이후 washing buffer로 3회 세척한 뒤 HRP conjugated anti-human leptin receptor 100  $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 뒤 washing buffer로 다시 4회 세척하고 TMB substrate solution 100  $\mu$ l 넣고 10분간 반응시켜 발색시킨 후 1 N sulfuric acid 100  $\mu$ l를 넣어 반응을 종료시켰다. 흡광도 450 nm에서 ELISA reader로 측정하고, standard curve와 비교하여 leptin receptor의 함량을 계산하였다.

#### 3. 통계처리

각 실험군 사이의 통계학적 분석은 SPSS 11.5<sup>13)</sup>를 이용하여, nonparametrical analysis 중 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 실험에 대한 통계적인 유의성 검정은 신뢰구간  $p < 0.05$ 인 경우에만 의미를 인정하였다.

## 성績

#### 1. 배양액 내 leptin 함량

五苓散加減方이 배양액 내 leptin 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군의 경우  $875 \pm 187.19$  pg/ml이었는데, 五苓散加減方 처리군은 0.1  $\mu$ g/ml 농도에서는  $615 \pm 87.18$  pg/ml, 10  $\mu$ g/ml 농도에서는  $1085 \pm 74.67$  pg/ml, 1,000  $\mu$ g/ml 농도에서는  $3643.33 \pm 322.66$  pg/ml이었다. Reductil® 처리군은 0.1  $\mu$ g/ml 농도에서는  $496.67 \pm 70.06$  pg/ml, 10  $\mu$ g/ml 농도에서는  $573.33 \pm 40.10$  pg/ml, 1,000  $\mu$ g/ml 농도에서는  $1523.33 \pm 45.37$  pg/ml이었다 (Fig. 1).

五苓散加減方 처리군의 경우 0.1  $\mu$ g/ml의 농도에서는 대조군에 비해서 오히려 낮은 leptin 함량을 보

였는데, 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비해서 높은 leptin 함량을 보였으나 유의성 있는 차이는 보이지 않았으며, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비해서 leptin 함량이 유의성 있게 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ). Reductil® 처리군의 경우 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 과 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비해서 오히려 낮은 leptin 함량을 보였으나, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비해서 leptin 함량이 유의성 있게 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ).

## 2. 배양액 내 leptin receptor 함량

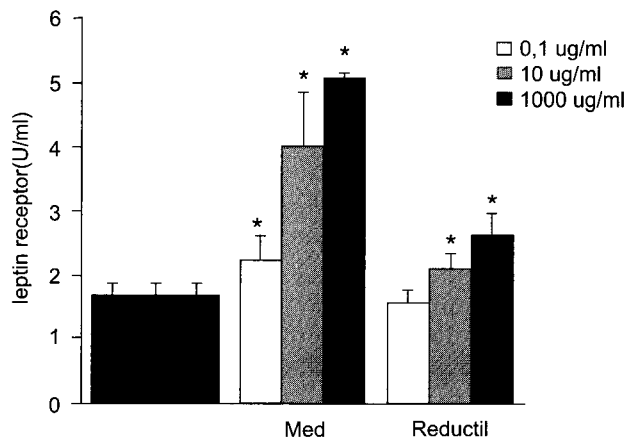
五苓散加減方이 배양액 내 leptin receptor 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군의 경우  $1.67 \pm 0.18 \text{ U/ml}$ 이었는데, 五苓散加減方 처리군은 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는  $2.25 \pm 0.36 \text{ U/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는  $4.02 \pm 0.83 \text{ U/ml}$ , 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는  $5.07 \pm 0.07 \text{ U/ml}$ 이었다. Reductil® 처리군은 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는  $1.56 \pm 0.21 \text{ U/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는  $2.12 \pm 0.23 \text{ U/ml}$ , 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는  $2.62 \pm 0.35 \text{ U/ml}$ 이었다 (Fig. 2).

五苓散加減方 처리군의 경우 0.1, 10, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 대조군에 비해 leptin receptor 함량이 유의성 있게 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ). Reductil® 처리군의 경우 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비해서 오히려 낮은 leptin receptor 함량을 보였으나, 10, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비해서 leptin receptor 함량이 유의성 있게 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ).

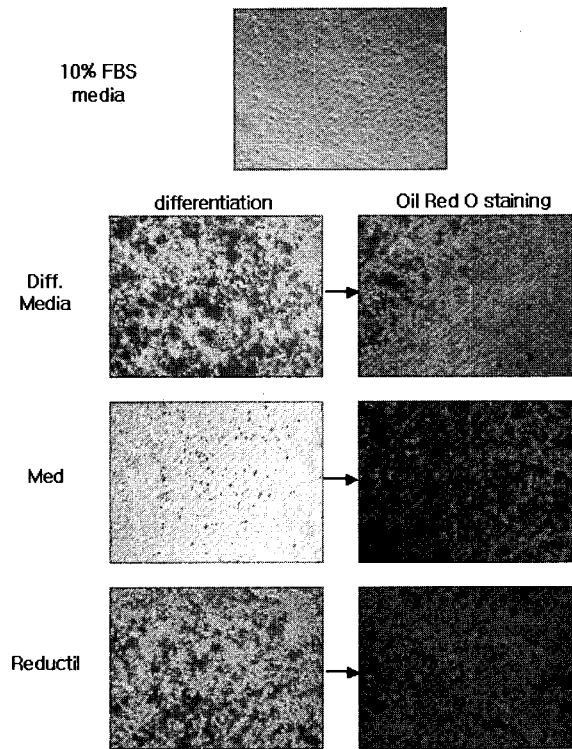
## 3. 3T3-L1 adipocyte의 differentiation에 대한 영향

五苓散加減方이 3T3-L1 adipocyte의 differentiation에 대한 영향을 관찰하기 위하여, 3T3-L1 adipocyte를 배양하여 adipocyte로 differentiation 시키고 Oil Red O staining을 실시한 뒤  $\times 10$ 의 배율로 digital photo system으로 촬영하였다 (Fig. 3).

기본배지인 10% FBS media에서는 adipocyte precursor cell이 fibroblast like한 모양을 하고 있었고 cytoplasm 내에는 lipid가 없었으며, 7일 동안 confluent하게 자랐을 때도 틈 사이가 전혀 없이 계



**Fig. 2.** Effects of Oryungsan-gagampang on leptin receptor level in 3T3-L1 adipocytes. The 3T3-L1 adipocytes were incubated with various concentrations of Oryungsan-gagampang and Reductil® as described in the Materials and Methods for 7 days. Diff. Media (control): Group treated with differentiated medium containing  $1\mu\text{M}$  dexamethasone, 10  $\mu\text{g/ml}$  insulin, 0.2 mM isobutylmethylxathine ( $n=6$ ). Med: Group treated with Oryungsan-gagampang 0.1, 10, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  in 3T3-L1 adipocytes ( $n=3$ ). Reductil: Group treated with Reductil® 0.1, 10, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  in 3T3-L1 adipocytes ( $n=3$ ). The level of leptin receptor was measured by ELISA. Results are shown as mean $\pm$ SD. \*: Statistical significance as compared with Diff. Media (Mann-Whitney U test,  $p<0.05$ ).



**Fig. 3.** Effects of Oryungsan-gagampang on differentiation in 3T3-L1 adipocytes. Diff. Media (control): Group treated with differentiated medium containing 1  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin, 0.2 mM isobutylmethylxathine (n=6). Med: Group treated with Oryungsan-gagampang 0.1, 10, 1,000  $\mu$ g/ml in 3T3-L1 adipocytes (n=3). Reductil: Group treated with Reductil® 0.1, 10, 1,000  $\mu$ g/ml in 3T3-L1 adipocytes (n=3).

속 안정된 모양을 유지하였다. 대조군에서는 3T3-L1 adipocyte의 differentiation이 이루어져 그 모양이 round shape로 바뀌면서 동시에 lipid가 축적되기 시작하여 7일째에는 축적된 lipid가 여러 층으로 보였으며, Oil Red O staining 결과에서도 염색된 lipid를 관찰할 수 있었다.

한편 五苓散加減方 처리군에서는 3T3-L1 adipocyte의 differentiation이 억제되어 lipid도 발견되지 않았으며, 안정된 모양을 유지하였다. 한편 Reductil® 처리군에서는 3T3-L1 adipocyte의 differentiation이 억제된 효과를 관찰할 수 없었으며, Oil Red O staining 결과에서도 염색된 lipid를 관찰할 수 있었다.

## 考 察

비만이란 일반적으로 표준체중을 넘어 체중이 많이 나가는 상태를 뜻하나, 정확하게는 섭취한 에너지가 신체 활동과 성장 등에 필요한 소비 에너지양보다 초과할 때 잉여 에너지가 중성지방의 형태로 지방조직이나 장간막에 축적되어 대사 이상을 초래하여 혈액이나 장기 조직의 지질 성분에 변화가 일어나는 현상을 말한다<sup>10)</sup>.

비만의 원인은 크게 과도한 음식섭취와 운동부족 등의 환경적 요인, 시상하부 병변, 갑상선 이상, 뇌하수체 전엽 이상, 다른 질환의 이차적 합병증 등의 호르몬 요인, 유전적 요인, 스트레스 등의 심리적 요

인, 스테로이드제 등의 약물 남용 등으로 나뉘며, 이런 원인으로 인해 에너지 소모보다 섭취가 많아지는 에너지 대사의 불균형을 거쳐 과잉 에너지가 지방조직으로 축적되는 것이다<sup>15)</sup>.

비만은 실제로는 체내에 축적된 체지방량이 남성의 경우 체중의 25% 이상, 여성의 경우 30% 이상인 경우로 정의되지만<sup>16)</sup>, 임상적으로는 1997년 WHO에 의하여 체질량지수 25-29.9 kg/m<sup>2</sup>인 경우를 과체중, 30 kg/m<sup>2</sup> 이상인 경우를 비만으로 정의하여 전세계적으로 사용하고 있다<sup>16)</sup>. 우리나라의 경우 1995년 실시한 국민영양조사에 의하면 20세 이상 성인 인구에서 과체중은 15%, 비만은 1.5%로 아직 서구수준에는 미치지 못하고 있으나 비만에 대한 중요성은 날로 증가하고 있는 실정이다<sup>17)</sup>.

비만은 단순한 외형상의 문제일 뿐만 아니라 뇌졸중, 고혈압 및 제2형 당뇨병, 동맥경화, 고지혈증, 심근경색 등의 심혈관질환, 신장질환, 담석 및 담관질환 등의 신체적 및 정신적 건강 문제를 발생시킬 수 있는 만성 질환들과 매우 밀접한 관계가 있으며<sup>18)</sup>, 특히 근골격계에 대해서는 직접적인 체중의 증가로 무릎이나 고관절 등 체중부하관절에 stress를 가중시켜 퇴행성 관절염을 유발할 수 있다<sup>19)</sup>.

한의학적으로 비만은 肥, 肥人, 肥貴人, 肥胖, 肥膚盛 등으로 표현되며, <靈樞·逆順肥瘦篇>에 “年質壯大, 血氣充盈膚革堅固, 因加以邪刺此者, 深而留之, 此肥人也”로 언급되어, 주로 內傷七情, 氣虛, 多濕, 多痰, 血瘀 등의 원인으로 발생하며 補氣, 健脾, 化濕, 祛痰, 利水, 通腑, 化痰 등의 治法이 이용되고 있다. 한의학의 문헌에 나타난 비만의 病機를 종합하여 보면 膏粱厚味한 음식을 과식하거나 多食하면脾胃의 運化작용을 실조케 하고脾胃의 運化기능이 실조되면 열을 발생하며 열이 성하면 津液을 灼하고 陰津이 耗傷하여 음식을 구하게 되므로 음식섭취가 왕성케 되어 비만이 되는 것을 볼 수 있다. 氣虛하면 運化기능이 무력해지고 이차적으로 濕痰이 발생하여 비만을 야기하며, 濕痰은 체내의 수액대사기능이 실조하여 나타난 병리적 산물임과 동시에 체내의 수액대사를 실조케 하는 요인으로 濕痰이 체내에 형성되

면 비만을 야기하는 것으로 볼 수 있다. 또한 內傷七情은 장부기능에 영향을 주어 비만이 야기된다고 설명하였으며, 비만과 장부와의 관계에 있어서는 주로 脾와 肺 및 腎이 밀접한 관련이 있는 것으로 생각할 수 있는데 비만을 야기하는 주요인인 濕과 痰과 같은 인자들은 인체의 수액대사가 실조하여 나타나는 것으로 인체의 수액대사는 주로 肺의 宣發과 肅降, 脾의 運化輸布 및 腎의 蒸騰氣化와 같은 기능과 밀접한 관련이 있다<sup>1)</sup>.

비만의 치료법으로는 행동수정요법, 식이요법, 운동요법, 약물요법 및 수술요법 등이 있다. 이 중 약물요법은 식욕억제제, 이노제, 사하제 등과 함께 섭취한 지방의 소화와 흡수를 억제하거나 열 발생을 촉진하는 약물이 활용되는데, 때론 전해질의 불균형이나 습관성 불면, 신경과민, 심계항진 등의 부작용이 나타나기도 한다. 따라서 장기간 복용하여도 부작용 없이 비만을 치료하거나 예방하고 합병증을 개선시킬 수 있는 약제의 개발이 필수적이라 하겠다<sup>20)</sup>.

이에 본 연구에서는 현재 임상적으로 비만 치료를 위해 많이 응용되고 있는 五苓散에 調胃升清湯의 구성 약물 중에서 薏苡仁, 蘿藦子, 麻黃을 선택하여 加減<sup>21)</sup>한 五苓散加減方이 3T3-L1 adipocyte에 미치는 영향을 알아보기 위해 in vitro assay에서 배양액 내 leptin 및 leptin receptor 함량과 3T3-L1 adipocyte의 differentiation에 대한 영향을 관찰하였다.

본 실험에 사용된 약물들은 실험군에 처리한 五苓散加減方과 기존 비만치료에 사용되는 약물과 비교하기 위해서 처리한 Reductil<sup>®</sup>이었다..

五苓散은 漢代 張仲景의 <傷寒論>에 “太陽病 發汗後 大汗出 胃中乾 煩燥不得眠 欲得飲水者 脈浮 小便不利 微熱 口渴者”에 사용한다고 수록된 이래로 利水化氣 滲濕하는 효능이 있어서, 水濕停滯와 수분대사장애로 인한 질환의 치료에 사용되어 왔으며, 小便不利 등의 비뇨기계 질환 및 비만의 치료에도 응용되고 있다<sup>22)</sup>. 五苓散의 비만에 대한 영향에 대한 기존 연구들로는 五苓散이 비만유도 백서의 간과 부고환주위의 지방조직, 혈청지질 및 노중 hormone의 변화에 미치는 영향에 관한 임 등<sup>22)</sup>의

연구, 五苓散이 비만유도 흰쥐의 체중 및 혈청지질에 미치는 영향에 대한 이 등<sup>23)</sup>의 연구, 五苓散과 五苓散加蒼朮이 비만백서의 체중에 미치는 영향에 대한 김 등<sup>24)</sup>의 연구 등이 있었다. 또한 五苓散에 加減한 薏苡仁은 健脾 滲濕하는 효능으로 水腫脚氣와 小便不利를 주치하고, 蘿菔子是 消食化痰하는 효능으로 食積氣滯와 胸悶腹脹을 주치하며, 麻黃은 利水消腫하는 효능으로 風水浮腫, 小便不利를 주치하는데<sup>25)</sup>, 이것들은 調胃升清湯의 주요 구성 약물들이며 동시에 임상적으로도 각각 비만의 치료에 많이 사용되고 있는 단미들이다.

또한 양성대조군의 의미로 실험에 사용된 Reductil® 신경절에서 serotonin과 norepinephrine의 재흡수를 억제하는 이중 작용을 나타내는데, 그 기전은 식욕 억제와 발열 반응-에너지 소모증가로 설명할 수 있다. 먼저 식욕 억제 작용에 대한 설명으로, 포만감의 증가에 의해 식욕이 억제되는데, rat을 대상으로 한 연구에서 Reductil® 투여 시에는 생리적 포만감에 의해 먹는 시간이 줄고 그 대신에 휴식하거나 포만감의 반응을 보인다. 이는 단일작용제와 구분되는 것으로 serotonin과 norepinephrine의 상호증진효과에 의한 것으로 보고 되고 있다. 발열 반응-에너지 소모증가에 대한 설명으로, 중추신경계에서 serotonin의 증가는 교감 신경계를 활성화시켜서 갈색 지방 조직에서 발열반응을 증가시킨다. 최근 보고에 의하면, 초저열량 식사 4주후 12개월 동안 Reductil® 10 mg 투여시 첫 6개월 동안 체중감소 후 위약군에 비해 감소된 체중 ( $\pm 7.5$  kg)이 6개월 동안 유지된다고 한다. 체중 감소효과는 용량에 따라 증대되지만, 부작용으로 혈압 상승, 구강 건조, 변비, 불면증이 올 수 있다<sup>3)</sup>.

3T3-L1 adipocyte는 전지방세포의 미분화상태로서 비만의 중요한 유도과정의 하나인 전지방세포의 증식 및 지방세포로의 분화에 영향을 미치는 물질에 대한 탐색과 그 작용과정 연구에 많이 이용되어 왔는데<sup>26,27)</sup>, 五苓散加減方이 3T3-L1 adipocyte의 differentiation에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조

군과 Reductil® 처리군에서는 3T3-L1 adipocyte가 특별한 영향을 받지 않고 differentiation된 것을 관찰할 수 있었고, 五苓散加減方 처리군에서는 3T3-L1 adipocyte의 differentiation이 억제되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.

그리스어로 '수척한'의 의미를 가진 leptos에서 기원한 leptin은 ob-RNA에서 전사된 167 아미노산 단백질로, ob/ob mouse에서 obesity-prone strain의 분자결함을 찾다가 1995년 Friedman 등에 의해 처음 발견되었다. 비만치료를 획기적인 열쇠라고 생각하여 초기에는 adipocyte-derived signaling factor로 설명되었으나, 후에 leptin receptor와의 상호작용으로 체중 조절과 에너지 소비에 관여한다고 소개되고 있다<sup>28)</sup>. 사람의 leptin 유전자는 chromosome 7q31에 위치하고 그 DNA는 15,000 이상의 염기쌍을 가지고 3개의 axon을 갖고 있으며, 주로 지방조직에서 만들어지고, 태반, 태아조직에서도 발견된다.

한편 이렇게 obese gene에 의해 발현되는 leptin은 16,000 MW hydrophilic protein으로 특히 뇌의 지방조직의 크기를 결정하는 white adipocyte에서 분비되는데 이는 lipostatic theory와 관련해 몸의 에너지 조절 역할을 하게 된다. 여러 실험을 통하여 비만 백서에서 재조합 leptin을 투여시 에너지 대사가 줄고 먹이 섭취율이 줄어든다는 연구결과가 발표되었다. 이러한 leptin의 결정적인 표적은 시상하부이고, 여러 기전을 통하여 음식섭취, 에너지소비 및 균형을 조절하고 생식, 조혈기능, 호르몬 및 대사의 기능을 갖는다. 그리고 혈중 leptin은 중성지방의 저장 정도와 지방조직량에 밀접한 연관이 있는데, 이외에도 추위, 운동 등의 환경적인 요인이나 insulin이나 dexamethasone, testosterone 등의 호르몬에 의해서도 영향을 받는다<sup>29)</sup>.

그러나 사람에게 있어서 비만은 동물 모델에서 보이는 바와 같이 단순하지 않고, leptin의 병리, 생리도 복합적인 요인이 작용하는 것으로 생각되어진다. leptin 유전자 변이로 인하여 어려서부터 아주 비만했던 사람에게 leptin을 투여하면 뚜렷한 체중 감소



효과를 나타내었지만, 비만한 사람의 대부분에서 오히려 leptin의 농도가 증가되어 있었고, leptin이 결핍된 사람 중 적은 수에서만 비만이 나타났는데, 이는 비만한 사람에서는 leptin 저항성이 있다는 것을 시사한다. 최근의 모든 임상적 연구자들은 leptin을 항비만 호르몬으로 보고 있으며, 또한 leptin 작용은 음식이 제한된 환경에서는 적합한 기전으로 작용할 것이라고 보고, leptin receptor에 대한 연구와 leptin 저항성에 대한 가설이 성립되어 연구되고 있다<sup>30)</sup>.

五苓散加減方이 배양액 내 leptin 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 五苓散加減方 처리군은 대조군에 비해 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 높은 leptin 함량을 보였으나, 유의성 있는 차이는 보이지 않았으며, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 leptin 함량이 유의성 있게 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ). Reductil<sup>®</sup> 처리군은 대조군에 비해 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 leptin 함량이 유의성 있게 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ). 그리고 五苓散加減方이 배양액 내 leptin receptor 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 五苓散加減方 처리군은 대조군에 비해 0.1, 10, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 leptin receptor 함량이 유의성 있게 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ). Reductil<sup>®</sup> 처리군은 대조군에 비해 10, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 leptin receptor 함량이 유의성 있게 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ).

이상과 같이 五苓散加減方은 3T3-L1 adipocyte의 differentiation을 억제시키며, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 배양액 내 leptin 함량을, 그리고 0.1, 10, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 배양액 내 leptin receptor 함량을 유의성 있게 증가시켰다.

## 結 論

五苓散加減方이 3T3-L1 adipocyte에 미치는 영향을 알아보기 위한 in vitro assay에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 五苓散加減方은 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 배양액 내 leptin 함량을 유의성 있게 증가시켰다. 그리고 0.1, 10, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 배양액 내

leptin receptor 함량을 유의성 있게 증가시켰다.

2. 五苓散加減方은 3T3-L1 adipocyte의 differentiation을 억제하는 역할을 하는 것으로 관찰되었다.

이와 같은 결과를 볼 때, 五苓散加減方은 배양액 내의 leptin 및 leptin receptor 함량에 대한 증가 효과 및 3T3-L1 adipocyte의 differentiation에 대한 억제 효과로 인해 비만에 대해 영향을 미치는 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 한방재활의학회. 한방재활의학회. 서울 : 군자출판사. 2003 : 343-354.
2. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement : Health implications of obesity. Ann Intern Med. 1985 ; 103 : 1073-1077.
3. 대한비만학회. 임상비만학 제2판. 서울 : 고려의학. 2001 : 19, 27-28, 75, 97-105, 309-311.
4. 송윤경, 임형호. 퇴행성 근골격계 질환에 비만이 미치는 영향 (Medline에서 검색한 최신연구논문을 중심으로). 한방재활의학회지. 1998 ; 8(2) : 144-148.
5. Messier SP, Loeser RF, Miller GD, Morgan TM, Rejeski WJ, Sevick MA, Ettinger WH Jr, Pahor M, Williamson JD. Exercise and dietary weight loss in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis : the Arthritis, Diet, and Activity Promotion Trial. Arthritis Rheum. 2004 ; 50(5) : 1501-1510.
6. Kallen CB, Lazar MA. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 1996 ; 93(12) : 5793-5796.
7. 문준전, 안규석, 김성훈, 엄현섭, 지규용, 김정범, 박중현. 傷寒論精解. 서울 : 경희대학교 출판국. 1999 : 176-180.
8. Day C, Bailey CJ. Effect of the antiobesity agent

- sibutramine in obese-diabetic ob/ob mice. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998 ; 22(7) : 619-623.
9. Moreno-Aliaga MJ, Matsumura F. Endrin inhibits adipocyte differentiation by selectively altering expression pattern of CCAAT/enhancer binding protein-alpha in 3T3-L1 cells. *Mol Pharmacol.* 1999 ; 56(1) : 91-101.
  10. Mukherjee R, Hoener PA, Jow L, Bilakovics J, Klausung K, Mais DE, Faulkner A, Croston GE, Patemiti JR Jr. A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2000 ; 14(9) : 1425-1433.
  11. Liu LH, Wang XK, Hu YD, Kang JL, Wang LL, Li S. Effects of a fatty acid synthase inhibitor on adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2004 ; 25(8) : 1052-1057.
  12. Koopman R, Schaart G, Hesselink MK. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol.* 2001 ; 116(1) : 63-68.
  13. 채서일, 김선철, 최수호. SPSS/WIN을 이용한 통계분석. 서울 : 학현사. 2002 : 282-284.
  14. 윤경환, 염승룡, 이정훈, 권영달, 송용선, 신병철, 이수경. 태음인 비만환자의 절식요법전후의 골밀도 변화에 대한 임상연구. *한방재활의학과학회지.* 2002 ; 12(4) : 1-10.
  15. 이재익, 박용권, 김용정, 김경수, 김강산. 太陰調胃湯 전탕액이 비만백서에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2003 ; 24(3) : 497-507.
  16. Allison DB, Saunders SE : Obesity in North America. *Med Clin North Am.* 2000 ; 84 : 305-332.
  17. 이수경. 과체중 및 비만이 건강관련 삶의 질에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지.* 2003 ; 13(4) : 91-98.
  18. 이종호. 비만증의 치료. *대한비만학회지.* 1992 ; 1(1) : 21-24.
  19. 한문식, 이우천, 이춘성. 요추부의 퇴행성 관절염과 비만증과의 관계. *대한정형외과학회지.* 1982 ; 17(6) : 1080-1088.
  20. 정병운, 정지천. 夏枯草가 고지방 식이에 의해 유발된 비만에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2002 ; 23(3) : 386-295.
  21. 신미숙, 최진봉. 調胃升清湯 및 그 加味方이 비만마우스의 체중과 혈청 함량 변화에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지.* 2002 ; 12(1) : 157-166.
  22. 임형호, 이종수, 김성수, 신현대. 五散이 비만유도백서의 간과 부고환주위의 지방조직, 혈청지질 및 뇨중 hormone의 변화에 관한 연구. *한방재활의학과학회지.* 1998 ; 8(2) : 16-41.
  23. 이상봉, 금동호, 이명중. 五苓散이 비만유도 흰쥐의 체중 및 혈청지질에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지.* 1997 ; 7(2) : 189-204.
  24. 김정연, 송용선. 五苓散과 五苓散加蒼朮이 비만백서의 체중에 미치는 영향. *동의물리요법과학회지.* 1994 ; 4(1) : 69-85.
  25. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울 : 영림사. 1998 : 121-123, 306-308, 373-374.
  26. 신병철, 송용선. 防風通聖散이 백서의 비만증 및 비만세포에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지.* 1997 ; 7(1) : 101-119.
  27. 김수익, 송용선. 防己黃芪湯 전탕액이 백서의 실험적 비만증과 전지방세포인 3T3-L1의 지방세포분화에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지.* 1997 ; 7(1) : 120-135.
  28. 김봉찬, 금동호, 이명중. 小青龍湯이 Zucker rat의 비만 및 항산화에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지.* 2002 ; 12(4) : 1-10.
  29. 진경택, 금동호, 이명중. 實脾飲이 Zucker rat의 비만 및 항산화에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지.* 2003 ; 13(2) : 69-85.

강중원 외 3인 : 五苓散加減方이 3T3-L1 adipocyte의 leptin 및 leptin receptor 함량과 differentiation에 미치는 영향 (457)

30. 배정환, 이종수, 정석희, 김성수, 신현대. 淸肺瀉肝湯이 비만유도 흰쥐의 체중, 혈액 및 UCP2 발현에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2002 ; 12(1) : 133-156.