桑葉 함유 한약복합제 추출물의 抗肥滿효과 연구

박종익 · 강경하 · 박은정

원광대학교 한의과대학원 소아과교실

Abstract

The Study on Anti-obesity Effects of Mulberry Leaves Contained Herbal Mixture

Park Jong Ik · Kang Kyung Ha · Park Eun Jung

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives

This experimental study was designed to investigate the effects of Mulberry leaves contained herbal mixture (MLHM) on body weight, serum lipid level and adipocyte differentiation in high fat diet-fed obese mice.

Methods

Four-week old mice (wild-type C57/BL6) were used for all experiments. Cells were incubated with MLHM at the indicated concentration (0.04-4mg/ml) for 24h, and growth rate was assessed by MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. 3T3-L1 preadipocytes were incubated in DMEM for 2 days with the indicated concentrations of MLHM, and on Day 6, the cells were fixed and the cellular lipid contents were assessed by Oil-Red-O staining.

The expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymine (CCAAT)/enhancer-binding proteins α (C/EBP α) as adipocyte-specific proteins were determined by real time RT-PCR and western blotting. In addition, body weight gain and serum lipid levels were measured in the mice with obesity induced by the high fat-diet for four weeks.

Results

Though MLHM did not show toxicity even at the concentration of 4mg/ml, MLHM significantly inhibited the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in a dose-dependent manner. Also, MLHM significantly reduced the expressions of PPAR γ and C/EBP α in a dose-dependent manner. Furthermore, MLHM significantly reduced body weight gain and LDL-cholesterol contents in high fat diet-fed obese mice.

Conclusions

These results demonstrate that MLHM exerts anti-obesity effect in 3T3-L1 cells and mice with obesity by high-fat diet.

Key words : Mulberry leaves, Obesity, Serum lipid, 3T3-L1 cell, Adipocyte differentiation, PPAR γ , C/EBP α

Received: October 25, 2013 • Revised: November 11, 2013 • Accepted: November 14, 2013

Corresponding Author: Park Eun Jung

Department of Pediatrics, Wonkwang University Jeonju Oriental Medicine Hospital
99 Garyeonsan-ro, Deokjin-gu, Jeonju, Jeollabuk-do, Republic of Korea.

Tel: +82-63-270-1019 Fax: +82-63-270-1594

E-mail: ejpark@wonkwang.ac.kr

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. Introduction

비만은 섭취한 에너지가 신체활동과 성장에 필요한 소비 에너지량 보다 많아서 초과된 에너지가 중성지방의 형태로 조직에 침착되어 대사 장애를 수반하는 질환으로 체지방이 과잉 축적된 상태로 정의한다^{1,2)}.

경제생산 활동의 증가와 식생활 문화의 변화로 몸속에 축적되는 칼로리 양이 많아지는 반면, 산업의 발달로 인하여 신체활동량은 오히려 감소하게 됨에 따라 비만의 유병률은 증가하는 추세에 있다³⁾. 선진국에서 비만의 유병률은 대개 성인 인구의 10-40% 전후이고, 세계적으로 3억 이상의 인구가 BMI 30 이상의 비만에 해당하며 7,500만 정도가 BMI 25 에서 29.9 사이의 과체중에 해당하는 것으로 추정 된다⁴⁾. 우리나라의 경우 1998년 국민 전체의 비만 유병률은 26%였으나 2010년 30.8%로 증가하였고⁵⁾, 소아청소년 비만 유병률은 1997년 5.8%에서 2005년 9.7%로 증가하였으며 여아보다 남아에서 더 현저하게 증가한 것으로 나타났다⁶⁾. 비만은 우울증, 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 관상동맥질환, 관절염 등과 밀접한 관련이 있기 때문에 이러한 비만의 증가는 사회적인 문제로 대두되고 있으며^{1,7)}, 이에 비만에 대한 적극적인 예방과 치료법의 개발이 필요하다.

韓醫學에서는 비만을 “肥, 肥人, 肉人, 肥貴人, 肥胖” 이라고 표현하였고⁸⁾, 비만의 원인에 따라 痰濕內蓄, 氣虛, 脾虛濕阻, 肝氣鬱結, 氣滯血瘀 등으로 분류하였으며, 祛痰化濕, 疏肝理氣, 健脾利濕 등의 治法을 사용하였다⁹⁾.

바쁜 현대인의 생활에는 비만 치료의 주된 방법인 식이요법과 운동요법이 실행하기에 어려운 점이 많아 효과적인 비만치료 약물에 대한 필요성이 대두되고 있다¹⁰⁾. 하지만 일반적으로 비만 치료에 선택되는 약물의 부작용과 중독성이 밝혀져 장기간 사용이 불가함에 따라^{11,12)}, 이들 제제에 비하여 부작용이 적다고 알려진 한약에 대한 연구가 더욱 필요하다¹³⁾.

상엽 (桑葉, *Folium Mori*)에 대한 연구로는 혈당강화

효과^{14,15)}와 cholesterol 감소 및 동맥경화증, 고지혈증, 당뇨병 예방치료 효과¹⁶⁾가 있고, 산약 (山藥, *Rhizoma Dioscoreae*)에 대한 연구로는 항산화 작용^{17,18)}, 고혈당¹⁹⁾과 비만²⁰⁾을 억제하는 작용과 지질대사 개선²¹⁾의 효과가 있으며, 산수유 (山茱萸, *Fructus Corni*)에 대한 연구로는 항산화, 항당뇨 효과^{22,23)}가 있고, 지각 (枳殼, *Fructus Ponciri*)에 대한 연구로는 생체 내 지질대사 및 면역효과에 관한 연구²⁴⁾ 및 항산화 효과²⁵⁾가 있다.

상기 약물들은 補氣, 補陰, 理氣, 解表의 약물 조합으로 虛實을 막론하고 비만치료에 광범위하게 활용할 수 있는데, 각각의 약물들의 비만이나 지질대사 개선에 대한 연구 결과는 있었지만 복합추출물로 비만에 대한 연구 결과는 없었다.

저자는 상엽 함유 한약복합제 추출물 (MLHM)이 고지방식이의 비만쥐에 미치는 세포독성 여부, 체중 변화, 혈중지질농도의 변화, 지방세포 분화와 지방세포 분화 주요 조절 인자인 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)와 CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α)의 발현에 미치는 효과에 대하여 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. Materials and methods

1. 材料

1) 약재

본 실험에 사용된 상엽 함유 한약복합제 추출물 (MLHM)은 경희대한방병원 약재과에서 구입하여 사용하였다 (Table 1).

2) 실험동물

실험동물은 식이로 비만이 유도되는 형질을 가진 C57/BL6종의 4주령 된 생쥐 15마리를 대한바이오링크로부터 구입하여 사용하였다. 실험시작 전 1주일 동안 일반 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경

Table 1. The Composition of Mulberry Leaves Contained Herbal Mixture (MLHM)

Herb Name	Scientific Name	Doses (g)
상 엽	<i>Mulberry Leaves</i>	1000
산수유	<i>Corni Fructus</i>	1000
산 약	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	1000
지 각	<i>Fructus Aurantii</i>	1000
Total amount		4000

($23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$)으로 유지하고 12시간씩 명암을 자동 조절하여 적응시켰다. 실험시작부터 5마리는 일반식이를 급여하고, 10마리는 고지방식이를 4주간 급여하여 비만을 유도하고 5주째부터 비만식이에 혼합 약제 (MLHM)를 섞어서 12주간 급여하였다.

3) 시료의 제조

총량 1000 g씩의 산수유, 산약, 지각, 상엽을 각각 1500 ml의 80% 에탄올에 넣고 heating mantle를 이용하여 2시간 동안 가열 추출하고 여과한 여액을 500 ml 플라스크에 applicator를 이용하여 넣은 후 filter로 걸러냈다. 걸러진 여과액을 Rotary evaporator (Model NE-1, japan)로 감압 농축한 후 동결건조기 (Model FD-1, Japan)로 건조시켰다. 동결건조 된 산수유, 산약, 지각, 상엽 1차 추출물을 1:1:1:1의 비율로 혼합하여 실온에서 보관하였다. 최종 수거율은 산수유 18.9%, 산약 3.4%, 지각 16%, 상엽 18.7%였다.

4) 지방세포 배양

전지방세포 (preadipocyte)인 3T3-L1 세포를 배양액을 이용하여 5%로 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 온도는 37°C 로 배양하였다. 세포 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제 (antibiotics)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)를 사용하였다. 2-3일 간격으로 배양세포에 0.25% 트립신 (trypsin)을 넣고 처리하여 세포를 탈착시켜 계대 배양하였다 (Scheme 1).

5) 지방세포 분화유도

세포를 개별 실험에 사용할 때는 분화유도 물질인 insulin ($10 \mu\text{g/ml}$), dexamethasone (DEX, $1 \mu\text{M}$), 1-methyl-3-methylxanthine (IBMX, 0.5mM) 이 함유된 분화유도 배양액 (MDI)으로 교환하여 2일간 배양하여 지방세포로 분화를 유도하였다. 배양 2일 후 insulin만 함유하는 배지로 교환하고 MLHM을 처리하여 2일간 배양하고, 다시 insulin만 함유한 배지로 교환한 후 2일간 배

양하였다 (Scheme 1).

2. 方法

1) Oil-Red-O staining

지방세포로 분화된 세포내의 지방을 염색하여 분화 정도를 측정하였다. 세포를 10% 포르말데하이드 (formaldehyde)로 1시간동안 고정시킨 후 60%로 이소프로판올 (isopropylalcohol) 액으로 세척하였다. 세포를 60% Oil-Red-O로 10분간 염색하였다. 세포질 내 붉은색 과립이 있는 세포를 분화된 지방세포로 간주하고, 염색된 Oil-Red-O를 100% 이소프로판올로 녹여내어 500nm에서 흡광도를 측정하여 지방세포의 분화 정도를 측정하였다.

2) Real-time RT-PCR

지방세포를 분화시켜 약물을 농도별로 처리한 후, QIA Zol Lysis reagent를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 template로 power cDNA synthesis kit (Intron)를 이용하여 single stranded cDNA를 제조하였다. 발현 정도는 DNA에 유전자를 특이적으로 증폭하는 PPAR γ 를 넣어 Real-time RT-PCR을 이용하여 측정하였다.

3) Western blotting

지방세포를 분화시켜 약물을 농도별로 처리한 후, 3T3-L1 세포를 RIPA buffer (50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 0.1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM phenylmethylsulphonyl fluoride)로 용해시킨 후 8% SDS-polyacrylamide gel 전기 영동한 다음 nitrocellulose membrane에 transfer 하였다. 5% skim milk로 blocking한 후 여러 가지 1차 항체 (PPAR γ , CEB/P α) 및 horseradish peroxidase (Jackson Lab. 주명)가 부착된 2차 항체로 반응시키고 ECL 용액 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)을 사용하여 목적 단백질을 확인하였다.

Scheme 1. Adipocyte differentiation process

4) 체중 측정

동물군은 총 4군 즉 1) 일반식이, 2) 고지방식이, 3) 고지방식이+산수유+산약+지각+상엽 (MLHM), 4) 고지방식이+녹차 추출물을 투여한 군으로 설정하였다. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 성분이 포함된 녹차 추출물을 투여한 군을 positive control로 설정하였다. 마우스에 4주간 60% 고지방식이를 통해 비만 유도 후 5주째부터 14주까지 산수유, 산약, 지각, 상엽의 80% EtOH 추출물의 혼합 약제 (MLHM)를 100mg/Kg/day 용량 (성인 60kg일 때 하루 섭취량 ($\approx 8g/60kg/day$)을 기준으로 산정)으로 투여한 약물 투여군과 고지방사료만 투여한 대조군에서 몸무게 변화를 측정하였다.

5) 혈중 지질 측정

동물군은 총 4군 즉 1) 일반식이, 2) 고지방식이, 3) MLHM, 4) 고지방식이+녹차 추출물을 투여한 군으로 설정하였다. EGCG 성분이 포함된 녹차 추출물을 투여한 군을 positive control로 설정하였다. 마우스에 4주간 60% 고지방식이를 통해 비만 유도 후 5주째부터 16주까지 100mg/Kg/day 용량으로 MLHM이 섞인 고지방식이를 자유롭게 섭취하게 한 후, 16주째에 동물의 혈청에서 Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, Triglyceride를 측정하였다.

6) 통계분석

실험 결과는 각 실험에 대한 평균값 $\pm$ S.E.M. 로 표기하였고, 각 그룹간의 차이를 결정하기 위한 통계 분

석은 one-way ANOVA를 이용하였다. 모든 통계분석은 SPSS v10.0 statistical analysis software를 이용해서 수행되었다. $P < 0.05$ 인 값을 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. Results

1. 세포독성 결과

실험에 사용된 각 약물이 지방세포의 생존률에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포에 처리한 결과 처리 농도에서 세포독성이 없음을 확인하였다 (Fig. 1).

2. 지방세포 분화억제 효과

산수유, 산약, 지각, 상엽의 80% EtOH 추출물의 1:1 혼합인 MLHM을 3T3-L1 지방세포에 처리 후 지방세포 분화억제 정도를 측정하였다. 분화억제 정도는 Oil-Red-O 측정법을 통하여 확인하였고, 지방세포 분화인자 발현 정도는 Real-time RT-PCR, Western blot을 통해 확인하였다.

1) Oil-Red-O staining

3T3-L1 지방세포에 MLHM에 들어가는 각 약재를 농도별로 처리한 후 Oil-Red-O 측정법을 통하여 각 약재 농도별 분화억제 정도를 알아보았다. EGCG 성분이 포함된 녹차 추출물을 투여한 군을 positive control로

Fig. 1. Effect of MLHM on the inhibition of cell viability in 3T3-L1 preadipocytes

Cells were incubated with MLHM at the indicated concentration (0.04-4mg/mL) for 24h and the growth rate was assessed by MTT assay.

1: control; 2: MLHM 0.04mg/ml; 3: MLHM 0.4mg/ml; 4: MLHM 4mg/ml

All values are mean $\pm$ SD. *, $P < 0.05$ compared with control.

Fig. 2. Effects of Corni Fructus, Dioscoreae Rhizoma, Mulberry Leaves and Fructus Aurantii on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes

3T3-L1 preadipocytes were incubated with MDI differentiation medium for 2 days with the indicated concentrations(0.01-1mg/ml) of Mulberry Leaves, Corni Fructus, Dioscoreae Rhizoma, and Fructus Aurantii. At day 6, the cells were fixed and stained with Oil-Red-O. The cellular lipid content was assessed by Oil-Red-O staining.

All values are mean $\pm$ SD. *, $P < 0.05$ compared with #, control.

설정하였다. 그 중 지각과 상엽 각 1mg/ml의 농도에서 유의한 분화억제 효과를 확인하였다 (Fig. 2).

다음에 MLHM을 농도별로 3T3-L1 지방세포에 처리한 후 Oil-Red-O 측정법을 통하여 MLHM의 분화억제 정도를 알아보았고, MLHM 4mg/ml에서 유의성 있는 지방세포 분화억제 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

2) Real-time RT-PCR

3T3-L1 지방세포에 MLHM을 처리하여 지방세포 분화 조절 인자인 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)의 발현 정도를 측정된 결과, MLHM

농도 의존적으로 유의성 있는 PPAR γ 발현 억제 효과를 확인할 수 있었으며, 특히 산수유 단일약제에 비해 더 우수한 발현 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 4).

3) Western blotting

3T3-L1 지방세포에 MLHM을 처리하여 지방세포 분화 조절 인자인 PPAR γ 와 CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α) 발현 정도를 western blot analysis를 통해 측정된 결과, 단백질 level에서도 역시 MLHM의 PPAR γ 뿐만 아니라 C/EBP α 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다. PPAR γ 는 MLHM 1mg/ml와

Fig. 3. Effect of MLHM on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes

3T3-L1 preadipocytes were incubated with MDI differentiation medium for 2 days with the indicated concentrations of MLHM. At day 6, the cells were fixed and stained with Oil-Red-O. The cellular lipid content was assessed by Oil-Red-O staining.

1: Blank; 2: Control; 3: Corni Fructus 1mg/ml; 4: Fructus Aurantii 1mg/ml; 5: Dioscoreae Rhizoma 1mg/ml; 6: Mulberry Leaves 1mg/ml; 7: MLHM 1mg/ml; 8: MLHM 4mg/ml; 9: EGCG

All values are mean $\pm$ SD. *, $P < 0.05$ compared with #, control.

Fig. 4. MLHM inhibited 3T3-L1 adipocyte differentiation

The PPAR γ mRNA levels on day 6 of differentiation were determined by the Real-time RT-PCR.

1: Blank; 2: Control; 3: Corni Fructus 1mg/ml; 4: Fructus Aurantii 1mg/ml; 5: Dioscoreae Rhizoma 1mg/ml; 6: Mulberry Leaves 1mg/ml; 7: MLHM 1mg/ml; 8: MLHM 4mg/ml; 9: EGCG

All values are mean $\pm$ SD. *, $P < 0.05$ compared with #, control.

4mg/ml에서 유의성 있게 발현이 억제되었고, 특히 상업 단일약제에 비해 MLHM의 더 우수한 억제효과를 확인할 수 있었다. 그리고 C/EBP α 는 MLHM 4mg/ml에서 유의성 있게 발현이 억제되었다 (Fig. 5A, 5B).

3. 체중감소 효과

동물군은 총 4군 즉 1) 일반식이, 2) 고지방식이, 3) MLHM, 4) 고지방식이+녹차 추출물 (positive control)을 투여한 군으로 설정하였고, 4주간 고지방 식이를 통해 비만 유도 후 5주부터 16주까지 약물이 섞인 식이를

Fig. 5. Effects of MLHM on the expressions of adipogenic proteins such as PPAR γ and C/EBP α

The expression levels of master regulators of adipocyte differentiation; PPAR γ , C/EBP α after induction were measured by western blotting. The 3T3-L1 preadipocytes were treated with or without MLHM (4, 1mg/ml) during differentiation for 6days (PPAR γ and C/EBP α) after they had become confluent.

1: Blank; 2: Control; 3: Mulberry Leaves 1mg/ml; 4: MLHM 4mg/ml; 5: MLHM 1mg/ml; 6: EGCG

The results are shown as the mean $\pm$ S.D. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # control, Welch's t-test).

Fig. 6. The anti-obesity effect of MLHM in high-fat diet-induced obese mice

Effect of MLHM on body weight gain after 14weeks of experimental diet feeding.

All values are mean $\pm$ SD. *, $P < 0.05$ compared with High fat (60%)

자유롭게 섭취하게 하여 몸무게 변화를 측정하였다.

예비실험을 통해 확인한 일반 식이 투여군과 고지방 식이 투여군의 체중이 확연히 차이를 보이는 시점인 4주 후부터 약물을 투여한 결과, 13주째에 고지방 식이군에 비하여 MLHM 투여군과 녹차추출물 투여군에서 유의성 있는 체중 감소를 확인하였고, MLHM 투여군에서 가장 효과적인 체중감소 효과를 확인하였다 (Fig. 6).

4. 혈중지질농도 감소 효과

동물군은 총 4군 즉 1) 일반식이, 2) 고지방식이, 3) MLHM, 4) 고지방식이+녹차 추출물 (positive control) 을 투여한 군으로 설정하였고, 4주간 고지방 식이를 통해 비만 유도 후 5주부터 16주까지 약물이 섞인 식이를 자유롭게 섭취하게 한 후, 16주째에 동물의 혈청에서 Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, Triglyceride 등을 측정하였다. 그 결과, Total cholesterol, Triglyceride의 혈중농도는 미미하게 증가했으나, LDL-cholesterol의 혈중농도가 MLHM 투여군에서 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 7).

Fig. 7. Effect of MLHM on blood cholesterol level in high fat diet-induced obese mice

1: Control; 2: 60% High fat diet induced; 3: MLHM; 4: EGCG

All values are mean $\pm$ SD. *, P < 0.05 compared with #, High fat (60%)

IV. Discussion

비만은 과도한 에너지 섭취가 중성지방의 형태로 체내 지방조직이 과다하게 축적되어 있는 상태로²⁶⁾, 열량 불균형이 일어나 결국 대사 장애를 유발하는 질병이다^{13,27)}. 엄밀한 의미로 비만은 과잉 체중을 의미하는 것이 아니라 대사 장애로 인해 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 말한다. 즉, 열량 섭취가 신체 활동으로 소모되는 열량보다 과다하여 중성 지방의 형태로 지방 조직에 과잉 축적되어 비만증을 일으키는 것이다¹³⁾. 인체의 체지방은 두 부분으로 구성되어 있다. 신경 전도

와 같은 정상적 생리학적 기능을 위해 필요한 지방인 필수 지방 (essential fat)과 저장지방 (storage fat)이다. 필수 지방은 남성의 경우 체중의 약 3-7% 정도를 차지하고 있으며, 여성의 경우에는 약 10-12% 정도로 구성되어 있다. 저장지방은 마른 사람의 총체중에 대해서는 매우 적은 비율을 차지하고 있으며, 대부분의 정상적인 체중의 경우에는 체중의 약 5-25% 정도를 차지하고 있다. 저장지방이 체중의 약 30%를 초과하는 경우 비만이라 한다²⁸⁾.

비만은 단순성 비만과 원인 질환이 존재하는 증후성 비만으로 나눌 수 있다. 비만환자의 95%를 차지하는 단순성 비만의 원인은 고인슐린혈증, 지방세포증식,

유전, 과식, 잘못된 식사습관, 운동 부족, 열생산 기능 이상 등이 있고, 중후성 비만의 원인은 내분비성, 중추성, 유전성, 약물성 등으로 분류할 수 있으며, 이는 독립적인 관상동맥질환의 위험인자이다²⁹⁾. 우리나라의 2000-2010년 사망원인을 살펴보면 10년간 줄곧 심장질환이 암과 뇌혈관질환 다음으로 높은 사망률을 보여 주었고 특히 심근경색증과 협심증 등의 허혈성 심장질환이 심각하여³⁰⁾ 이를 예방하고 치료할 수 있는 치료제의 개발이 필요하다.

韓醫學에서 비만은 “肥, 肥人, 肉人, 肥貴人, 肥胖”으로 표현하였고⁸⁾, 病機는 膏粱厚味한 음식을 過食하거나 多食하면 脾胃의 運化작용을 失調케하고, 脾胃의 運化작용이 失調되면 熱을 발생하며, 熱이 성하면 津液을 灼하고 陰液이 耗傷하여 음식을 구하게 되므로 음식섭취가 왕성케 되어 비만이 되는 것으로 보고 있다¹³⁾.

辨證에 있어서는 實證의 痰濕內蘊型和 虛證의 氣虛型的 비만으로 辨證한다. 痰濕內蘊型 비만의 病機는 暴飲暴食, 長期에 걸친 食慾亢進, 美食, 甘味品 또는 기름진 음식을 좋아하여 脾의 運化가 失調되어 濕痰이 일어나고 痰濕이 肌肉에 流注함으로 발생하고, 胸痞腕悶, 平素痰多, 肢體沈重倦怠, 惡熱, 舌質胖, 舌苔厚膩, 脈弦滑有力의 症狀이 나타난다. 氣虛型 비만의 病機는 疲勞, 飲食不節 등으로 脾氣가 虛하여 발생하며, 少氣懶言, 動則自汗, 怕冷, 面浮虛腫, 食慾不振, 氣力衰退, 神疲嗜臥, 舌質淡舌苔白, 脈細弱의 症狀이 나타난다³¹⁾.

비만 치료를 위한 치료제의 작용기전별 특허 출원 동향을 살펴보면 지방 등의 소화흡수 저해제 (24%), 지방세포분화 저해제 (12%), 호르몬 조절제 (10%), 열 대사 촉진제 (4%), 식욕 억제제 (3%), 지방산 생성 억제제 (2%), 혈관 신생 억제제 (2%) 등 생명공학기술의 발달을 통해 규명되고 있는 다양한 비만 발생 기전을 활용하여 새로운 비만치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다³²⁾. 그러나 일반적으로 비만치료를 선택되는 약물은 부작용과 중독성이 밝혀져 장기간 사용이 불가하고, FDA에서 장기간의 사용이 인정된 치료제인 orlistat (Xenical), sibutramine (Reductil) 등도 지방 축적을 억제하는 작용과 체중감소 효과가 있으나 흔한 부작용으로 기름변, 복부팽만감, 설박성 대변, 두통, 변비, 구갈, 구역, 현기증 및 불면증 등이 보고되고 있다^{11,12)}. 그러므로 이들 제제에 비하여 부작용이 적다고 알려진 한약재를 이용한 비만치료제의 개발이 필요하다

다 하겠다¹³⁾.

본 연구에서는 체중조절 효과가 우수하고 부작용이 없는 약물을 개발하기 위하여 문헌 조사 및 실험을 통해 비만이나 지질개선, 항당뇨 등에 효능이 입증된 약물들인 상엽, 산수유, 산약, 지각으로 이루어진 식물추출물 복합제 (phyto-extract mixture, PEM)를 사용하였다.

상엽 (桑葉, *Mori Folium*)은 桑科에 속한 落葉喬木인 뽕나무 및 同屬 近緣植物의 잎을 건조한 것으로 性味는 寒無毒, 甘苦하고, 歸經은 肺, 肝經으로 작용한다. 效能은 發散風熱, 清肺潤燥, 清肝明目하고, 主治는 感冒風熱, 肺熱潤燥, 頭痛眩暈, 目赤昏花 등이다³³⁾. 실험 연구로는 상엽 추출물에서 식후혈당 및 인슐린 분비를 증가시키는 효능을 나타내었고³⁴⁾, 비-비만형 당뇨병모델인 Goto-Kakizak (GK) rat의 공복 혈당 및 당부하검사에서 식후 혈당 감소, 인슐린 분비 촉진, 인슐린 저항성 개선, 소장에서의 α -glucosidase 억제 효과를 나타내었다³⁵⁾. 또한 상엽 추출물을 고지방식으로 유발된 비만형 당뇨병 동물모델에 투여한 결과 체중감소 및 간내 지방축적 억제 등의 효과를 나타내었다³⁶⁾.

산약 (山藥, *Dioscoreae Rhizoma*)은 마과에 속한 참마, 마의 塊莖을 건조한 것으로 性味는 溫, 甘하고, 歸經은 脾, 肺, 腎經으로 작용한다. 效能은 健脾, 補肺, 固腎益精縮尿하고, 主治는 脾虛泄瀉, 消渴, 遺精, 帶下, 虛損勞傷 등이다³³⁾. 실험 연구로는 산약 추출물이 fructose식이 유발 인슐린 저항성 동물모델에서 공복혈당, 식후혈당의 감소 및 인슐린 분비촉진을 통한 인슐린 저항성을 개선시키는 효능을 확인하였고³⁷⁾, 생식 세포의 일종인 GC-1 spg cell에서 산약의 항산화 효과를 보고하였다³⁸⁾.

산수유 (山茱萸, *Corni Fructus*)는 山茱萸科의 落葉小喬木인 산수유나무의 성숙한 과실로 氣味는 微溫, 酸하고, 歸經은 肝, 腎經으로 작용한다. 效能은 補益肝腎, 澁精固脫하고, 主治는 眩暈耳鳴, 腰膝酸痛, 陽痿遺精, 遺尿, 尿意頻數, 崩漏帶下, 大汗虛脫, 內熱消渴 등이다³³⁾. 실험 연구로는 산수유에서 추출한 poly-phenol을 streptozotocin 유발 당뇨병 동물모델에 투여하여 공복혈당, 식후혈당의 감소 및 advanced glycation endproducts (AGEs)의 합성을 억제하는 효능을 확인하였다³⁹⁾.

지각 (枳殼, *Aurantii fructus immaturus*)은 芸香科에 속한 落葉小喬木 혹은 常綠喬木인 탕자나무 및 광귤나무와 同屬 近緣植物의 성숙한 과실로 性味는 涼, 甘辛하고, 歸經은 肺, 脾, 肝, 胃, 大腸經으로 작용한다.

效能은 破氣, 行痰, 消積하고, 主治는 胸膈痰滯, 胸痞, 脇脹, 食積, 噯氣, 嘔吐, 下痢後重, 脫肛, 子宮下垂 등이다³³⁾. 실험 연구에서 지각의 성분인 hesperidin, naringin은 Hypercholesterolemia 쥐의 Total cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol 양을 유의성 있게 감소시켰고⁴⁰⁾, 혈당강하 효과를 보였는데 그 기전은 부분적으로 간뇌 해당작용을 증가시키고 glycogen 합성을 증가시키며 포도당 신합성과정을 저해하는데서 비롯되고⁴¹⁾, 이들은 또한 cholesterol 합성을 저해하여 제2형 당뇨병 상태에서의 지질이상을 회복하였다는 보고가 있다⁴²⁾.

본 연구에서는 상기 약물들을 혼합하여 산수유, 산약, 지각, 상엽의 80% EtOH 추출물의 1:1 혼합인 상엽 함유 한약복합제 추출물 (MLHM)을 3T3-L1 지방전구세포가 분화하는 단계에 처리하였을 경우 분화억제 효과와 그 기전을 확인하고, 고지방식이 비만쥐의 체중 변화와 혈중 지질농도의 변화를 확인하여 비만에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 본 실험에 사용한 3T3-L1 세포주는 분화된 3T3-L1 adipocytes가 *in vivo* adipocytes의 생화학적 형태학적 성질들과 사실상 동일하다는 보고에 따라⁴³⁾ 지방 대사를 연구하는데 적절하다고 판단되어 3T3-L1 전지방세포를 분화시켜 사용하였다. 세포독성평가 실험은 MTT 방법을 이용해 MLHM을 각각 농도별 (0.04, 0.4, 4mg/ml)로 3T3-L1 세포에 24시간동안 처리하여 진행하였다. 그 결과 MLHM의 농도에 따라 대조군에 비하여 세포 독성을 나타내지 않아 각 농도에서의 지방세포 분화에 대한 MLHM의 효과를 실험하였다. 녹차에 포함된 polyphenol 성분인 Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)는 고지방식으로 유발된 비만형 동물 실험에서 비만에 유효한 결과를 나타내어⁴⁴⁾, EGCG 성분이 포함된 녹차 추출물을 투여한 군을 positive control로 설정하였다.

지방에 특이 반응을 나타내는 Oil-Red-O 염색법을 이용하여 세포 염색을 시행하여 MLHM의 농도별 지방세포 분화억제 효과를 관찰한 결과 control group에 비해 4mg/ml의 MLHM group에서 지방세포 분화를 유의성 있게 억제하였다. 따라서 MLHM이 3T3-L1 지방세포 분화유도과정에 농도 의존적으로 지방량이 축적되는 정도를 유의하게 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

지방세포형성 (adipogenesis)은 전지방세포로부터 지방세포로 분화가 일어나면서 세포형태의 변화, 호르몬 민감성의 변화, 유전자 발현의 변화 그리고 단백질 발현의 변화가 복합적으로 작용하는 과정이다⁴⁵⁾. 전지방세포

에서 지방세포로 분화하는 과정에는 지방 축적에 의해 지방구가 형성하게 되는 형태학적인 변화뿐만 아니라 지방세포에 특이적인 단백질 marker의 발현 증가와 같은 생화학적인 변화도 나타난다. 이때 일반적으로 adipokine 분비와 transcription factor의 발현이 크게 증가하는데⁴⁶⁻⁴⁸⁾, 그중에서도 가장 중요한 활성인자로는 peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)와 cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine (CCAAT)/enhancer binding protein alpha (C/EBP α)를 들 수 있다⁴⁹⁾. 분화 유도 물질은 이러한 전사 인자들의 발현을 촉진시킴으로써 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨다^{50,51)}. 전지방세포가 adipogenic signal을 받으면 전사인자 C/EBP α , C/EBP β 및 C/EBP δ 의 발현이 유도되고, 이들이 adipogenesis의 주요 조절자인 PPAR γ 의 발현을 유도하여 분화를 진행시키는 것으로 알려져 있다⁵²⁾. C/EBP β 는 전지방세포에서 분화유도제에 의해 발현 유도되어 실질적인 지방세포 분화를 담당하는 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현을 유도하는 단백질이고, 분화초기 clonal expansion (Day 2) 과정에서는 발현량이 많으나 성숙지방세포 (Day 6)가 되면 발현이 저하되는 특징을 나타낸다. PPAR γ 는 핵 내 수용체형의 전사인자로 같은 수용체형 전사인자인 RXR α (retinoid X receptor α)와 heterodimer를 형성하여 여러 종의 지방산이나 지방산 대사산물의 내인성 ligand로써 결합하여 전사능을 활성화한다. 또한, 지방세포의 성숙분화시기에 유도되며 지방세포 특이적 유전자의 promoter영역에 존재하는 PPAR 결합영역인 PPRE (PPAR responsive element)에 결합하여 그 유전자의 발현을 유도한다⁵³⁾. PPAR γ 는 adipogenesis의 주요 조절자로서 fatty acid synthase (FAS) 및 adipocyte-specific lipid binding protein (aP2) 등의 adipogenic gene 들의 발현을 조절한다⁵⁴⁾.

실험을 통해 MLHM이 adipogenic transcription의 주요 인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 mRNA 및 단백질 발현량에서 확인하였다. 먼저 3T3-L1 세포 분화를 유도하면서 MLHM을 농도별 (1, 4 mg/ml)로 처리하였고 지방세포 분화 6일 후 Real-time RT-PCR를 실시하여 PPAR γ 의 발현 정도를 측정된 결과, 단일 약제에 비해 MLHM 4mg/ml에서 유의성 있게 PPAR γ 의 mRNA 발현을 억제하고 PPAR γ 전사 활성을 감소시키는 것을 확인하였다. 단백질 발현량의 변화는 3T3-L1 세포 분화를 유도하면서 MLHM을 농도별 (1, 4 mg/ml)로 처리하고 Western blot analysis를 행하여 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현억제 효과를

확인하였다. 단백질 level에서 PPAR γ 는 1mg/ml와 4mg/ml에서 모두 유의성 있게 발현이 억제되었으나 4mg/ml에서 발현억제가 더 우수하였다. C/EBP α 는 4mg/ml에서 유의성 있게 발현억제가 나타났다. 이러한 결과는 MLHM의 지방세포 분화억제 효과가 지방의 합성과정을 억제함으로써 이루어짐을 보여주고 있다.

실험동물의 체중변화는 고지방식이 투여군의 체중이 확연히 차이를 보이는 시점인 4주 후부터 고지방식에 MLHM을 함께 투여한 결과, 13주째에 고지방식이군에 비하여 MLHM 투여군에서 유효한 체중증가 억제 효과가 나타났다. 이를 통해 MLHM의 체중증가 억제 효과를 확인할 수 있었다.

Total cholesterol 함량은 주로 고열량섭취와 비만, 심혈관질환의 Hypercholesterolemia 등에서 증가한다⁵⁵⁾. LDL-cholesterol은 혈청 중 cholesterol의 주된 운반형태로 동맥 내 혈관벽에 cholesterol을 축적하여 동맥경화증과 심혈관계질환의 발병에 중요한 위험인자로 알려져 있다⁵⁶⁾. 심혈관질환 병인의 지질 성분인 LDL-cholesterol을 감소시키면 HDL-cholesterol 농도를 증가시켜 지질대사를 개선시킬 수 있다고 한다^{57,58)}.

혈액생화학적인 실험으로 실험동물의 혈청내 cholesterol의 수치를 측정하기 위해 고지방식이 60% 비만쥐에 5주째부터 MLHM을 첨가하여 16주차까지 급여한 후 혈청내 cholesterol 수치를 측정한 결과, Total cholesterol 수치와 HDL-cholesterol 수치는 고지방식이 비만쥐에 비해 약간 증가하였고, LDL-cholesterol 수치는 유의성 있게 감소하였다.

이상의 연구 결과로 보아 MLHM은 고지방식이 비만쥐의 체중증가 억제와 함께 지방세포 분화억제, PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현억제, 혈중 LDL-cholesterol 농도의 감소로 체내 지방대사에 관여하는 생화학적 지표들을 유의성 있게 감소하였다. 이러한 체중감소 작용기전은 lipogenesis 단백질의 발현을 조절하여 지방산의 합성억제에 기인하는 것으로 사료된다. 이번 연구로 상업 함유 한약복합제 추출물 (MLHM)이 생체내의 지방축적을 억제하는 성분이 함유되어 있음을 알 수 있었지만, 향후 비만 치료제 혹은 예방, 개선의 목적으로 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. Conclusion

산수유, 산약, 지각, 상업의 80% EtOH 추출물의 1:1

혼합인 MLHM을 이용하여 고지방식이 비만쥐의 지방세포 분화억제 정도와 체중변화, 혈중지질 농도의 변화를 비교 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MLHM은 약물처리 농도에서 세포독성이 없음을 확인하였다.
2. MLHM은 지방세포의 분화를 유의성 있게 억제하였다.
3. MLHM은 peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ)의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
4. MLHM은 단백질 level에서 PPAR γ 뿐만 아니라 CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α)의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
5. MLHM의 투여군에서 가장 유의성 있게 체중증가 억제 효과를 확인할 수 있었다.
6. MLHM의 투여군에서 LDL-cholesterol의 혈중농도가 유의성 있게 감소하였다.

이러한 결과로 산수유, 산약, 지각, 상업의 80% EtOH 추출물의 1:1 혼합인 MLHM은 고지방식으로 인한 비만에 유효하게 활용 가능할 것으로 사료된다.

References

1. Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine. Internal Medicine. Seoul: Koonja publishing inc. 1996:852-62.
2. Georgy A Bray. Office management of obesity. Seoul: Hanmi medical Pub. 2005:21, 107, 114.
3. Jung SH. Research study about Obesity-related information acquisition method. J Oreintal Rehab Med. 1998;8(2): 1-15.
4. Kim TH, Yoo K. Obesity and fatty Liver disease. Korean Journal of Medicine. 2005;68(2):347-9.
5. Ministry of Health and Welfare. Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES V-1). Korea Centers for Disease Control and Prevention. Seoul, Korea:Korea Health Statistics. 2010.
6. Oh KW, Jang MJ, Lee NY, Moon JS, Lee CG, Yoo MH, et al. Prevalence and trends in obesity among Korean children and adolescents in 1997 and 2005. Korean J Pediatr. 2008;51:950-5.

7. Peter GK. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404(6778):635-43.
8. TCM assessment study. TCM Sympton differentiation Diagnostics. Beijing:People's Health Publishing House. 1987:43.
9. Ko SC, Jeong KM. The Study about the Comparison of Oriental-Western Medicine on Childhood Obesity. *Journal Korean Oriental Pediatrics*. 1989;3(1):57-61.
10. Obesity Study Group of Korean Primary Care Association. Theory and Practice of Obesity Studies. seoul: hankookbook. 1996:267.
11. Park YW. Evidence-based prescriptions of functional foods for weight control. *Korean J Fam Med*. 2003;24(5): 409-15.
12. Park CY. The Update of Anti-Obesity Drug. *Kyunghee medical book*. 2002;18(2):77-85.
13. The korean academy of oriental rehabilitation medicine. *Oriental Rehabilitation Medicine*. seoul:Koonja publishing inc. 2005:349-62, 384-96.
14. Jung SH, Lee KH. Antidiabetic effect and mechanism of Mori folium on streptozotocin-induced diabetic mouse. East-west pharmaceutical research institute college of pharmacy kyunghee university. 2000;28:87-99.
15. Kim MS, Choue RW, Chung SH, Koo SJ. Blood glucose lowering effects of Mulberry leaves and silkworm extracts on mice fed with high-carbohydrate diet. *The Korean journal of nutrition*. 1998;31:117-25.
16. Myo CS. coloured medicinal plant of Korea. 1st ed. Seoul:Academic Co. 1989.
17. Jun YJ, Son MY, Khil MJ, Sung JS, Jeong JC, Kim DI. Cell differentiation and anti-oxydative effect of Dioscoreae Rhizoma on HeLa Cell. *The Journal of oriental obstetrics & gynecology*. 2007;20(2):139-54.
18. Nam JY, Roh JJ, Seung JH, Son MY, Khil MJ, Sung JS, Kim DI. Non-toxic and Anti-oxydative effect of Dioscoreae Rhizoma on PC12 Cell. *The Journal of oriental obstetrics & gynecology*. 2006;19(4):61-76.
19. McAnuff MA, Harding WW, Omoruyi FO, Jacobs H, Morrison EY, Asemota HN. Hypoglycemic effects of steroidal sapogenins isolated from jamaican bitter yam, *Dioscorea poygonoides*. *Food Chem. Toxicol*. 2005;43: 1667-72.
20. Kwon CS, Sohn HY, Kim SH, Kim JH, Son KH, Lee JS, Lim JK, Kim JS. Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipaseinhibitory activity in rodents. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2003;67:1451-6.
21. Chen HL, Wang CH, Chang CT, Wang TC. Effects of Taiwanese yam (*Dioscoreajaponica* Thunb var. *pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice. *Nutrition*. 2003;19: 646-51.
22. Seo KI, Lee SW, Yang KH. Antimicrobial and antioxidative activities of Corni fructus extracts. *Journal of the Korean society of post-harvest science & technology of agricultural products*. 1999;6(1):99-103.
23. Kim OK. Antidiabetic and antioxidative effects of Corni fructus in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of the Korean oil chemists` society*. 2005;22(2):157-67.
24. Sagi-Eisenberg R, Foreman J, Shelly R. Histamine release induced by histone and phorbol ester from rat peritoneal mast cells. *Eur J Pharmacol*. 1985;113:11-7.
25. Kim SJ, Park SK. Antioxidative and Anti-inflammatory Effects of Aurantii Fructus Immaturus Pharmacopuncture. *Korean Journal of Acupuncture*. 2010;27(2):13-24.
26. Seoul National University College of Medicine. Endocrinology jeonjeongpan. seoul:Seoul National University Press. 2006: 425-45, 491-5.
27. Min HK. *Clinical Endocrinology*. seoul:Korea medical book. 1990:476-9, 482-6.
28. Gordon Edlin, Eric Golanty. *Health and Wellness*. Yeong Mun pub. 2010:128.
29. Kim YS. Causes and classification of obesity. *Kyunghee medicalbook*. 1995;11(3-4):244.
30. Statistics Korea. Annual report on the cause of death statistics. 2000-10.
31. Lee BK. Symptom differentiation treatment . Seongbosa. 1991:77.
32. Korean Intellectual Property Office. 2008.
33. Shin MK. *Clinical Herbology*. Yeonglimsa. 1986:171, 243, 384-5, 531.
34. Kimura T, Nakagawa K, Kubota H, Kojima Y, Goto Y, Yamagishi K, Oita S, Oikawa S, Miyazawa T. Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. *J Agric Food Chem*. 2007;55(14):5869-74.
35. Park JM, Bong HY, Jeong HI, Kim YK, Kim JY,

- Kwon O. Postprandial hypoglycemic effect of mulberry leaf in Goto-Kakizaki rats and counterpart control Wistar rats. *Nutr Res Pract.* 2009;3(4):272-8.
36. Oh KS, Ryu SY, Lee S, Seo HW, Oh BK, Kim YS, Lee BH. Melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonism and anti-obesity effects of ethanolic extract from *Morus alba* leaves in diet-induced obese mice. *J Ethnopharmacol.* 2009;122(2):216-20.
37. Hsu JH, Wu YC, Liu IM, Cheng JT. Dioscorea as the principal herb of Die-Huang-Wan, a widely used herbal mixture in China, for improvement of insulin resistance in fructose-rich chow-fed rats. *J Ethnopharmacol.* 2007;112(3):577-84.
38. Kim SW. The antioxidant activity of dioscoreae rhizoma on GC-1 spg cell. Graduate school of Kyung Hee University. 2006.
39. Yamabe N, Kang KS, Matsuo Y, Tanaka T, Yokozawa T. Identification of antidiabetic effect of iridoid glycosides and low molecular weight polyphenol fractions of *Corni Fructus*, a constituent of Hachimi-jio-gan, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(7):1289-96.
40. Elzbieta M, Kurowska, John A, Manthey. Hypolipidemic Effects and Absorption of Citrus Polymethoxylated Flavones in Hamsters with Diet-Induced Hypercholesterolemia. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52: 2879-86.
41. Jung UJ, Lee MK, Jeong KS, Choi MS. The Hypoglycemic Effects of Hesperidin and Naringin Are Partly Mediated by Hepatic Glucose-Regulating Enzymes in C57BL/KsJ-db/db Mice, *J Nutr.* 2004;134:2499-503.
42. Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biolog.* 2006;38(7):1134-45.
43. MacDougald OA, Hwang C, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1995;92(20):9034-7.
44. Chen, Yu-Kuo Cheung, Connie Reuhl, Kenneth R. Liu, Anna Ba Lee, Mao-Jung Lu, Yao-Ping Yang, Chung S. Effects of green tea polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate on newly developed high-fat/Western-style diet-induced obesity and metabolic syndrome in mice. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2011;59(21):11862-71.
45. James M, Ntambi, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr.* 2000;130:3122-6.
46. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Dev.* 2000;14:1293-307.
47. Jeon T, Hwang SG, Hirai S, Matsui T, Yano H, Kawada T, Lim BU, Ki D. Red yeast rice extracts suppress adipogenesis by down-regulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 cells. *Life Sci.* 2004;75:3195-203.
48. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee Jr RE. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10:3-10.
49. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr.* 1994;14:99-129.
50. Kim SH, Park HS, Lee MS, Cho YJ, Kim YS, Hwang JT, Sung MJ, Kim MS, Kwon DY. Vitisin A inhibits adipocyte differentiation through cell cycle arrest in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;372:108-13.
51. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature.* 2000;404:635-43.
52. Camp HS, Ren D, Leff T. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine.* 2002;8(9):442-7.
53. Rosen ED, MS Bruce. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:145-71.
54. Hwang CS, Lotus TM, Mandrup S, Lane MD. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annual review of cell and developmental biology.* 1997;13:231-59.
55. Plaa GL. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In *Principle and Methods of Toxicology.* Philadelphia, PA, USA: Hayes AW, ed. Taylor & Francis. 1994:839-70.
56. Gordon T, Castelli W, Dawber T. Lipoprotein, cardiovascular disease and death, the Framingham study. *Arch Inter Med.* 1981;141:1128-35.
57. Applebaum BD, Haffner SM, Hartsook E, Luk KH, Albers JJ, Hazzard WR. Down-regulation of the low

30 The Study on Anti-obesity Effects of Mulberry Leaves Contained Herbal Mixture

density lipoprotein receptor by dietary cholesterol. *Am J Clin Nutr*. 1984;39:360-7.

58. Potter SM, Bakhit RM, Essexorlie DL, Weingartner KE, Chapman KM, Nelson RA, Prabhudesai M, Savage WD, Nelson AI, Winter LW. Depression of plasma cholesterol in men by consumption of baked products containing soy protein. *Am J Clin Nutr*. 1993;58:501-6.