

## 백자인 추출물에 의한 pancreatic lipase의 저해 효과

김민수 · 김보연 · 박찬선 · 윤병대 · 안순철<sup>1</sup> · 오원근 · 안종석\*

한국생명공학연구원, <sup>1</sup>부산대학교 의과대학 미생물 및 면역학 교실

Received February 24, 2006 / Accepted March 28, 2006

**Inhibitory Effect of *Thujae orientalis* Semen Extract on Pancreatic Lipase Activity.** Min Soo Kim, Bo Yeon kim, Chan Sun Park, Byung Dae Yoon, Soon Cheol Ahn<sup>1</sup>, Won Keun Oh and Jong Seog Ahn\*. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, <sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University – The possible presence of inhibitors of pancreatic lipase (tricaylglycerol acylhydrolase EC 3.1.1.3) was screened from Korean traditional edible or medicinal herbs. Among tested herbs, *Arecae pericarpium*, *Mucunae Caulis*, *Rhus javanica*, *Thujae orientalis* were shown to have strong inhibitory effect against pancreatic lipase. *Thujae orientalis* was finally selected as a candidate for pancreatic lipase inhibitor. The extract of *Thujae orientalis* was showed selective inhibition on porcine pancreatic lipase activity. Active inhibitors, TF-1, TF-2, TF-3, were purified from an extract of *Thujae orientalis*, using chloroform extraction, followed by successive chromatography in silica gel and LH-20 and high performance liquid chromatography (HPLC). The IC<sub>50</sub> values of TF-1, TF-2, TF-3 and orlistat were 44.7, 98.7, 46.1 and 27.6 µg/ml, respectively. And also the TF-2 and orlistat were shown to be inhibitory effect on the differentiation of preadipocyte NIH-3T3 L1 cells at a concentration of 10 µg/ml.

**Key words** – Pancreatic lipase inhibitor, *Thujae orientalis*

### 서 론

국내 산업의 발달 및 소득 수준의 향상과 더불어 식생활, 식습관 등 라이프스타일(life-style)의 서구화됨에 따라 만성병이나 성인병 환자가 급증하고 있으며, 그 기반이 되는 것 중의 하나가 비만이다. 비만은 단지 성인에게만 국한되는 것이 아니라 근간에는 소아비만과 청소년 비만으로까지 문제가 대두되면서 그 심각성을 더해가고 있는 실정이며, 국내 보건협회도 이미 비만을 만성질병으로서 규정하고 있는 실정이다. 비만은 체질량지수(Body Mass Index, BMI)가 30 BMI 이상인 경우를 의미하며, 25~30 BMI인 경우는 과체중으로 정의하고 있으며, BMI는 체중을 키의 제곱으로 나눈 값 ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )으로 계산한다[19]. 비만은 체내에 지방조직이 과다하게 축적되어 있는 상태를 의미하며, 비만의 가장 큰 원인은 고에너지나 고지방을 함유한 음식의 섭취 및 운동 부족으로 인한 체중의 증가나 체내 지방이 축적이지만[5,6], 최근에는 신경 내분비 계통의 이상, 약물, 유전적 요인 및 생화학적 이상 반응에 의해서도 유발되는 것으로 보고되고 있다 [2,11]. 세계보건기구(WHO)에 따르면, 현재 전 세계적으로 과체중 및 비만에 해당되는 사람들의 숫자는 12억 명에 이르며, 미국의 경우 성인 인구의 약 65%가 과체중에 해당된다고 발표하였으며[9], 건강을 위협하는 만성질병으로 규정하고

있다[21]. 또한 우리나라의 경우 2001년 국민건강심층분석보고서에 의하면 체질량지수 25 BMI 이상인 비만 인구가 20세 미만의 경우 11.2%, 20세 이상인 경우 31%로 비만 유병률이 점차 증가하는 추세로 파악되고 있다[1]. 이러한 비만현상은 단순히 외형상의 문제뿐만 아니라 체중 증가와 더불어 당뇨, 동맥경화, 심혈관질환, 고혈압, 고지혈증 등 심각한 성인병을 유발하는 것으로 보고 되어있다[7,10,14,16,20].

최근에는 비만치료제 개발을 위한 많은 연구가 진행되고 있으며, 그 중에 하나가 췌장 지방분해효소 저해제(pancreatic lipase inhibitor)이다. Pancreatic lipase는 triglyceride를 2-monoacylglycerol과 fatty acid로 분해하는 key enzyme으로 작용한다[3]. 대표적인 pancreatic lipase inhibitor는 *Streptomyces toxicinici*로부터 유래된 lipstatin의 유도체인 tetrahydrolipstatin (Orlistat, Ro 18-0647)으로서 섭취된 지방의 약 30%를 저해할 정도로 효능이 가장 우수한 것으로 알려져 있으며[8,12,13,17], 현재 의약품으로 시판중이다. 그러나 이와 같은 효능에도 불구하고 tetrahydrolipstatin은 위장장애, 과민증, 담즙분비장애, 지용성 비타민 흡수억제 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다[15]. 따라서 최근에는 부작용이 없는 식품 및 천연물로부터 pancreatic lipase inhibitor의 개발을 위한 연구가 진행되고 있다[18,22].

본 연구에서는 pancreatic lipase의 활성을 저해하는 물질을 탐색하고자 국내의 식용 또는 약용식물의 추출물을 대상으로 lipase 활성에 대한 저해능력을 측정하고 그 중에서 저해능이 우수한 백자인(*Thujae orientalis*) 추출물에 대한 결과

\*Corresponding author

Tel : +82-42-860-4312, Fax : +82-42-860-4595

E-mail : jsahn@kribb.re.kr

를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 생약재료인 백자인은 측백나무의 종자로서 대전의 일산약품(주)에서 구입하였다. 활성물질의 분리 및 확인에 사용된 silica gel (Kieselgel 60, particle size : 0.04 0~0.063 nm)은 Merck사 (Darmstadt, Germany), ODS RP-18 (ODS-A, 120A, S-150  $\mu\text{m}$ )은 YMC-GEL사 (Tokyo, Japan)로부터 구입하였고, TLC에 이용된 precoated silica gel plates 60F<sub>254</sub> (0.25mm and 0.5 mm in thickness)와 ODS RP-18 F<sub>254S</sub> (25DC-Platten 5×10 cm)는 Merck사 (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 각 분리단계에 이용된 유기용매는 덕산약품공업(주)의 고순도 제품을 사용하였고, HPLC 용매는 Burdick & Jackson (Muskegon, USA)을 사용하였다. pancreatic lipase assay에 사용한 tributyltin은 Fluka (St. Gallen, Switzerland)에서, pancreatic lipase (Type VI-S, porcine pancreas), gum arabic은 Sigma (St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. 그 외에 사용된 시약은 모두 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

### Pancreatic lipase 활성 저해물질의 탐색

10 mM CaCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl을 포함한 5% gum arabic 용액 100 ml을 제조하여 9 ml을 취한 후, 여기에 tributyltin 1 ml을 섞어 초음파장치 내에서 유화시킨 후, 2% 한천배지에 혼합하여 평판배지를 제조하였다. 5 mm 두께의 한천배지에 지름 6 mm의 구멍을 만들고, 메탄올에 녹인 시료와 pancreatic lipase 용액을 섞어 3분간 반응시켜 넣은 후 4시간 후 투명환(clear zone)의 형성 크기를 측정하여 pancreatic lipase에 대한 저해활성을 측정하였다.

### Pancreatic lipase 활성 및 저해능 측정

Pancreatic lipase의 활성 및 저해능은 Bitou 등[3]의 방법에 따라 triolein으로부터 분리되는 oleic acid를 측정함으로써 결정하였다. 기질은 0.1 M NaCl이 첨가된 0.1 M N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid (pH 7.0) 9 ml에 90  $\mu\text{mol}$  triolein, 45  $\mu\text{g}$  gum arabic과 9.45  $\mu\text{mol}$  taurocholic acid을 넣고 초음파로 5분 동안 처리하여 제조하였다. Lipase 활성측정을 위한 반응용액은 효소용액 (pancreatic lipase, 1500 U/ml) 15  $\mu\text{l}$ , 식물추출물 5  $\mu\text{l}$ , 기질 용액 180  $\mu\text{l}$ 을 섞어 최종 반응용액의 부피는 200  $\mu\text{l}$  되도록 제조한 후, pH 7.0, 반응온도 37°C에서 30분 간 반응시켰다. 효소반응 후 생성된 oleic acid의 정량은 Zapf 등[22]의 방법에 따라 결정하였다. 효소반응 후 반응용액 0.2 ml에 2%(v/v) methanol이 포함된 chloroform/heptane(1:1) 용액

3 ml을 첨가하여 10분 동안 교반한 후, 10분 동안 원심분리 (2,000×g)하여 수층을 제거하였다. 여기에 copper 반응액 1 ml을 첨가하여 다시 10분 동안 교반한 후, 10분 동안 원심분리 (2,000×g)하여 추출된 oleic acid와 copper salt가 포함된 유기용매 1 ml을 취하여 0.05%(w/v) 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole이 포함된 0.1%(w/v) bathocuprione 용액 1 ml을 첨가한 후, 480 nm에서 흡광도를 측정하여 oleic acid를 정량함으로써 효소 활성을 측정하였다.

### NIH-3T3 L1 세포의 분화 및 분화능 측정

실험에 사용된 NIH-3T3 L1 세포(preadipocyte)는 ATCC에서 분양받아 10% FBS, 50 U/ml penicillin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 접종하여 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에 배양하였다. NIH-3T3 L1 세포를 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 세척한 후, 5×10<sup>4</sup> cells/ml을 12 well-flat plate에 배양하였다. 48시간 동안 배양 후 10% FBS, 0.5 mM dexamethasone (DEXA), 10 mg/ml insulin, 1  $\mu\text{M}$  3-isobutyl-1-methyloxanthine (IBMX)이 첨가된 배지에서 48시간 동안 배양하고, 이후 2일 간격으로 6일 동안 10% FBS가 첨가된 배지에 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulin과 시료를 첨가하여 분화를 유도하였다.

NIH-3T3 L1 세포의 분화 정도는 역상현미경으로 관찰하여 세포 내 밝은 색의 지방과립이 형성되는 것을 확인하였고, 세포의 분화정도는 Oil red O로 염색하여 측정하였다. 60% triethyl-phosphate 100 ml에 500 mg Oil red O를 녹인 후 여과하여 Oil red O stock solution을 제조하고, Oil red O stock solution 12 ml에 중류수 8 ml을 혼합하여 실험에 사용하였다. 세포 배양 8일 후 분화된 세포를 관찰하기 위하여 배지를 제거하고 10% formaldehyde를 처리하여 1시간 동안 고정하였다. PBS 용액으로 두 번 세척하고 건조시킨 후, 1 ml Oil red O 용액으로 처리하여 3시간 동안 염색하였다. 다시 PBS 용액으로 세척하고 건조시킨 후, isopropanol을 처리하여 염색된 지방과립을 추출하여 microplate reader (Beckman, USA)로 510 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포의 분화 정도를 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### Pancreatic lipase 저해활성 물질의 탐색 및 선정

본 실험실에서 보유하고 있는 식용 및 약용식물의 추출물을 대상으로 pancreatic lipase의 활성 저해물질을 탐색하였다. 각각의 식물은 methanol로 추출하여 1 mg/ml이 되도록 제조한 후, pancreatic lipase 용액과 섞어 3분간 반응시킨 후, tributyltin을 함유한 평판배지의 구멍에 넣고 4시간 후 투명환(clear zone)의 크기를 측정하여 pancreatic lipase의 activ-

ity를 측정하여 투명환의 크기가 작은 시료를 1차 탐색하여 13종의 식물을 선정하였다. 선정한 각각의 식물추출물을 methanol, chloroform, buthanol, H<sub>2</sub>O 층으로 용매분획하여 1 mg/ml 농도가 되도록 시료를 제조하여 pancreatic lipase에 대한 저해능을 조사하였다. 그 결과 methanol 추출물의 경우, pancreatic lipase에 대한 저해 효과는 *Arecae pericarpium*(대복피), *Mucunae Caulis*(계혈등), *Rhus javanica*(오배자), *Thujae orientalis*(백자인)이 우수한 저해활성을 나타냈다. 대부분의 추출물은 chloroform 분획에 활성이 있는 것으로 나타났으며, 오배자 등은 buthanol 분획에서도 활성이 있었다(Table 1).

Table 1의 결과에 따라 lipase에 대한 저해활성이 우수한 대복피, 계혈등, 오배자, 백자인의 methanol 추출물과 orlistat를 1 mg/ml로 제조하여 각 시료가 *Chemobacterium* sp., *Candida* sp., *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., 기원의 lipase와 porcine pancreatic lipase에 대한 선택적 저해활성 여부를 조사하였다(Table 2). Orlistat의 경우, *Candida* sp. 유래 lipase나 porcine pancreatic lipase에 대해 상대적으로 강한 활성을 나타냈으며, 미생물에서 유래하는 lipase의 종류에 따라 제어

활성의 차이를 나타내지만, 선택적 제어활성은 크지 않은 것으로 판단된다. 그러나 본 실험에서 선정한 대복피의 경우에는 미생물유래 lipase보다는 porcine pancreatic lipase에 대하여 강한 저해활성을 나타냄으로써 선택적 제어효과가 있는 것으로 사료된다. 또한 복분자 추출물의 경우에는 *Chemobacterium* sp.와 porcine pancreatic lipase에서, 백자인의 경우에는 *Chemobacterium* sp., *Candida* sp. 유래 lipase와 porcine pancreatic lipase에서 상대적으로 우수한 저해효과를 나타내었다. 이와 같은 결과를 근거로 본 실험에서는 lipase에 대한 활성이 가장 우수한 것으로 판단되는 백자인을 대상으로 pancreatic lipase에 대한 저해활성 연구를 진행하였다.

#### Pancreatic lipase 저해활성 물질의 탐색

백자인으로부터 pancreatic lipase 활성물질을 분리하기 위하여 Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 백자인 200g을 6일 동안 메탄올 1 L에 침지하여 3회 추출하고 진공회전농축기로 감압, 농축하여 39.6g를 회수하고 이를 chloroform, buthanol, H<sub>2</sub>O로 각각 분획하였다. Panreatic lipase에 대해 강한 저해활성을 나타내는 chloroform 층을 감압농축하여 21.7g를 획득한 후, 이를 *n*-hexane/chloroform(1/1, v/v) 조건에서 silica gel column chromatography(Kieselgel 60, particle size : 0.040~0.063 nm)를 실시하여 활성물질 2.4g을 용출하였다. 얻어진 활성분획을 chloroform / *n*-hexane/methanol(2/3/1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 활성분획 0.74 g을 획득하였다. 활성물질의 순도를 높이기 위하여 HPLC(YMC, ODS-H80, 250×20mm, 30% CH<sub>3</sub>CN(0.01% TFA), flow rate 2 ml/min)를 수행하여 최종적으로 활성물질 TF-1, Tf-2, TF-3 각각 3.5mg, 24. mg, 1.3mg을 분리하였다.

#### 백자인 추출물의 pancreatic lipase에 대한 저해효과

최종 분리된 활성물질 TF-1, TF-2, TF-3 및 orlistat를 최종 반응농도별(1~250 μg/ml)로 제조하여 porcine pancreatic lipase에 대한 저해효과를 측정하였다(Fig. 2). Fig. 2에 나타난 바와 같이 활성물질 및 orlistat의 처리농도가 증가함에 따

Table 1. Inhibition of pancreatic lipase activity by herbal plants extracts

Samples	Solvent	MtOH	Chloroform	Buthanol	H <sub>2</sub> O
<i>Amomum kravanh</i> (백두구)	++	++	-	-	-
<i>Areca catechu</i> (빈랑)	++	+	-	-	-
<i>Arecae pericarpium</i> (대복피)	+++	+++	-	-	-
<i>Caesalpinia sappan</i> (소목)	+	-	+	-	-
<i>Cinnamomi ramulus</i> (계지)	++	+	-	-	-
<i>Coptis japonica</i> (황련)	++	++	-	-	-
<i>Magnolia liliiflora</i> (신이화)	++	+	+	-	-
<i>Mucunae Caulis</i> (계혈등)	+++	+++	+	-	-
<i>Nelumbo nucifera</i> (연자육)	+	+	+	-	-
<i>Rubus coreanus</i> (복분자)	++	++	-	-	-
<i>Rhus javanica</i> (오배자)	+++	+++	++	-	-
<i>Thujae orientalis</i> (백자인)	+++	+++	-	-	-
<i>Zedoariae rhizoma</i> (봉출)	++	+	-	-	-

Inhibitory effect : +++; very strong; ++; strong; +; weak; -; none

Table 2. Selective inhibition of lipase activity by herbal plants extracts

Lipase source	Inhibition(%) <sup>a</sup>					
	Samples	Orlistat	<i>Arecae pericarpium</i>	<i>Mucunae caulis</i>	<i>Rubus coreanus</i>	<i>Thujae orientalis</i>
<i>Chemobacterium</i> sp.	72.8	64.3	55.9	81.4	86.7	
<i>Candida</i> sp.	98.8	50.6	48.6	60.8	88.9	
<i>Trichoderma</i> sp.	57.9	48.7	36.7	66.4	42.3	
<i>Rhizopus</i> sp.	58.6	36.1	28.6	54.0	36.3	
Porcine	84.3	96.7	51.1	85.2	99.4	

<sup>a</sup>Inhibition(%) means relative enzyme activity to a control of no treatment.

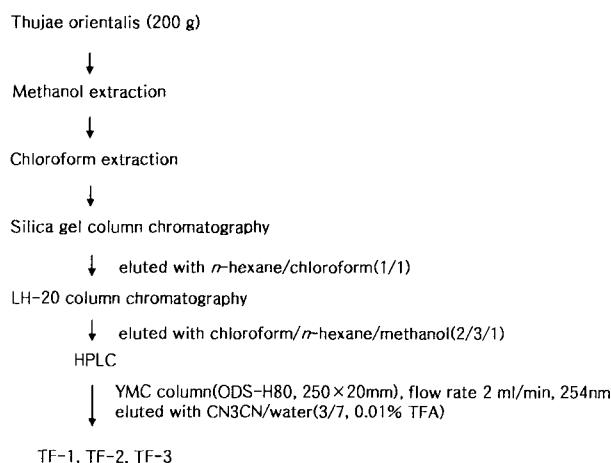


Fig. 1. Isolation procedure of pancreatic lipase inhibitor from *Thujae orientalis*.

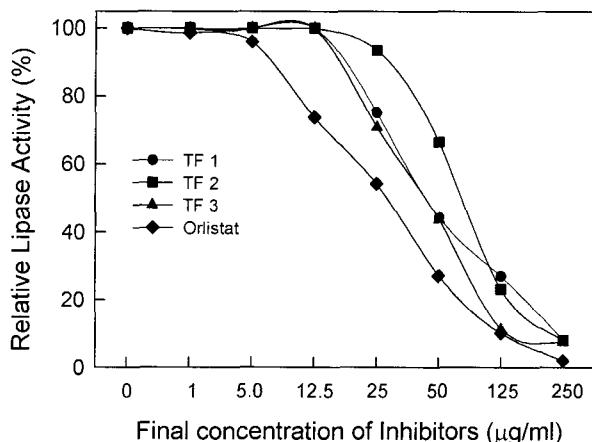


Fig. 2. Inhibitory effect of *Thujae orientalis* extracts on lipase activity : Lipase activity was measured using porcine pancreatic lipase and Inhibitory effect was shown as the lowering of relative activity(%) against the lipase activity of control.

라 lipase에 저해효과도 증가함을 알 수 있었다. Porcine pancreatic lipase에 대한 저해효과는 TF-2보다 TF-1, TF-3가 다소 우수한 것으로 나타났으나, 대조구로 사용한 orlistat 보다는 다소 저해효과가 낮은 것으로 조사되었다. 이 때 각 활성물질 TF-1, TF-2, TF-3 및 orlistat의 porcine pancreatic lipase에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 각각 44.7, 98.7, 46.1 및 27.6 μg/ml이었다. 이와 같은 결과로 보아 본 실험에서 탐색한 백자인 추출물 TF-1, TF-2, TF-3은 비록 시판되고 있는 orlistat보다는 lipase에 대한 활성저해능을 다소 떨어지더라도 좀 더 순수하게 정제된 후에는 그 활성이 더욱 높아질 것으로 예상된다.

#### 백자인 추출물의 지방세포 분화에 대한 저해효과

백자인 추출물 TF-1, TF-2, TF-3 및 orlistat의 농도를 10 μg/ml 제조한 후, 미분화상태 전구 지방세포인 NIH-3T3 L1의

Table 3. Effect of *Thujae orientalis* extract and orlistat on adipocyte differentiation analyzed by Oil red O staining and extraction method

Treatment	Absorbance(510 nm) <sup>a</sup>	Percent (%) <sup>b</sup>
Control <sup>c</sup>	3.14	100
TF-1	2.41	76.75
TF-2	0.78	24.84
TF-3	1.89	60.19
Orlistat	0.75	23.88

a NIH-3T3 L1 was stained with Oil red O for 3 hr. The dye containing lipid droplet was extracted with isopropanol and its absorbance was determined at 510 nm.

b Percent(%) : absorbance ratio to control.

c Control : no treatment

지방세포로의 분화에 미치는 영향을 조사하였다(Table 3). NIH-3T3 L1이 지방세포로 분화되는 정도의 측정은 지방세포 내 lipid droplet 형성정도로 측정하였다. 즉 지방세포 내 lipid droplet을 Oil red O 시약으로 염색하여 isopropanol로 용출시켜 510 nm에서 흡광도를 측정한 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 TF-1, TF-3를 처리한 실험구에서는 대조구에 비해 지방세포 분화능이 각각 76.75, 60.19%로 나타났다. 반면, TF-2를 처리한 실험구에서는 24.84%의 지방세포 분화도를 나타내었으며, orlistat를 처리한 실험구에서는 23.88%의 분화도를 나타내는 것으로 조사되었으므로 TF-2 및 orlistat의 경우 지방세포 분화 저해정도가 우수함을 확인할 수 있었다. 따라서 활성물질 TF-2가 지방세포 분화의 지표로 사용되는 lipid droplet의 형성을 억제함으로써 지방세포 분화를 저해하는 효과도 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

#### 요 약

Pancreatic lipase의 활성을 저해하는 물질을 탐색하고자 국내의 식용 또는 약용식물의 추출물을 대상으로 lipase 활성에 대한 저해능력이 있는 식물추출물은 탐색한 결과 대복피, 계절등, 오배자 및 백자인의 식물추출물을 선정하였다.

Pancreatic lipase에 대한 저해활성이 우수한 백자인으로부터 클로로포름 용매추출, 실리카겔 컬럼크로마토그라피, 세파네스 LH-20 컬럼크로마토그라피와 고속액체크로마토그라피를 실시하여 pancreatic lipase에 대한 저해활성 물질로 TF-1, TF-2, TF-3를 분리하였다. 이들을 대상으로 porcine pancreatic lipase에 대한 저해효과를 측정한 결과, 활성물질 TF-1, TF-2, TF-3 및 orlistat의 porcine pancreatic lipase에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 각각 44.7, 98.7, 46.1 및 27.6 μg/ml인 것으로 나타났다. 활성물질 TF-2와 orlistat의 경우에는 10 μg/ml의 농도에서 NIH-3T3 L1의 지방세포로의 분화에도 억제효과가 있음을 입증하였다.

## 참 고 문 헌

1. 보건복지부. 2002. 2001년 국민영양조사.
2. Alberti, K. G. and P. Z. Zimmet. 1988. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* **13**, 539-553.
3. Bitou, N., M. Nimomiya, T. Tsjita and H. Okuda. 1999. Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids* **34**, 441-445.
4. Borgstrom, B. 1986. Luminal digestion of fat. pp. 361-373. In Go I (ed.). *The exocrine pancreas : biology, pathobiology, and disease*. Raven Press, New York.
5. Bray, G. A. and B. M. Popkin. 1998. Dietary fat intake dose affect obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 1157-1173.
6. Bray, G. A. and B. M. Popkin. 1999. Dietary fat affects obesity rate. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 572-573.
7. Diehl, A. K. 1991. Epidemiology and natural history of gallstone disease. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **20**, 1-19.
8. Drent, M. L., I. Larsson, T. William-Olsson, F. Quaade, F. Czubayko, K. Von Bergmann, W. Strobel, L. Sjotro and E. A. Van der Veen. 1995. Orlistat (RO 18-0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: a multiple dose study. *Int. J. Obes.* **19**, 221 -226.
9. Flegal, K. M., M. D. Carroll, C. L. Ogden, and C. L. Johnson. 2002. Prevalence and trends in obesity among U.S. adults, 1999 - 2000. *JAMA* **288**, 1723 - 1727.
10. Freedman, D. S., M. K. Serdula, C. A. Perey and L. Whittle. 1997. Obesity levels of lipids and glucose, and smoking among Navajo adolescents. *J. Nutr.* **127**, 2120S-2127S.
11. Grundy, S. M. 1999. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* **83**, 25F - 29F.
12. Hadvay, P., H. Lengsfeld and H. Wolter. 1988. Inhibition of pancreatic lipase *in vitro* by covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem. J.* **256**, 357-361.
13. Hauptman, J. B., F. S. Jeunet and D. Hartmann. 1992. Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647(tetrahydrolipstatin). *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 309S -313S.
14. Larsson, B., P. Björntorp and G. Tibblin. 1981. The health consequences of moderate obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **5**, 97 - 106.
15. Peter, C. and G. Williams. 2001. Drug treatment of obesity: from past failures to future successes?. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **51**, 135-141.
16. Rexrode, K. M., J. E. Manson and C. H. Hennekens. 1996. Obesity and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Cardiol.* **11**, 490 - 495.
17. Shimura, S., W. Tsuzuki, Y. Itoh S. kobayashi and T. Suzuki. 1994. Inhibitory effect of tannin fraction *Cassia mimosoides* L. var. *nomame* makino on lipase activity. *Nippon Shokuhin Kogakusha Gakkaishi*. **41**, 561-564.
18. Sjostrom, L., A. Rissanen, T. Andersen, M. Boldrin, A. Golay and H. P. F. Koppeschaar. 1998. Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. *Lancet* **352**, 167 -172.
19. Taylor, C. B., S. P. Fortman, J. Flora, S. Kayman, D. C. Barrett, D. Jatulis and J. W. Farquhar. 1991. Effect of long term community health education on body mass index. *Am. J. Epidemiol.* **134**, 235-249.
20. Wada, K. and Y. Ikeda. 1998. Longitudinal studies to determine the effect of body fat rate reduction on blood pressure. *J. Med. Syst.* **22**, 19 - 25.
21. World Health Organization Consultation on Obesity. 1998. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic*. World Health Organization: Geneva.
22. Yamamoto, M., S. Shimura, Y. Iyoh, M. Egawa and S. Ionue. 2000. Anti-obesity effects of lipase inhibitor CT-II, an extract from edible herbs, Nomame Herba, on rats fed a high-fat diet. *Int. J. Obesity* **24**, 758-764.
23. Zapf, J., E. W. Schoenole, M. Waldvogel, M. Sand and E. R. Froesch. 1981. Effect of trypsin treatment of rat adipocyte on biological effects and binding of insulin and insulin-like growth factors : Further evidence for the action of insulin-like growth factors through the insulin receptor. *Eur. J. Biochem.* **133**, 605-609.