

補氣減肥湯이 고지방사료 식이로 비만이 유발된 생쥐에게 미치는 영향

최정식 · 오민석*

대전대학교대학원 한방재활의학과

Inhibitory Effects of *Bogigambi-tang* on the Obese-mouse Induced by High Fat Diet

Jung Sik Choi, Min Seok Oh*

Department of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

In order to investigate the effects of *Bogigambi-tang*(here in after referred to BGGBT) on the obese gene and obese inhibitory, C57BL/6 mice were induced by high fat diet. C57BL/6 mice were divided into three groups(normal, high fat diet with control, high fat diet with BGGBT extract) and fed for 15weeks. Items of this experimental study are as follows. Body weight change, final increase of body weight, the weight change of the adipocytes in body, the level change of ALT, AST, total cholesterol, LDL-Cholesterol, triglyceride, glucose, free fatty acid and creatinine, the expression of β 3AR and leptin gene in primary adipocytes, the production change of leptin in primary adipocytes, the expression of β 3AR and leptin in adipocytes tissue. The following results have been obtained : All experimental group have shown that the weight and the final increase of weight have decreased considerably. All experimental group have shown that the amount of the adipocyte in weight has decreased considerably. All experimental group have shown that the amount of leptin has decreased considerably. All experimental group have shown that the revelation of β 3AR in primary adipose cell and 3T3-L1 cell has increased considerably, and that the revelation of leptin in primary adipose cell and 3T3-L1 cell has decreased considerably. All experimental group have shown that the size of adipocyte in adipocytes tissue has decreased. The high density group have shown that the adipose vacuoles in liver tissue has decreased considerably, and that the cell nucleuses has similar with normal group.

Key words : *Bogigambi-tang*(BGGBT), obese-mouse, Leptin, β 3AR, 3T3-L1 cell

서론

‘비만’은 체내에 필요한 에너지보다 과다 섭취되거나 섭취한 에너지보다 소비가 부족하여 초과되는 에너지 불균형의 상태를 말하는 것으로 호르몬의 변화, 유전, 정신, 사회·경제적 요인 등 많은 요인이 복합적으로 관련되어 있으며, 성인병 등 질병과의 높은 연관성 때문에 건강을 유지하는 데에 있어서 중요하게 인식되어야 할 문제이다^{1,2)}.

최근 우리나라에서도 비만의 유병율이 점점 높아지고 있는 추세이며, 특히 소아 및 청소년 비만이 급속도로 증가하는 추세

이므로 이에 대한 적극적인 대처가 필요하다^{3,4)}.

특히 비만은 질병과 밀접한 관계를 갖고 있는 바, 많은 연구를 통해서 체질량지수와 사망률 사이에 높은 유의성이 있다는 것이 속속 보고되고 있다. 비만으로 인한 사망률의 증가는 2형 당뇨병, 심혈관질환, 당뇨병, 호르몬 감수성 암과 위장관 암 등에서 명확하게 나타나며, 또한 비만은 비치명적인 요통, 관절염, 불임 등의 신체적 질병과 정신·사회적 기능의 저하 등 정신적 질병의 위험성을 증가시킨다⁵⁾. 한의학에서는 비만을 肥, 肥人⁶⁾, 肥貴人⁶⁾, 肥胖⁷⁾, 肥胖症, 肥胖病⁸⁾ 이라고 표현하고 있으며, 《黃帝內經》의 〈素問·通評虛實論〉⁹⁾에 “肥貴人則膏粱之疾也”라고 하여 膏粱珍味와 甘味の 음식을 많이 먹어서 생긴다고 언급한 이래, 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 등을 유발요인으로 보고 있다^{1,10)}.

* 교신저자 : 오민석, 청주시 상당구 용담동 173-9, 대전대학교 청주한방병원

· E-mail : ohmin@dju.ac.kr, · Tel : 043-339-3721

· 접수 : 2007/03/08 · 채택 : 2007/04/04

비만에 대한 약물치료 연구는 서양 의학적으로 지방의 축적을 억제하는 것과 체내에 축적된 체지방의 이용율을 자극하는 것으로 나누어지며¹⁾, 한의학적으로 太陰調胃湯, 清肺瀉肝湯, 葛根承氣湯, 承氣調胃湯 등의 四象方과 五苓散, 防風通聖散, 防己黃氣湯 등의 後世方 등의 방법으로 나누어 생각할 수 있다¹¹⁾.

이에 저자는 임상적으로 脾胃俱虛 및 痰飲型 비만에 응용되는 補氣減肥湯의 효과를 실험적으로 알아보기 위하여, 고지방 사료의 식이로 비만을 유발한 생쥐를 대상으로 체중 및 유전자 발현, 조직화학적 변화 등을 관찰한 결과 유의성 있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물 및 사료

본 실험을 위하여 사용된 C57BL/6 생쥐(♀, 30마리, 20~24 g)는 한국생명공학연구원에서 분양 받아 고형사료(삼양사)와 고지방 사료(Bio-serv, USA)를 자유 식이하면서 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 유지하여 1주일 간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 일반 사료와 고지방 사료의 kg당 조성의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1, 2).

Table 1. The Components of Normal Diet

Crude protein	22.1%
Crude fat	8.0%
Crude fiber	5.0%
Crude calcium oxide	8.0%
Calcium	0.6%
Phosphorus	0.4%

Table 2. The Components of High Fat Diet

Casein, High protein	26.0%
DL-Methionine	0.4%
Sucrose	16.2%
Corn Starch	16.0%
Beef Tallow	30.0%
Cellulose	5.0%
Mineral Mix, AIN-76	4.5%
Calcium Carbonat	0.4%
Vitamin Mix, Teklad	1.3%
Choline Dihydrogen Citrate	0.2%

2) 약재

본 실험에 사용한 補氣減肥湯(이하 BGGBT라 칭함)의 구성 약재는 대전대학교부속 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 용량은 Table 3과 같다.

3) 시약 및 기기

사용된 시약은 Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), magnesium chloride(MgCl₂; Sigma, USA), RNase inhibitor Promega (Madison, Sigma, USA), 우태아혈청(fetal bovine serum: FBS, Logan, USA.), Hyclone (Logan, USA), agarose(FMC, USA) Hank's balanced

salt solution (HBSS: Gibco BRL Co., USA), 3-(4,5)-dimethyl-thiazol-(2,5)-carboxymethoxy-phenyl-(2,4)-sulfo-phenyl-2H-tetrazolim(MTS), (2,7)-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), collagen type IV, complete adjuvant, glycerol(Sigma Co., USA), bromophenol blue(Sigma Co., USA), tris base(Sigma Co., USA), boric acid (Sigma Co., USA), sodim dodecyl sulfate(SDS: Sigma Co., USA), trypsin-EDTA(Gibco BRL Co., USA), anti-biotic(Gibco BRL Co., USA), formaldehyde(Sigma Co., USA), lysophosphatidic acid (Sigma Co., USA), trypan blue(Sigma Co., USA), phenol red (Sigma Co., USA), sodium azide(Sigma Co., USA), isopropanol (Sigma Co., USA), ethanol(Merck Co., Germany), HCl(Merck Co., Germany), sodium bicarbonate (Sigma Co., USA), glacial acetic acid (Sigma Co., USA), RBC lysis 용액 (Sigma Co., USA), rhTNF-α(R&D system Co., USA), NAzoLB (Tel-Test Inc., USA), Taq polymerase (Intron Co., Korea), deoxy- nucleotide triphosphate (Takara Co., Japan), TNF-α ELISA kit(R&D system Co., USA)을 사용하였다.

사용된 기기는 열탕추출기(대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator(Forma scientific Co., USA), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), water bath(Vision scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), blood glucose meter(LifeScan, USA), spectro- photometer (Shimadzu, Japan), centrifuge(Sigma, USA), deep-freezer(Sanyo, Japan), thermocycler system(MWG Biotech, Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker(Lab-Line, USA) 및 ELISA reader (Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

Table 3. The Compositions of Bogigambi-tang(BGGBT)

韓 藥 名	生 藥 名	用 量(g)
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	8
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	8
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	6
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	6
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
紅花	<i>Carthamus Tinctorius L.</i>	4
蘇木	<i>Sappan Lignum</i>	4
木通	<i>Akebiae Caulis</i>	4
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	4
防己	<i>Sinomenii Caulis et Rhizoma</i>	4
白茯苓	<i>Hoelen</i>	4
厚朴	<i>Machili Cortex</i>	4
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	4
半夏	<i>Pinelliae Tuber</i>	4
南星	<i>Arisaemalis Rhizoma</i>	4
淫羊藿	<i>Epimedii Herba</i>	3.2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3.2
牛膝	<i>Achyranthis Radix</i>	8
陳皮	<i>Auratii Nobilis Pericarpium</i>	4
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	6
鷄血藤	<i>Spatholobi Caulis</i>	6
麥門冬	<i>Liriope Tuber</i>	8
Total amount		114.4

2. 방법

1) 검액의 조제

BGGBT 2철을 증류수 1,300 ml에 넣어 2시간 동안 가열 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 31.6 g의 분말을 얻었다. 얻어진 분말은 냉동고에서 보관하며 필요한 농도로 생리 식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 사료의 식이와 검액의 투여

실험군은 크게 일반 사료군(정상군), 고지방 사료군(대조군), reductil(양성대조군), BGGBT 투여군으로 나누어 12주 동안 자유식이 하였다. 검액의 경우 투여는 정상군과 대조군은 증류수를, BGGBT투여군은 각각 500, 250mg/kg 농도로 물에 타서 12주간 매일 경우 투여하였다.

3) 체중 및 식이량 측정

7일 간격으로 동물의 체중과 식이 섭취량을 0.1 g 단위까지 측정하였다.

4) 지방 체세포내 비만세포 발현량 분석

(1) In vitro

지방세포로 분화된 3T3-L1 세포를 2% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에 1 mg/ml의 collagenase IV를 가한 용액에 넣고, 37°C, shaking 배양기에서 30분 동안 분해하여 지방 체세포를 분리하였다. 분리된 지방 체세포는 배지로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 여기에 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포 수를 측정하였다. 3일간 24 well plate에 지방 체세포(1×10⁵cells)를 배양한 후 여기에 BGGBT(100, 50 µg/ml)를 처리하여 8시간 배양한 후 RNAzolB를 사용하여 total RNA를 추출하였다.

(2) In vivo

① 지방세포 분리 배양 및 ELISA 측정

C57BL/6 생쥐에 fat-diet를 12주간 식이토록 한 후 체중이 증가되면 경추 탈골로 치사시킨 후 복강 내 지방세포를 분리하였다. 조직을 잘게 절편 한 후 2% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에 1 mg/ml의 collagenase IV를 가한 용액에 넣고 37°C, shaking 배양기에서 30분 동안 5회 이상 조직을 분해하여 지방세포를 분리하였다. 분리된 지방세포는 배지로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거한다. 이들 세포들로부터 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다. 지방세포를 10% FBS-DMEM 배지에 7일간 배양한 후 24 well plate에 5×10⁵ 세포씩 분주한다. 배양한 후 BGGBT (100, 50µg/ml)를 처리하고 48시간 배양하였다.

TNF-α 및 leptin의 배양상등액 내의 측정은 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 생산량을 분석하였다. 각 well에 배양상등액 100 µl 씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 µl를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시

세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 µl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 µl의 stop 용액을 처리한 다음 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② 지방세포내 leptin과 β3AR(β3-adrenergic receptor gene) 발현량 조사

C57BL/6 생쥐를 치사시킨 후 복강 내의 지방세포를 떼어내어 액체 질소를 이용하여 균질화한 후 RNAzolB 700 µl씩 첨가하여 세포막을 터트린 후, RNAzolB의 1/10 양에 해당하는 CHCl₃(chloroform)을 넣은 후 15초간 vortex로 혼합하고 얼음에서 15분간 방치하였다. 4°C 13,000rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 취하여 동량의 iso-propanol과 혼합하여 다시 15분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 1 ml의 70% EtOH을 넣고 washing한 후 상온에서 건조시켰다. 추출한 total RNA는 DEPC를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 75°C에서 5분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 µl 10 mM dNTPs-mix, 1 µl random sequence hexanucleotides(25 pmol/25µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor(20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1µl의 M-MLV RT(200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 37°C 항온 수조에서 1시간 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한다 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

합성된 cDNA 중 1 µl를 사용하여 20 µl의 PCR 반응액(10 mM Tris- Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 7.5 mM 4NTPS, 20 pmol sense, antisense primers, 2 units Taq polymerase)을 제조하였다. PCR 반응액은 turbo thermocycler system을 사용하여 predenaturation 3분, denaturation 94°C, 1분; annealing 55°C, 1분; extention 72°C, 1분 패턴으로 30회 반복하였다. 각 primer의 특성에 따라서 annealing 온도를 변화시켰으며 반응 산물은 1% agarose gel에서 전기 영동하여 분석하였다. 각각의 PCR에 사용된 oligonucleotide의 염기 배열은 다음과 같다(Table 4).

Table 4. A Base Sequence of Mouse Oligonucleotide

Gene	Primer	Sequence
β3AR	sense	5'-CCGTCGATAGTGGCATCCATGAAAC-3'
	antisense	5'-GGACCAATACCTGCTATAGGG-3'
Leptin	sense	5'-AACCCCTACTGAACCTCAGATTGTTAG-3'
	antisense	5'-TAAGTCAGTTAAATGCTTAGGG-3'

5) 조직검사

Ether로 마취하여 심장 천자를 통해 혈액을 채혈하고 흉부 및 복강을 절개하여 liver와 adipocyte tissue를 적출하였다. 각 실험군 별로 적출한 조직은 10% 중성 포르말린에 48시간 고정하여 고정이 완료된 각 조직들은 흐르는 수돗물에서 12시간 수세하여 조직 내 고정액을 완전 제거하였다. 조직의 탈수를 위해 60%에서부터 100% 알코올에 이르기까지 농도 상승 순으로 통상

의 방법에 따라 탈수하고, xylene에 투명과정을 거친 다음 파라핀 블럭을 제작하였다. 제작된 블럭은 박절기(microtome)를 이용하여 3~4 μm 두께로 절편을 만들어 탈 파라핀 및 함수과정을 거친 다음 hematoxyline과 eosin(H&E) 일반 염색을 실시하여 광학 현미경상에서 관찰 및 촬영 하였다(Table 5).

Table 5. Tissue Preparation Processing

FIXATION	10% Neutral Formalin	48 hrs
	↓ Washing	Tab water, 12hrs
DEHYDRATION	60%, 70%, 80%, 90%, 100% Ethyl Alcohol	1 to 2 hrs, each
	↓	
CLEARING	Xylene	1 to 2 hrs, each, 2 times
	↓	
INFILTRATION	Xylene : Paraffin, Paraffin	2 hrs, soft and hard each
	↓	
EMBEDDING	Paraffin Wax	
	↓	
SECTION	Microtome	3-4μm
	↓	
STAIN	Hematoxylin & Eosin	Hematoxylin : 5 mins Eosin : 1min
	OBSERVATION	

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리 하였으며 P<0.05, P<0.01 및 P<0.001 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 체중 변화에 미치는 영향

정상군과 대조군의 체중은 15주에 29.2±0.8, 40.2±2.2 g 으로 나타났다. 양성대조군(reductil)은 28.6±0.3 g 으로 나타났고, BGGBT 투여군은 4주까지 동일한 양상으로 진행되다가, 8주부터 대조군에 비해 큰 폭으로 감소하여 15주째에는 500, 250 mg/kg 농도 투여군에서 31.6±2.2, 34.8±0.9 g 으로 나타났었다(Fig. 1).

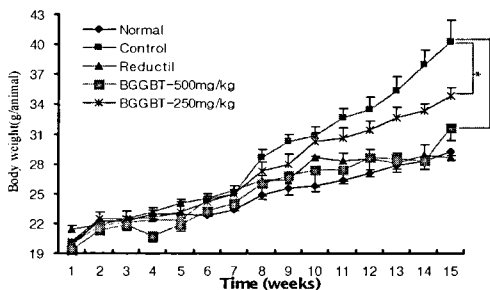


Fig. 1. Effect of BGGBT extract on the body weight change in high fat diet-induced obesity mice. Time course of food intake was measured for body weight change on one interval day. All mice were conducted one for free-diet and not supplemented diet mice control group. The results are expressed the mean±SE (N = 10). Statistically significant value compared with final control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

2. 최종 체중 증가량에 미치는 영향

정상군의 최종 체중 증가량은 9.3±0.8 g이었고, 대조군은 20.3±2.0 g, 양성대조군(reductil)은 7.2±0.6 g이었다. 이에 비해 BGGBT 500 mg/kg 농도 투여군에서는 13.8±1.5 g, 250 mg/kg 농도 투여군에서는 14.7±0.9 g으로 나타나, 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소효과를 나타내었다(Fig. 2).

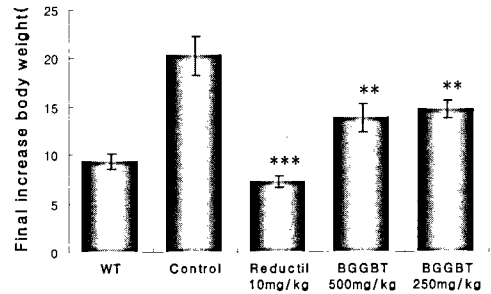


Fig. 2. Effect of BGGBT extract on the final increase body weight in high fat diet-induced obesity mice. Time course of food intake was measured for final increase body weight on one interval day. All mice were conducted one for free-diet and not supplemented diet mice control group. Mice were used in group of 10. The results are expressed the mean±SE (N = 10). Statistically significant value compared with final control group data by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

3. 체중내 adipocyte 중량에 미치는 영향

체중내 adipocyte 중량은 정상군이 2.1±0.3 g, 대조군이 10.9±2.2 g, 양성대조군(reductil)이 0.8±0.1 g으로 나타났으며, BGGBT 투여군은 500 mg/kg 농도 투여군에서 4.3±1.5 g, 250 mg/kg 농도 투여군에서 5.2±0.7 g으로 나타나 모든 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소효과를 나타내었다(Fig. 3).

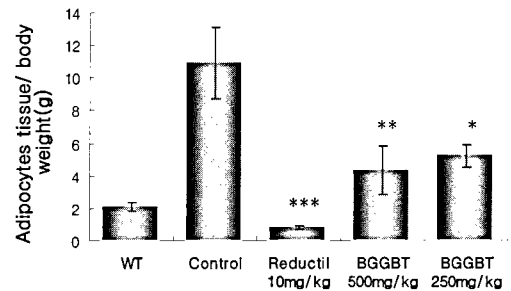


Fig. 3. Effect of BGGBT extract on the adipocytes tissue/ body weight(g) in high fat diet-induced obesity mice. C57BL/6 mouse fed High Fat Diet for 15 weeks, Reductil(positive control) and BGGBT extract(500 mg/kg and 250 mg/kg) during 8weeks. Time course of food intake was measured for percentage of final adipocytes tissue/body weight on one interval day. All mice were conducted one for free-diet and not supplemented diet mice control group. The results are expressed the mean±SE(N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

4. Leptin 변화에 미치는 영향

Leptin 변화는 정상군이 5.1±1.6 mg/dl, 대조군이 26.7±3.2 mg/dl로 나타났으며, 양성대조군(reductil)은 11.2±2.8 mg/dl, BGGBT는 500, 250 mg/kg 농도 투여군에서 15.7±3.2, 22.6±5.6 mg/dl로 나타나, 양성대조군과 BGGBT 고농도 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 6).

Table 6. Effects of BGGBT Extract on Leptin Level in high Fat Diet-induced Obesity Mice

Group	Normal ¹⁾	High Fat diet Intake			
		Control ²⁾	Reductil ³⁾ 10 mg/kg	BGGBT ⁴⁾ 500 mg/kg	BGGBT ⁵⁾ 250 mg/kg
Leptin (mg/dl)	5.1±1.6	26.7±3.2	11.2±2.8**	15.7±3.2*	22.6±5.6

¹⁾ Normal diet group, ²⁾ High fat diet group, ³⁾ High fat diet and Reductil 10 mg/kg, ⁴⁾ High fat diet and BGGBT 500 mg/kg, ⁵⁾ High fat diet and BGGBT 250 mg/kg. Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

5. Primary adipose cell에서의 유전자 발현에 미치는 영향

1) β3AR 발현에 미치는 영향

β3AR 발현은 대조군이 1±0.131, 양성대조군(reductil)이 5.44±0.152, BGGBT는 250, 500 mg/kg 농도 투여군에서 각각 2.53±0.487, 3.88±0.14로 나타나 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성이 있었다(Fig. 4).

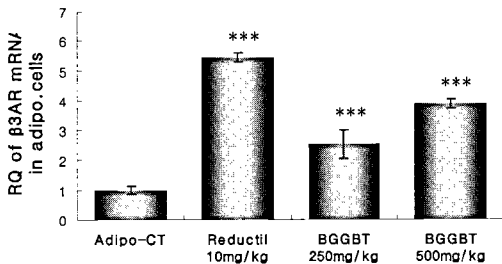


Fig. 4. Effects of BGGBT on the β3ARmRNA gene expression in adipocytes tissue in normal and Fat-diet induced C57BL/6 mice. C57BL/6 mouse fed High Fat Diet for 15 weeks, Reductil(positive control, 10 mg/kg) and BGGBT extract(500, 250 mg/kg) during 8weeks. Real-time-PCR of β3AR and BGGBT relative in high fat-diet adipocytes tissue. Adipocytes tissue were isolated mRNA and RQ of β3AR mRNA expression for analyzed by real-time PCR. The results are expressed the mean±S.E(N=5). Statistically significant value compared with adipo-control group data by T test(***p<0.001).

2) Leptin 발현에 미치는 영향

Leptin 발현은 대조군이 1±0.042, 양성대조군(reductil)이 0.362±0.068, BGGBT는 250, 500 mg/kg 농도 투여군에서 각각 0.848±0.112, 0.658±0.101로 나타나, 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소효과를 나타내었다(Fig. 5).

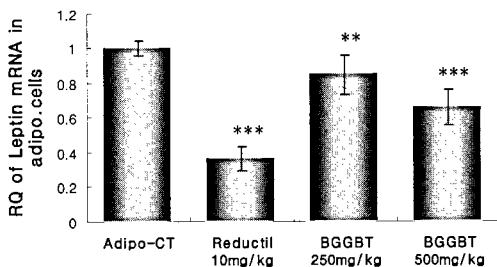


Fig. 5. Effects of BGGBT on the Leptin mRNA gene expression in adipocytes tissue in normal and Fat-diet induced C57BL/6 mice. C57BL/6 mouse fed High Fat Diet for 15 weeks, Reductil(positive control) and BGGBT extract(500, 250mg/kg) during 8weeks. Real-time-PCR of Leptin and BGGBT relative in high fat-diet adipocytes tissue. Adipocytes tissue were isolated mRNA and RQ of Leptin mRNA expression for analyzed by real-time PCR. The results are expressed the mean±S.E(N=5). Statistically significant value compared with adipo-control group data by T test(**p<0.01, ***p<0.001).

6. 3T3-L1 cell에서의 유전자 발현에 미치는 영향

1) β3AR 발현에 미치는 영향

β3AR 발현은 대조군이 1±0.026, 양성대조군(reductil)이 5.53±0.227, BGGBT는 50, 100 μg/ml 농도 투여군에서 각각 1.91±0.026, 4.39±0.469로 나타나 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성이 있었다(Fig. 6).

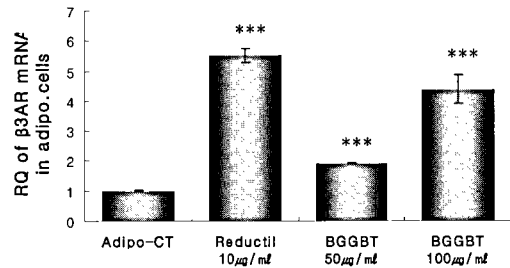


Fig. 6. Effects of BGGBT extract on the β3AR mRNA gene expression in 3T3-L1 adipocytes co-cultured with reductil(10 μg/ml) and 50, 100 μg/ml of BGGBT for 8hrs. Effect of insulin/dexamethasone/IBMX (I/D/M) (k) and insulin/ indomethacin (I/I) (m) differentiation methods on β3AR mRNA in cultured 3T3-L1. Real-time-PCR of β3AR and GPDH relative in co-cultured 3T3-L1 adipocytes cells. 3T3 adipocytes cells were isolated mRNA and RQ of β3AR mRNA expression for analyzed by real-time PCR. The results are expressed the mean±S.E(N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test(***p<0.001).

2) Leptin 발현에 미치는 영향

Leptin 발현은 대조군이 1±0.038, 양성대조군(reductil)이 0.125±0.078, BGGBT는 50, 100 μg/ml 농도 투여군에서 각각 0.758±0.104, 0.355±0.098로 나타나, 모든 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 7).

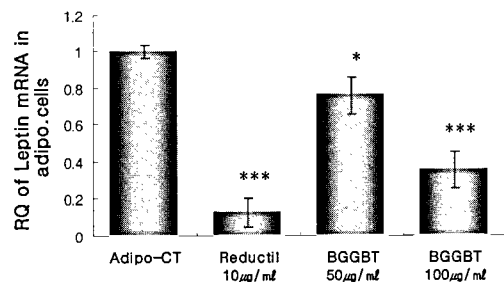


Fig. 7. Effects of BGGBT extract on the Leptin mRNA gene expression in 3T3-L1 adipocytes co-cultured with reductil (10 μg/ml), and 50, 100 μg/ml of BGGBT for 8hrs. Effect of insulin/dexamethasone/IBMX (I/D/M) (k) and insulin/ indomethacin (I/I) (m) differentiation methods on Leptin mRNA in cultured 3T3-L1. Real-time-PCR of Leptin and GPDH relative in co-cultured 3T3-L1 adipocytes cells. 3T3 adipocytes cells were isolated mRNA and RQ of Leptin mRNA expression for analyzed by real-time PCR. The results are expressed the mean±S.E(N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test(*p<0.05, ***p<0.001).

7. 조직학적 변화

1) Adipocyte

사진에서 보듯이 정상 adipose 조직인 A에 비하여 고지방 사료로 비만을 유도한 대조군 B는 adipocytes의 크기가 정상군에 비하여 증가하였고, BGGBT를 투여한 실험군 C, D는 대조군

에 비하여 상대적으로 adipocytes의 크기가 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 이들의 다양한 형태를 비교해 볼 때 농도의 존적 감소로 평가하기에 어려웠다(Fig. 8).

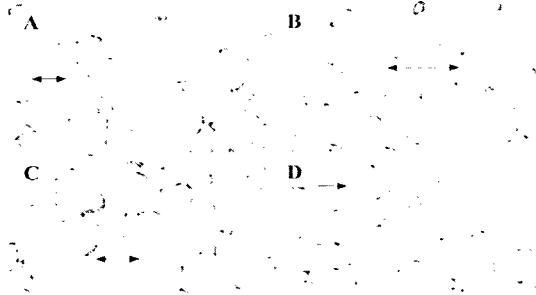


Fig. 8. Histological analysis of adipocytes tissue of normal and Fat-diet induced C57b/6 mice. Adipocytes tissue were isolation from normal and High Fat-diet induced obesity C57b/6 mice. Normal adipocytes tissue(A: not treated group). High Fat-diet induced mouse adipocytes tissue(B: control). High Fat-diet induced mouse adipocytes tissue(C: BGGBT, 500 mg/kg, D: BGGBT, 250 mg/kg). They were sacrificed, liver was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope(Nikon, ×100).

2) 간(Liver)

대조군 B에서는 핵주위에 광범위하게 지방 空胞가 관찰되고, 空胞로 인해 세포질 안의 핵이 주변으로 밀려져 있으며, 쿠퍼세포 역시 현저히 감소함을 알 수 있었다. BGGBT의 고농도 투여군 C에서는 간세포 내 지방 공포의 증가로 정상적인 간세포의 크기보다 커져 있지만, 전반적으로 대조군에 비하여 현저하게 지방 공포가 줄어들었으며, 핵 역시 정상군과 유사하게 뚜렷한 모습을 나타내었다. 저농도 투여군 D에서는 대조군에 비하여 상대적으로 지방 공포가 감소하였으나 큰 차이는 나타나지 않았다(Fig. 9).

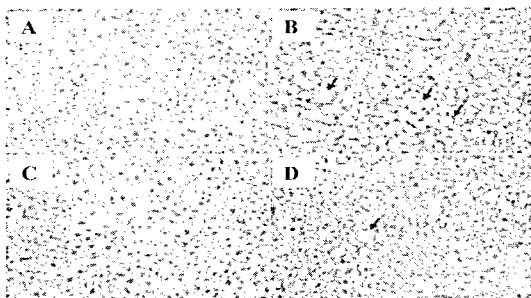


Fig. 9. Histological analysis of liver tissue of normal and Fat-diet induced C57b/6 mice. Liver tissue were isolation from normal and High Fat-diet Induced obesity C57b/6 mice. Normal liver tissue(A, not treated group). High Fat-diet induced mouse liver tissue(B, control). High Fat-diet induced mouse liver tissue(C: BGGBT, 500 mg/kg, D: BGGBT, 250 mg/kg). They were sacrificed, liver was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at bright microscope(Nikon, ×100).

고 찰

식생활의 서구화로 비만 인구가 증가하면서 비만은 건강의 중요한 문제로 인식되고 있다. 국내의 비만 유병률 역시 경제 성장과 함께 최근 급속하게 증가하고 있다. 국민건강영양조사에 의

하면 대한비만학회 기준(BMI≥25)에 의한 비만 유병률은 1995, 1998, 2001, 2005년 각각 20.5, 26.3, 29.6, 31.7%로 이환 환자의 수가 증가하는 추세이다^{3,4)}.

우리나라에서도 1990년대부터 비만 치료에 대한 사회적 관심이 높아지고 비만과 관련된 학회들이 생겨나면서 비만에 관련된 연구들이 다각도에서 활발하게 진행되고 있다¹²⁾. 1984년부터 2002년까지 국내에서 발표된 비만연구의 경향은 비만의 행동적 측면 및 예방, 소아 비만, 비만의 역할과 건강에 미치는 영향에 관한 연구들이 많았으며, 비만세포의 생리나 유전학에 관한 연구는 적었다고 보여지고 있다¹³⁾.

비만이란 과잉체중의 상태를 말하는 것이 아니라 대사 장애로 인해 지방이 과잉 축적된 상태를 말한다. 즉 신체활동과 성장에 필요한 에너지보다 칼로리의 섭취가 초과되어 중성지방의 형태로 지방조직에 과잉 축적된 열량 불균형으로 일어난다²⁾.

비만이 심혈관계질환 위험인자와 밀접한 관계를 가지고 있음은 여러 연구에서 알려져 있는데, Hubber 등¹⁴⁾은 총콜레스테롤, 수축기 혈압, 흡연, 내당 불내성, 좌심실비대와 관련이 있음을, Van Itallie 등¹⁵⁾은 고혈압, 당뇨병, 고콜레스테롤혈증을 유발함을 보고하였다. 이 외에도 사회적 편견 및 우울증, 정신불안, 월경이상, 불임, 동맥경화, 중풍, 지방간 등을 유발하고 있어 4대 성인병의 하나로 인식되고 있다¹⁶⁾.

비만의 약물에 대한 연구는 전 세계적으로 다양하게 진행되고 있다. 현재 미국 FDA에 비만치료 약물로 승인을 받은 *reductil*이라는 제품은 *sibutramine*으로 *noradrenaline*과 *serotonin* 재흡수를 차단하여 포만감을 증대시키고 약간의 열 발생을 통해 체중 감량을 유발한다. 부작용으로는 구갈, 변비, 불면 등이 있다. *Xenical*이라는 제품으로 판매되는 *Orlistat*은 위장관의 *lipase* 억제제로 식이지방의 흡수를 저해하여 체중 감량을 일으키는 비만 치료제인데, 부작용으로는 잦은 방귀, 기름변, 변실금, 복통 등이며 지방 섭취량이 많을수록 자주 나타난다¹⁷⁾. 비만치료에 사용되는 약물들이 가지는 이러한 부작용과 독성이 문제점으로 제기되고 있는 것이 사실이며, 따라서 이들 제제에 비하여 부작용이 적다고 생각되는 한약에 대한 연구가 필요하다고 하겠다.

한의학에서는 비만을 肥, 肥人⁵⁾, 肥貴人⁶⁾, 肥胖⁷⁾, 肥胖症, 肥胖病⁸⁾이라고 표현하고 있다. 비만의 원인에 대해서는 《黃帝內經》의 〈素問·通評虛實論〉⁹⁾에 “肥貴人則膏粱之疾也”라고 하여 膏粱珍味와 甘味の 음식을 많이 먹어서 생긴다고 처음으로 언급한 이후, 朱¹⁸⁾는 “肥人氣虛生痰 寒生濕 濕生痰 故肥多寒濕”이라 하여 濕과 痰을, 張¹⁹⁾은 “肥人多氣虛也……故肥人多氣虛之症 然肥人多濕多滯多有不利”라 하여 氣虛와 濕滯를, 李²⁰⁾는 “脾胃俱實 則能食而肥 脾胃俱虛 則不能食而瘦 成少食而肥 雖肥而四肢不舉 蓋脾實而邪氣盛也”라 하여 脾胃俱虛를, 劉²¹⁾는 “血實氣虛則肥 所以肥者能寒不能熱 由寒則傷血”이라 하여 血實氣虛 등을 원인으로 보고 있다.

비만을 일으키는 과정은 膏粱厚味한 음식을 過食하거나 多食하면 脾胃의 運化작용을 실조케 하고 비위의 운화기능이 실조되면 熱이 발생하며, 熱이 성하면 津液을 灼하고 陰液이 耗傷하여 음식을 求하게 되므로 음식섭취가 왕성하게 되어 비만이 되는 것으로

보고 있다. 氣虛하면 운화기능이 무력해져 濕痰이 발생하여 비만을 야기하며, 濕痰은 체내의 수액대사 기능이 실조되어 나타나는 병리적 산물임과 동시에 체내의 수액대사를 실조케 하는 요인으로 濕痰이 체내에 형성되면 비만을 야기하는 것으로 볼 수 있다¹⁾.

한의학 분야에서는 비만에 관한 연구가 1990년 무렵 시작되었고 1999년 이후 급증하였으며, 처방으로 太陰調胃湯, 淸肺瀉肝湯, 葛根承氣湯, 承氣調胃湯 등의 四象處方과 五苓散, 防風通聖散, 防己黃氣湯 등의 後世方處方이 많이 사용되었고, 단미제로 人蔘, 桔梗, 冬瓜子, 熟地黃, 大黃, 拘杞子, 蒼朮 등이 연구되었다¹¹⁾.

이에 저자는 脾虛와 水濕停滯를 치료하여 임상적으로 비만에 응용되어 지는 補氣減肥湯을 사용하게 되었는데, 이는 黃芪, 山藥 등의 補氣, 熟地黃, 當歸, 川芎, 茯苓 등의 補血, 紅花, 蘇木 등의 活血祛瘀, 木通, 澤瀉, 防己 등의 祛濕, 麻黃 등의 發散하는²²⁾ 의미를 가지고 있다. 비만에 미치는 영향을 확인하기 위해서 체중의 변화, 혈액학적 변화, 비만에 관여하는 유전자의 발현, 조직화학적 변화 등을 관찰하였다.

먼저 補氣減肥湯과 체중과의 관계에 있어 정상군의 체중 변화는 15주에 29.2±0.8 g으로 나타났고, 대조군의 체중 변화는 지속적인 증가를 나타내어 15주에는 40.2±2.2 g으로 나타났다. 이에 비해 양성대조군(reductil)은 28.6 ±0.3 g으로 나타났고, BGGBT 투여군은 4주까지는 동일한 양상으로 진행 되다가, 8주부터는 대조군에 비하여 큰 폭으로 감소하여 15주째 500 mg/kg 농도 투여군은 31.6±2.2 g, 250 mg/kg 농도 투여군은 34.8±0.9 g으로 나타났다(Fig. 1).

실험결과 15주 후 측정된 체중은 정상군은 9.3±0.8 g이 증가하였고, 대조군은 20.3±2.0 g, 양성대조군(reductil)은 7.2±0.6 g이 증가하였다. 이에 비해 BGGBT 500 mg/kg 농도 투여군에서는 13.8±1.5 g, 250 mg/kg 농도 투여군에서는 14.7±0.9 g으로 나타나, 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타내어(Fig. 2) 補氣減肥湯이 체중조절에 일정한 역할을 한 것으로 생각된다.

Adipocyte는 지방 세포로 체중 변화와 비만의 지표로 의의가 있는데^{23,24)}, 체중 내 adipocyte 중량에 미치는 영향에서는 정상군이 2.1±0.3 g, 대조군이 10.9±2.2 g, 양성대조군(reductil)이 0.8±0.1 g으로 나타난 반면, BGGBT 투여군은 500 mg/kg 농도 투여군에서는 4.3±1.5 g, 250 mg/kg 농도 투여군에서는 5.2±0.7 g으로 나타나 모든 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타내어(Fig. 3) 補氣減肥湯이 양성대조군인 Reductil 만큼의 지방세포 감소를 나타내지는 않았지만, 농도 의존적으로 지방세포를 감소시킴을 확인할 수 있었다.

Leptin은 에너지 평형 뿐 아니라 체지방량과 유의한 상관성을 갖는다. Leptin은 영양 상태에 비례하여 지방세포의 비만 유전자에서 생성 분비되어 뇌의 시상하부에 있는 포만중추를 자극하는 식욕조절 인자로 발열 반응(thermogenesis)과 활동량을 증가시키고 섭취량을 감소시키며, 시상하부의 궁상속(arcuate)과 복내측핵(ventromedial nuclei) 부분에 존재하는 leptin 수용체와 결합하여 식욕조절 물질인 neuropeptide Y 등에 직접 작용하여 체중 및 식욕을 조절함으로써 비만을 억제하고, 체중과 체지방량을 감소시키는 역할을 한다^{25,26)}. 비만 조절에 있어서 고지방식이

로 비만을 유도한 후에 혈중 leptin의 변화에 대한 연구에서 고지방식이 섭취 시 마우스의 혈중 leptin 농도가 유의하게 증가하였으며²⁷⁾, 고지방식에서 혈액 중의 leptin 농도가 증가하다가 절식 시에는 감소하는 연구 결과가 보고되었다²⁸⁾.

본 실험에서 leptin의 변화는 정상군이 5.1±1.6 mg/dl, 대조군이 26.7±3.2 mg/dl로 나타난 반면, 양성대조군(reductil)은 11.2±2.8 mg/dl, BGGBT 500 /kg 농도 투여군은 15.7±3.2 mg/dl, 250 mg/kg 농도 투여군은 22.6±5.6 mg/dl로 양성대조군과 고농도 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타냈다(Table 6).

β3AR은 비만 유전자로 알려져 있는데, 이는 일반 지방세포 뿐 아니라 주로 갈색 지방세포에 분포하며 카테콜라민에 반응하여 지방 분해와 열 생성에 관여하며, 지방세포의 크기나 분포 및 비만 방지 호르몬으로 알려진 leptin의 분비에 관여할 것으로 생각되고 있다²⁹⁾.

Primary adipose cell에서의 β3AR 발현에 미치는 영향은 대조군이 1±0.131, 양성대조군(reductil)이 5.44±0.152, BGGBT 250, 500mg/kg 농도 투여군이 각각 2.53±0.487, 3.88±0.14로 나타나 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성이 있었다(Fig. 4). Leptin 발현에 미치는 영향은 대조군이 1±0.042, 양성대조군(reductil)이 0.362±0.068, BGGBT 250, 500mg/kg 농도 투여군이 각각 0.848±0.112, 0.658±0.101 로 나타나, 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소효과를 나타내었다(Fig. 5).

3T3-L1 cell에서의 β3AR 발현은 대조군이 1±0.026, 양성대조군(reductil)이 5.53±0.227, BGGBT 50, 100 μg/ml 농도 투여군이 각각 1.91±0.026, 4.39±0.469로 나타나 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성이 있었다(Fig. 6). Leptin 발현은 대조군이 1±0.038, 양성대조군(reductil)이 0.125±0.078, BGGBT 50, 100 μg/ml 농도 투여군이 각각 0.758±0.104, 0.355±0.098로 나타나, 모든 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 7).

조직화학적 변화로 adipose 조직은 큰 lipid droplets로 이루어져 있는데, plasma membrane 쪽으로 세포핵이 있고, 그 주변이 signet-ring 모양을 하는 white fat 세포로 이루어져 있다. 즉, 세포 중심은 lipid vacuole(clear space)이고, 그 주위는 unilocular 세포 또는 polygonal 세포로 이루어져 있다. 본 실험 성적에서 정상 adipose 조직에 비하여 고지방 사료로 비만을 유도한 대조군은 adipocytes의 크기가 정상군에 비하여 증가하였고, BGGBT를 투여한 실험군은 이런 대조군에 비하여 상대적으로 adipocytes의 크기가 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 다양한 형태를 비교해 볼 때 농도 의존적 감소로 평가하기에 어려웠다(Fig. 8). 따라서 고지방 사료로 비만을 유발한 생쥐에게서 조직화적으로 지방세포의 크기가 커진데 대하여 補氣減肥湯을 투여하여 그 크기가 감소함을 관찰할 수는 있었으나, 그것이 補氣減肥湯에 농도 의존적으로 감소하였는지는 단정하기가 어려웠다.

간의 조직에서 정상군 간세포의 핵은 크고 대체로 동글고 세포의 중앙에 위치하고 있으며 간세포 사이사이에 쿠퍼세포도 전체적으로 고르게 퍼져 있는 반면, 고지방 사료를 먹어 비만을 유도한 대조군에서는 핵주위에 광범위하게 지방 空胞가 관찰되며 空胞로 인해 세포질 안의 핵이 주변으로 밀려져 있고, 쿠퍼세포 역시 현저히 감소함을 알 수 있었다. 이에 반해, BGGBT 투여

군의 고농도에서는 간세포 내 지방 공포의 증가로 정상적인 간세포의 크기보다 커져 있지만 전반적으로 대조군에 비하여 현저하게 지방 공포가 줄어들었으며, 핵 역시 정상군과 유사하게 뚜렷한 모습을 나타내었다. 저농도 투여군에서는 대조군에 비하여 상대적으로 지방 공포가 감소하였으나 큰 차이는 나타나지 않았다(Fig. 9). 고지방 사료로 비만을 유발한 생쥐에게서 간 조직의 지방공포가 커진데 대하여 補氣減肥湯을 투여하여, 저농도에서는 큰 차이를 알 수는 없었으나 고농도 투여군에서 정상군과 유사한 지방공포의 모습을 관찰할 수 있어서 간 조직 내의 효과적인 변화를 알 수 있었다.

이상과 같이 고지방 사료의 섭취로 유도된 비만 생쥐에서 補氣減肥湯을 투여하여 체중의 변화 및 혈액학적 지표 외에도 비만 유전자의 발현 및 조직학적인 변화를 관찰하여 유의성 있는 성적을 얻었는바, 補氣減肥湯은 비만치료에 유효할 것으로 생각된다.

결 론

補氣減肥湯이 비만에 미치는 영향을 알아보고자 고지방 사료의 식이로 비만이 유발된 생쥐를 이용하여 체중의 변화, 비만에 관여하는 유전자의 발현, 조직학적인 변화 등을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

체중 및 체중의 최종 증가량은 모든 실험군에서 유의성 있게 감소하였다. 체중 내 adipocyte 증량은 모든 실험군에서 유의성 있게 감소하였다. Leptin은 고농도 실험군에서 유의성 있게 감소하였다. Primary adipose cell과 3T3-L1 cell에서 β 3AR 발현은 모든 실험군에서 유의성 있게 증가하였고, leptin 발현도 모든 실험군에서 유의성 있게 감소하였다. Adipocyte 조직의 크기는 실험군에서 감소하였다. 간 조직은 고농도 실험군에서 脂肪 空胞가 현저히 줄어들었으며, 핵 역시 정상군과 유사하게 뚜렷한 모습을 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때에 補氣減肥湯은 비만 유전자의 발현변화를 유도하며 영양 상태를 보존하면서 혈청 중의 비만지표를 감소시켜 체중의 감소 및 조직학적 변화를 가져오는 것으로 보이며, 따라서 비만치료에 적극적으로 활용될 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

1. 한방재활의학회. 한방재활의학회. 군자출판사, 서울, pp 384-396, 2005.
2. 대한비만학회. 임상비만학. 고려의학, 서울, pp 26, 40, 89, 95, 204-205, 219, 407-414, 2001.
3. 강재현, 김남순. 한국의 비만 추이. 대한비만학회지 11(4):331-336, 2002.
4. 보건복지부. 김진조사. 2005 국민건강영양조사 pp 38-44, 2006.
5. 郭霸春. 黃帝內經靈樞. 일중사, 서울, pp 290, 396-397, 1992.
6. 王機. 黃帝內經素問今釋. 성보사, 서울, p 146, 1983.
7. 傅靑主, 葉天士. 傅靑主男女科·葉天士女科. 대성출판사, 서울, p 106, 1984.
8. 陳貴廷, 楊思澍. 實用中西醫結合診斷治療學. 북경, 중국의학 과기출판사, p 682, 1991.
9. 洪元植. 精校 黃帝內經. 서울, 동양의학연구원 출판부, pp 107-111, 176-179, 188-191, 255-259, 1985.
10. 中醫研究院 主編. 中醫症狀鑑別診斷學. 北京, 人民衛生出版社, p 43, 1987.
11. 진광선. 비만의 연구 동향에 대한 분석. 대전대학교대학원, 2004.
12. 대한가정의학과 비만연구회 편역. 비만치료의 최신지견. 한미의학. 서울, pp 21-31, 35-37, 291-292, 2005.
13. 탁양주, 이영성, 이진석, 강재현. 최근 국내 비만 연구의 경향 (1984년부터 2002년까지). 대한비만학회지 13(1):1-13, 2004.
14. Hubert, H.B., Feinleib, M., McNamara, P.M., Castelli, W.P. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: 26-year follow up of participants in the Framingham Heart Study. Circulation 97: 968-977, 1983.
15. Van Itallie, T.B. Health implications of overweight and obesity in the United States. Ann Intern Med. 103(2):983-988, 1985.
16. 이가영, 박태진. 40세 이상의 일부 성인에서 비만이 건강에 미치는 영향. 가정의학회지 18(3):284-294, 1997.
17. 대한민국의학정보센터. KIMS OnLine. [cited 2006 Oct. 29];[3 screens]. Available from: URL: <http://www.kimsonline.co.kr/>.
18. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울, 大星文化社, 上卷, pp 62, 66-67, 70, 121, 156, 889, 1982.
19. 張介賓. 景岳全書. 上海, 上海古籍出版社, pp 181-182, 211-212, 1991.
20. 李東垣 外. 東垣醫書十種脾胃論. 서울, 大成文化社, pp 70-71, 1983.
21. 劉河間. 劉河間三六書. 서울, 성보사, p 282, 1976.
22. 전국한의과대학 본초학교수 공저. 本草學. 영림사, 서울, pp 121, 263, 291, 302, 305, 306, 315, 347, 409, 424, 427, 438, 445, 448, 450, 534, 536-537, 540, 553, 578, 580, 588, 1991.
23. 이삼열 외. 臨床病理檢査法. 연세대학교출판사, 서울, p 230, 238, 262, 2000.
24. 최응환. Uncoupling protein. 대한내분비학회지 15(4):453, 2000.
25. Behme, M.T. Leptin: Product of the obese gene. Nutr Today. 31: 138-141, 1996.
26. Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R. et al. Serum immunoreactive leptin concentration in normal weight and obese humans. N Engl J Med., 334: 292-295, 1996.
27. Fredrich, R.C., Hamann, A., Anderson, S., Lollmann, B., Flier, J.S. Leptin levels reflect body lipid content in mice. Evidence for diet-induced resistance to leptin action. Nature Med.. 1(12):1311-1314, 1995.
28. Masuzaki, H., Ogawa, Y., Hosoda, K., Kawada, T., Fushiki, T., Nakao, K. Augmented expression of the obese gene in the adipose tissue from rats fed high-fat diet. Biochem Biophys. 140: 35-42, 1999.
29. 김용성. 肥滿과 遺傳子 研究. 대한비만학회지 9(1):73-75, 2000.