

# 大黃이 고지방식으로 비만이 유발된 C57BL/6 mouse의 지방조직 염증 및 인슐린 저항성에 미치는 영향

최승범<sup>1</sup>, 마영훈<sup>1</sup>, 한양희<sup>1</sup>, 정수정<sup>2</sup>, 조홍석<sup>3</sup>

<sup>1</sup>동신한방병원 한방내과, <sup>2</sup>동신한방병원 한방부인과, <sup>3</sup>동수원한방병원 침구과

## Effects of *Rhei Radix et Rhizoma* on Insulin Resistance and Adipose Tissue Inflammatory Response in High Fat Diet Induced Obese C57BL/6 Mice

Seung-bum Choi<sup>1</sup>, Young-hoon Ma<sup>1</sup>, Yang-hee Han<sup>1</sup>, Soo-jung Jung<sup>2</sup>, Hong-seok Cho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Oriental Internal Medicine, Dong-Shin Oriental Medicine Hospital

<sup>2</sup>Dept. of Oriental Gynecology, Dong-Shin Oriental Medicine Hospital

<sup>3</sup>Dept. of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Dongsuwon Oriental Medical Hospital

### ABSTRACT

**Objectives :** The purpose of this study was to investigate how *Rhei Radix et Rhizoma* affects on insulin resistance and adipose tissue inflammatory response in high fat diet induced obese C57BL/6 mice.

**Methods :** Obesity was induced in C57BL/6 mice by high fat diet for 12 weeks. Models were divided into 3 groups (n=6) of normal diet, high fat diet (HFD), and high fat diet with *Rhei Radix et Rhizoma* and investigated for 12 weeks. We measured body weight, FBS and oral glucose tolerance test (OGTT), serum insulin, homeostatic model assessment-insulin resistance (HOMA-IR), weight of liver and epididymal fat pad. Inflammatory markers such as adipose tissue macrophage (ATM), tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 and CD68 of epididymal adipocyte were determined to evaluate the effect of *Rhei Radix et Rhizoma* on adipose tissue inflammation.

**Results :** Compared with the HFD group, we observed loss of body weight and epididymal fat pad weight, improvement of glucose level and HOMA-IR, reduction of ATM and gene expression of TNF- $\alpha$ , CD68 in the high fat diet with *Rhei Radix et Rhizoma* group.

**Conclusions :** This study suggests that *Rhei Radix et Rhizoma* has effects on insulin resistance and adipose tissue inflammatory response in high fat diet induced obese mice.

**Key words :** *Rhei Radix et Rhizoma*, insulin resistance, obesity, adipose tissue inflammation

## 1. 서론

비만은 만성적으로 에너지 공급이 에너지 소비를

초과 했을 때 일어나는 에너지의 불균형에 의해 지방세포의 증가 및 분화 이상으로 유발 된다<sup>1</sup>. 최근의 연구들을 통하여 비만이 인슐린 저항성과 만성 염증상태와 밀접한 관련이 있으며<sup>2</sup> 지방세포를 단순히 에너지를 저장하는 수동적인 조직이 아닌 내분비기관으로 인식하게 되면서 지방세포에서 분비하는 cytokine(adipokine)들이 그 신호전달에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다<sup>3,4</sup>. 비만한 상태

· 교신저자: 한양희 서울시 양천구 목동 오목로 351  
동신한방병원  
TEL: 02-2640-2931 FAX: 02-2640-2727  
E-mail: omdhyh@hanmail.net

· 이 논문은 2014년 2월 동신대학교 일반대학원 한의학과 내과  
학전공 석사학위 논문임.

에서는 지방조직에서 tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ , interleukin(IL)-6와 같은 inflammatory cytokine이 증가하는데, 이는 지방조직의 대식세포 증가와 동반되어 나타난다<sup>5</sup>. 이러한 cytokine들은 대식세포와 상호작용을 하면서 지방조직에서의 염증반응과 인슐린 저항성에 중요한 역할을 한다<sup>6</sup>. 지방세포에서 시작된 염증반응이 어떻게 전신적인 인슐린 저항성을 일으키는지는 알려져 있지 않다. 다만 최근의 연구에서는 비만한 개체의 지방세포에서 지방 분해에 의해 많은 양의 유리지방산이 방출 되고, 혈액 속에 증가된 유리지방산이 근육 및 간에서 인슐린 신호전달에 이상을 가져와 저항성을 유발한다는 가설을 제시하였다<sup>7,8</sup>.

大黃(*Rhei Radix et Rhizoma*)은 苦寒沈降하고 力猛善行하여 下焦에 直達하므로 腸胃의 積滯를 蕩滌하고, 血分の 實熱을 清熱瀉火하는 效능을 도와 血로 들어가 降泄시키며, 또한 活血逐瘀의 效능이 있어 攻積, 瀉火, 逐瘀의 要藥이 된다<sup>9</sup>. 최근의 연구에서 정 등<sup>10</sup>은 대황이 전염증성 cytokine들로 분류되는 IL-6, TNF- $\alpha$  등의 생산을 억제하여 염증반응을 제어하는 효과를 밝혔다. 이러한 cytokine들은 비만에서도 염증반응과 인슐린 저항성에 중요한 역할을 하는 인자들로 이 연구는 대황이 비만환자의 지방조직 염증 및 인슐린 저항성을 제어하는데 활용될 수 있는 가능성을 보여준다. 이를 토대로 이번 연구에서는 대황을 실제 비만이 유발된 동물 모델에 투여하여 체중, 인슐린 저항성, 지방조직 및 간의 무게, cytokine, macropahge 등의 수치를 측정하여 지방조직의 염증 및 인슐린 저항성에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 실험 약재

본 실험에 사용된 약재인 大黃(*Rhei Radix et*

*Rhizoma*)은 마디풀과에 속한 다년생 본초인 *Rheum palmatum* L. 의 뿌리줄기로 경희한약에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) 동물

19~21 g의 6주령 male C57BL/6(중앙실험동물, Korea)를 구매하여, 12시간씩 낮과 밤이 교대되며 40~70%의 습도가 유지되는 stainless-steel cage에서 1주일간 사육하며 적응기를 거쳤다. 먹이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

#### 3) 시약 및 기기

각종 시약으로는 phosphate buffered saline(PBS, Gibco, USA), bovine serum albumin(BSA, Gibco, USA), collagenase(Sigma, USA), DNase I(Roche, USA), Fetal bovine serum(FBS, Sigma, USA), RBC lysis buffer(eBioscience, USA), Fc Block(BD Pharmingen, USA), CD45-APC Cy7(BD Pharmingen, USA), F4/80-APC(eBioscience, USA), CD11b-phycoerythrin(CD11b-PE, BD Pharmingen, USA)를 사용하였다.

측정을 위해 사용된 기기는 rotary evaporator (Model NE-1, 東京理化學株式會社, Japan), 동결건조기(Model FD-1, 東京理化學株式會社, Japan), 전자저울(CAS 2.5D, Korea), strip-operated blood glucose sensor(ONETOUCH Ultra Inverness Medical Ltd. Stockport. UK), Ultra sensitive mouse insulin ELISA kit(Crystal Chem INC, USA), cell strainer(BD bioscience, USA), Mini RNA Isolation IITM(ZYMO RESEARCH, USA), cellometer(Nexcelom Bioscience LLC, USA), FACS LSRII(BD bioscience, USA), FlowJo 프로그램(Tree star, inc, USA), Advantage RT for PCR Kit(Clontech, USA), 7.900HT Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems®, USA), SDS Software 2.4(Applied Biosystems®, USA), 통계학적 비교 분석기(GraphPad PRISM statistical package(ver 2.00), Graphpad software inc, USA)를 사용하였다.

2. 방법

1) 검체 제조

총량 1000 g의 대황(*Rhei Radix et Rhizoma*)을 1,500 ml의 증류수에 넣어 4시간동안 가열추출하고, 여과한 여액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조기로 건조시켰다. 동결 건조된 각 약제 1차 추출물 1 g씩을 10 ml의 증류수로 용해시킨 후 95 °C 수조에서 2시간 동안 재차 가열 추출하였고, 이들 추출물을 원심분리용 시험관에 담아

14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상청액을 수거하였다. 이 상청액을 직경 0.2 µm의 여과지를 통과시켜 여과 멸균하였으며, 사용할 때까지 -70 °C에 보관하였다. 대황의 최종 수거율은 21.3%이었다.

2) 고지방 식이 유발 비만 동물 모델의 제작

정상군을 제외한 모든 실험군에 60% fat diet (HFD, Research Diets, D12492)를 12주간 섭취시켜 비만을 유발했다(Table 1).

Table 1. Composition of Experimental Diets.

	Normal	Control	Rheum
Casein, 30 Mesh (g)	22.0	25.85	25.85
L-Cysteine (g)	0.18	0.39	0.39
Corn Starch (g)	50.0		
Maltodextrin (g)	7.5	16.15	16.15
Sucrose (g)	10.0	8.89	8.89
Cellulose, BW200 (g)		6.46	6.46
Soybean oil (g)	4.0	3.23	3.23
Lard (g)		31.66	31.66
Mineral Mix S10026 (g)	4.0	1.29	1.29
DiCalcium Phosphate (g)		1.68	1.68
Calcium Carbonate (g)		0.71	0.71
Potassium Citrate, 1 H <sub>2</sub> O (g)	0.4	2.13	2.13
Vitamin Mix V10001 (g)	1.0	1.29	1.29
Choline Bitartrate (g)	0.2	0.26	0.26
Sodium Bicarbonate (g)	1.0		
Rheum (g)			5
Total (g)	100.28	99.99	104.99

Normal : normal diet

Control : 60% fat diet

Rheum : 60% fat diet with *Rhei Radix et Rhizoma*

3) 실험군 배정 및 연구 계획

Male C57BL/6 mouse 6마리씩을 정상군(normal), 대조군(control), 대황 투여군(Rheum)으로 나누었다. 정상군을 제외한 나머지 2개 군들은 60% fat diet를 12주간 섭취시켜 비만형 제2형 당뇨병을 유발했다. 대황 투여군은 HFD에 대황을 5%의 비율

로 섞어 12주간 섭취하도록 했다.

4) 체중 측정

체중은 실험 개시 일에 최초 측정 한 후 실험종료일인 12주째 마지막 sampling하기 전에 측정하였다. 체중 측정은 아침 사료 공급 전에 일괄적으로 전자저울을 사용하여 측정하였으며, 측정 시 mouse의

움직임에 따른 체중 오차를 최소화하기 위해 플라 스틱 bowl에 mouse를 올려놓고, mouse가 안정 상태에 이르러 나타나는 체중을 기록하였다.

5) 경구당부하검사(oral glucose tolerance test, OGTT)

경구 당부하 검사는 실험 11주째 12시간 이상 금식시킨 후 공복 시 혈당을 측정한다 다음, glucose (2 g/kg body weight)를 D.W.에 녹여 경구 투여시킨 다음 30분 후, 60분 후, 90분 후, 120분 후 mouse의 tail vein에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 혈당은 strip-operated blood glucose sensor를 이용하여 측정하였다.

6) 인슐린 저항성 및 혈중 인슐린 농도 측정

인슐린 저항성은 HOMA-IR을 이용하여 측정하였다. 실험 시작 12주째에 12시간 이상 금식시킨 후 공복 시 혈당 및 insulin을 측정하였고, HOMA-IR은 다음의 공식을 이용하여 계산하였다.

$HOMA-IR = \text{공복혈당(fasting blood glucose)}(\text{mg/dl}) \times \text{공복인슐린(fasting blood insulin)}(\text{ng/ml}) \times 0.0717225161669606$

혈중 인슐린 농도 측정을 위해 실험 시작 12주째 실험쥐의 tail vein에서 혈액을 채취한 다음, 4 °C에서 2,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 인슐린은 Ultra sensitive mouse insulin ELISA kit을 이용하여 측정하였다. 96well antibody-coated microplate에 insulin standards 및 샘플을 5 µl 씩 분주한 다음 4 °C에서 2시간 동안 반응시킨 다음 5차례 세척 후 anti-insulin enzyme conjugate를 각 well에 분주하고 30분간 실온에서 반응시켰다. 이후 7차례 세척 후 enzyme substrate solution을 넣고 40분간 반응시킨 다음, reaction stop solution을 넣고 10분후 ELISA reader를 이용하여 450 nM에서 분석하였다.

7) 부고환 지방조직 및 간 무게 측정

실험 시작 12주째 mouse를 희생시킨 후 개복하여 부고환 지방조직(epididymal fat pad) 및 간의 무게를 측정하였다.

8) Stromal vascular cell의 분리

지방조직은 실험 시작 12주째 mouse를 희생시킨

후 개복하여 부고환 지방조직을 채취하였다. Mouse 으로부터 채취한 지방조직은 phosphate buffered saline 에 2% bovine serum albumin을 혼합한 용액에 넣은 다음, round shape scissor를 이용하여 1~2 mm 크기의 작은 조각으로 분쇄하였다. 여기에 collagenase 와 DNase I를 넣어 37 °C에서 20분간 shake하여 조직이 분쇄되도록 하였다. 2% BSA/PBS에 5 mM EDTA를 넣은 용액을 각 tube에 넣고 섞은 다음, 250 µm필터로 분쇄되지 않은 지방조직을 걸러낸 다음 1,000 rpm으로 3분간 원심분리 하였다. 지방세포(adipocyte)가 포함된 상층액을 스포이드를 이용해 분리한 다음 하층의 pellet을 제외한 나머지 용액을 제거하고, PBS에 2% fetal bovine serum을 혼합한 용액에 넣은 다음 100 µm cell strainer를 이용하여 불필요한 조직을 제거하고, 200× g에서 10분 동안 원심분리 하여 하부의 모아진 세포를 RBC lysis buffer에 10분 간 처리, 원심분리 하여 Stromal vascular cell를 모았다.

9) 지방조직에서의 RNA 분리

실험 시작 12주째 mouse를 희생시킨 후 개복하여 부고환 지방조직을 분리하여 알루미늄 호일에 싸서 신속하게 액화질소에 담가 보관 후 RNA 분리 전까지 -70 °C에 보관하였다. 지방조직에서의 RNA 분리는 Mini RNA Isolation II™을 이용하였다. 보관된 지방조직을 해동시킨 다음 tube에 넣고 여기에 ZR RNA buffer 300 µl씩을 분주한 다음, homogenizer를 이용하여 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직이 담긴 tube를 1,000 rpm에서 원심분리한 후, 상층액을 Zymo-Spin III column에 옮기고 이를 2 ml collection tube에 꽂은 다음 2,000 rpm으로 1분간 원심분리하였다. Column에 RNA wash buffer 350 µl를 분주하고 1분간 원심분리하여 2회 세척한 후, column을 1.5 ml tube에 옮겨 꽂은 다음, RNA-free water 50 µl를 분주하여 1,000 rpm으로 원심 분리하여 최종적으로 RNA를 수거한 후 사용하기 전까지 -70 °C에 보관하였다.

10) Adipose tissue macrophage(ATM)에 대한

fluorescence activated cell sorting(FACS) 분석

지방조직에서 분리한 SVC를 cellometer를 이용하여 세포 수를 측정하고 다음 각 샘플당  $10^6$  cell 농도로 조정했다. FcBlock(20  $\mu$ g/ml)를 1:100의 비율로 넣고 10분간 반응시킨 다음, fluorophore-conjugated 된 antibodies인 CD45-APC Cy7, F4/80-APC, CD11b-phycoerythrin를 넣고 차광상태에서 20분간 반응시켰다. 2% FBS/PBS 용액으로 세척한 다음, FACS LSRII를 이용하여 분석했다. 이후 FlowJo 프로그램을 이용하여 CD45 (+)인 macrophage 중 CD11b (+), F4/80 (+)인 macrophage의 퍼센트를 분석했다.

11) 염증관련 유전자 발현 분석

지방 세포의 TNF- $\alpha$ , IL-10 및 CD68 유전자의 발현 측정은 실시간 정량 역전사 연쇄중합반응(quantitative real time-polymerase chain reaction :qRT-PCR)을 이용하여 측정하였다. qRT-PCR에 앞서 cDNA의 제작은 Advantage RT for PCR Kit을 이용하였다. 지방조직에서 분리한 1  $\mu$ g의 RNA에 OligodT와 RNase-free H<sub>2</sub>O를 넣고 70 °C에서 2분간 반응시킨 다음, 10 nM dNTP, Recombinant RNase Inhibitor, MMLV Reverse Transcriptase, 5X Reaction Buffer를 각각 넣고 42 °C에서 60분, 94 °C에서 5분씩 반응시켰다. 역전사를 통해 얻어진 각각의 complementary DNA(cDNA)에 2 $\times$  SYBR Reaction buffer, primers, dH<sub>2</sub>O를 혼합하여 7900HT Fast Real-Time PCR System를 이용하여 연쇄중합반응을 시행하였다. 유전자 발현 분석은 SDS Software 2.4를 이용하여 얻은 각각의 유전자에 대한 threshold cycle(CT)값을 GAPDH 기준으로 relative quantitation(RQ)값을 환산한 다음 fold change값을 계산하였다. 측정된 fold change값은 정상군을 1로 산정하여 이에 대한 값으로 환산하여 표시하였다.

12) 통계 분석

통계학적 비교분석은 GraphPad PRISM statistical package를 이용하였고, 각 군 간의 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)에 이어 Tuckey's post-hoc test로 검증하였다. 표(Table)와 그림(Figure)에서 각

각의 수치는 평균 $\pm$ 표준오차(mean $\pm$ S.E.)로 표시했으며, 양방 검정 유의도(Two-tailed p value)는 p값이 <0.05 수준일 때를 기준으로 하였다.

III. 결 과

1. 체중에 미치는 영향

실험 시작 12주 후 대조군의 체중은 41.79 $\pm$ 0.51 g로서 정상군의 26.70 $\pm$ 0.75 g에 비해 유의하게 증가하여 비만이 유도되었다(p<0.001). 대황 투여군은 35.53 $\pm$ 0.86 g로 대조군에 비해 체중증가가 유의하게 억제되었다(p<0.001)(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Body Weight of Each Experimental Group.

	Normal	Control	Rheum
Body weight (g)	26.70 $\pm$ 0.75	41.79 $\pm$ 0.51*	35.53 $\pm$ 0.86#

\* Significantly different from normal group (\* p<0.001)

# Significantly different from control group (# p<0.001)

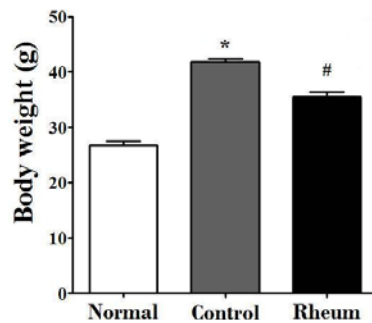


Fig. 1. Body weight (g) of each experimental group.

\* Significantly different from normal group (\* p<0.001)

# Significantly different from control group (# p<0.001)

2. 경구 당부하 검사에 미치는 영향

공복 시 혈당은 대조군(111.83 $\pm$ 2.44 mg/dl)이 정상군(77.13 $\pm$ 5.04 mg/dl)보다 유의성 있게 높았고(p<0.001), 대황군(101.80 $\pm$ 3.02 mg/dl)은 대조군에 비해 유의하게 낮았다(p<0.05). 30분 후 혈당은 대조군(379.67 $\pm$ 35.66 mg/dl)이 정상군(227.88 $\pm$ 18.19 mg/dl)

보다 유의성 있게 높았지만( $p<0.001$ ), 대황군은  $287.80 \pm 13.14$  mg/dl로 대조군에 비해 낮긴 하였지만 유의하지는 않았다. 60분 후 혈당은 대조군( $406.50 \pm 25.58$  mg/dl)이 정상군( $196.88 \pm 6.29$  mg/dl)에 비하여 유의성 있게 높았고( $p<0.001$ ), 대황군( $234.40 \pm 10.68$  mg/dl)은 대조군보다 유의성 있게 낮았다( $p<0.001$ ). 90분 후 혈당은 대조군( $362.83 \pm 40.65$  mg/dl)이 정상군( $159.63$

$\pm 6.12$  mg/dl)보다 유의성 있게 높았고( $p<0.001$ ), 대황군( $174.00 \pm 23.23$  mg/dl)은 대조군에 비해 유의하게 낮았다( $p<0.01$ ). 120분 후 혈당은 대조군( $299.17 \pm 41.84$  mg/dl)이 정상군( $128.38 \pm 6.23$  mg/dl)보다 유의성 있게 높았고( $p<0.001$ ), 대황군( $153.20 \pm 15.37$  mg/dl)은 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다( $p<0.05$ )(Table 3, Fig. 2).

Table 3. Oral Glucose Tolerance Test of Each Experimental Group.

	Normal	Control	Rheum
OGTT (mg/dl)			
0 min	$77.13 \pm 5.04$	$111.83 \pm 2.44^{***}$	$101.80 \pm 3.02^{\#}$
30 min	$227.88 \pm 18.19$	$379.67 \pm 35.66^{***}$	$287.80 \pm 13.14$
60 min	$196.88 \pm 6.29$	$406.50 \pm 25.58^{***}$	$234.40 \pm 10.68^{###}$
90 min	$159.63 \pm 6.12$	$362.83 \pm 40.65^{***}$	$174.00 \pm 23.23^{\#}$
120 min	$128.38 \pm 6.23$	$299.17 \pm 41.84^{***}$	$153.20 \pm 15.37^{\#}$

\* Significantly different from normal group (\*\*\*)  $p<0.001$

# Significantly different from control group (#  $p<0.05$ , ##  $p<0.01$ , ###  $p<0.001$ )

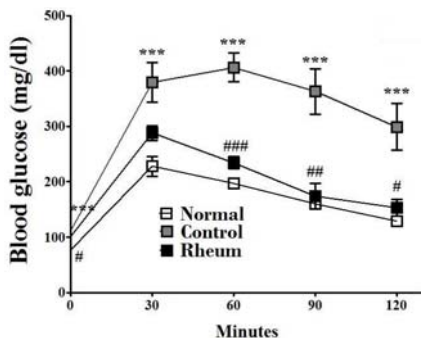


Fig. 2. Oral glucose tolerance test of each experimental group.

\* Significantly different from normal group (\*\*\*)  $p<0.001$

# Significantly different from control group (#  $p<0.05$ ,

##  $p<0.01$ , ###  $p<0.001$ )

### 3. 공복 시 혈당 및 혈중 인슐린농도, 인슐린 저항성에 미치는 영향

대조군의 공복혈당은  $115.33 \pm 4.28$  mg/dl로 정상군의 공복혈당  $64.88 \pm 1.64$  mg/dl에 비해 유의하게 상승하였다( $p<0.001$ ). 대황 투여군의 공복혈당은  $87.40 \pm 7.00$  mg/dl로 대조군에 비해 공복혈당 상승이 유의하게 억제되었다( $p<0.01$ )(Table 4, Fig. 3).

대조군의 혈중 인슐린 농도는  $1.49 \pm 0.14$   $\mu$ g/dl로 정상군의  $0.80 \pm 0.11$   $\mu$ g/dl에 비해 유의하게 상승하였다( $p<0.001$ ). 대황 투여군의 혈중 인슐린 농도는  $1.09 \pm 0.17$   $\mu$ g/dl로 대조군에 비하여 약간 하락하였으나 유의한 차이는 없었다(Table 4, Fig. 4).

대조군의 HOMA-IR은  $12.35 \pm 1.31$ 로 정상군의  $3.67 \pm 0.50$ 에 비해 유의하게 상승하였다( $p<0.001$ ). 대황 투여군의 HOMA-IR은  $7.02 \pm 1.42$ 로 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다( $p<0.05$ )(Table 4, Fig. 5).

Table 4. Fasting Blood Glucose (FBG), Fasting Blood Insulin and Glucose (FBI) and HOMA-IR Level of Each Experimental Group.

	Normal	Control	Rheum
FBG (mg/dl)	64.88±1.6	115.33±4.28***	87.40±7.00 <sup>#</sup>
FBI (µg/dl)	0.80±0.11	1.49±0.14***	1.09±0.17
HOMA-IR	3.67±0.50	12.35±1.31***	7.02±1.42 <sup>#</sup>

\* Significantly different from normal group (\*\*\*) p<0.001

<sup>#</sup> Significantly different from control group (# p<0.05, <sup>##</sup> p<0.01)

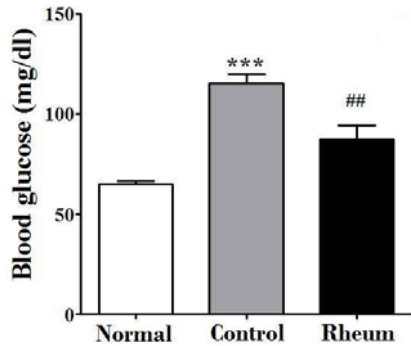


Fig. 3. Fasting blood glucose of each experimental group.

\* Significantly different from normal group (\*\*\*) p<0.001

<sup>#</sup> Significantly different from control group (# p<0.01)

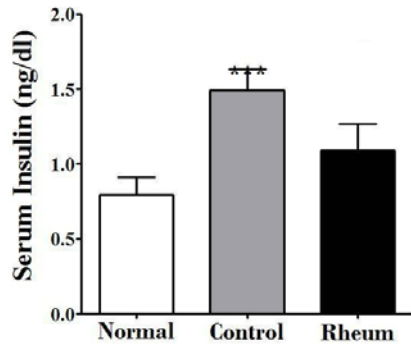


Fig. 4. Serum insulin of each experimental group.

\* Significantly different from normal group (\*\*\*) p<0.001

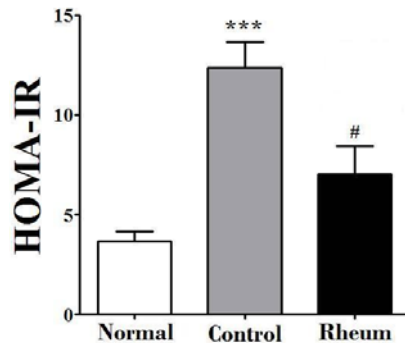


Fig. 5. HOMA-IR of each experimental group.

\* Significantly different from normal group (\*\*\*) p<0.001

<sup>#</sup> Significantly different from control group (# p<0.05)

4. 부고환 지방조직의 무게 및 간의 무게에 미치는 영향

부고환 지방조직의 무게는 대조군(2.14±0.22 g)이 정상군(0.64±0.06 g)에 비해 유의하게 증가하였고(p<0.001), 대항 투여군에서는 1.56±0.04 g으로 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다(p<0.05). 간의 무게는 정상군(0.99±0.03 g), 대조군(1.26±0.19 g), 대항 투여군(1.10±0.03 g) 사이에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Table 5, Fig. 6).

Table 5. The Change of Epididymal Fat Pad, Liver Weight.

	Normal	Control	Rheum
epididymal fat pad (g)	0.64±0.06	2.14±0.22***	1.56±0.04 <sup>#</sup>
liver (g)	0.99±0.03	1.26±0.19	1.10±0.03

\* Significantly different from normal group (\*\*\*) p<0.001

<sup>#</sup> Significantly different from control group (# p<0.05)

大黃이 고지방식으로 비만이 유발된 C57BL/6 mouse의 지방조직 염증 및 인슐린 저항성에 미치는 영향

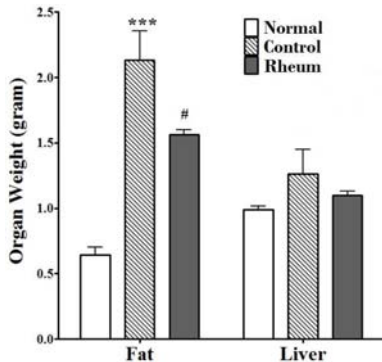


Fig. 6. The epididymal fat pad and liver weight of

each experimental group.

\* Significantly different from normal group (\*\*\*)  $p < 0.001$

# Significantly different from control group (#)  $p < 0.05$

#### 5. 지방세포의 macrophage 발현에 미치는 영향

Adipose tissue macrophage(ATM)의 비율은 정상군( $29.09 \pm 1.90$ )에 비해 대조군( $66.44 \pm 3.44$ )에서 유의하게 증가하였고( $p < 0.001$ ), 대황 투여군( $48.46 \pm 2.60$ )은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ )(Table 6, Fig. 7).

Table 6. The Ratio of Adipose Tissue Macrophage /CD45+ Cells in Each Experimental Group.

	Normal	Control	Rheum
ATM /CD45+ cells (%)	$29.09 \pm 1.90$	$66.44 \pm 3.44^{***}$	$48.46 \pm 2.60^{##}$

\* Significantly different from normal group (\*\*\*)  $p < 0.001$

# Significantly different from control group (##)  $p < 0.01$

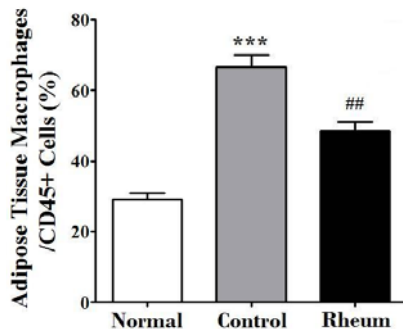


Fig. 7. The percentage of adipose tissue macrophage (ATM) in each experimental group.

\* Significantly different from normal group (\*\*\*)  $p < 0.001$

# Significantly different from control group (##)  $p < 0.01$

#### 6. 지방세포의 TNF- $\alpha$ , IL-10, CD68 유전자 발현에 미치는 영향

TNF- $\alpha$ 는 정상군을 1로 산정하였을 때 대조군( $5.39 \pm 0.83$ )에서 유의하게 증가하였고( $p < 0.001$ ), 대황 투여군( $1.06 \pm 0.06$ )에서는 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ )(Fig. 8).

IL-10은 정상군을 1로 산정하였을 때 대조군은  $0.39 \pm 0.15$ 로 유의하게 감소하였고( $p < 0.001$ ), 대황 투여군( $1.53 \pm 0.65$ )은 오히려 증가하는 경향을 보였지만 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 8).

CD68은 정상군을 1로 산정하였을 때 대조군은  $15.36 \pm 1.71$ 로 유의하게 증가하였으나( $p < 0.001$ ), 대황 투여군에서는  $9.51 \pm 1.01$ 로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ )(Table 7, Fig. 8).

Table 7. The Gene Expression of Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  and Interleukin (IL)-10 and CD68 of Epididymal Adipocyte in Each Experimental Group.

	Normal	Control	Rheum
TNF- $\alpha$	$1.03 \pm 0.04$	$5.39 \pm 0.83^{***}$	$1.07 \pm 0.06^{##}$
IL-10	$0.98 \pm 0.01$	$0.39 \pm 0.15^{***}$	$1.53 \pm 0.65$
CD68	$1.03 \pm 0.01$	$15.36 \pm 1.71^{***}$	$9.51 \pm 1.01^{\#}$

\* Significantly different from normal group (\*\*\*)  $p < 0.001$

# Significantly different from control group (#)  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$



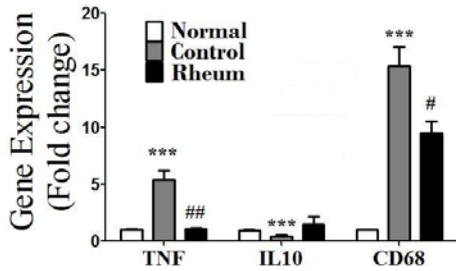


Fig. 8. The gene expression of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and Interleukin (IL)-10 and CD68 of epididymal adipocyte in each experimental group.

\* Significantly different from normal group (\*\*\*)  $p < 0.001$   
 # Significantly different from control group (#)  $p < 0.05$ ,  
 ##  $p < 0.01$

#### IV. 고찰

비만은 당뇨병, 동맥경화의 주요 위험인자이며 인슐린 저항성, 고혈압, 지질대사 이상의 집합체로 최근에는 대사증후군의 일종으로 정의하고 있다. 또한 비만 환자에서는 여러 가지 암 발생률이 증가하고, 비만에 의한 여러 질환은 동맥경화에 의한 심혈관계 질환의 발생으로 사망률을 높이는 공통적인 결과를 가지고 있다<sup>11</sup>. 2011년 국민건강통계에 따르면 우리나라의 비만(BMI  $\geq 25$ ) 유병률은 1998년 26.0%에서 2005년 31.3%로 증가한 이후 5년간 31% 수준을 유지 중이고, 최근에 비만은 높은 유병률과 위험성을 계기로 사회적인 문제로 인식되며 비만인 사람의 최근 1년간 체중감소 시도율이 60.3%에 달할 정도로 그에 대한 관리 노력 또한 높은 실정이다<sup>12</sup>.

비만은 한의학에서 肥, 肥胖, 肥人, 肉人, 肥貴人 등으로 표현되었다. 그 원인에 대해서는 《黃帝內經·素問》<sup>13</sup>에 ‘數食甘味’ ‘膏粱之疾’이라 하고, 《黃帝內經·靈樞》<sup>13</sup>에 ‘貪於取與’라고 쓰여 있으며, 朱<sup>14</sup>는 ‘氣虛生寒 寒生濕’, 劉<sup>15</sup>는 ‘血實氣虛’, 張<sup>16</sup>은 ‘多氣虛之證 然肥人多濕多滯’, 陳<sup>17</sup>은 ‘多痰乃 氣虛’, 李<sup>18</sup>는 ‘氣結而肺盛 肺金克肝木 故痰盛’, 傅<sup>19</sup>은 ‘痰

涎甚多 乃脾土之內病也’라 하였으니, 이것을 종합해 보면 비만의 주된 원인은 氣虛, 濕, 痰이다.

비만의 한의학적 치료는 桔梗<sup>20</sup>, 桑葉<sup>21</sup>, 神麩<sup>22</sup>, 丹蔘<sup>23</sup> 등 단미제와 搜風順氣丸<sup>24</sup>, 夜關清血湯<sup>25</sup>, 減肥湯<sup>26</sup>, 調胃升清湯<sup>27</sup> 등 처방을 활용한 연구가 이루어지고 있으며, 기타 복합처방과 약침액을 활용한 연구도 활발히 진행 중이다<sup>28-30</sup>. 그 중에서 대황은 전 등<sup>10</sup>, 박 등<sup>31</sup>에 의해 IL-6, TNF- $\alpha$  등의 생산을 억제하여 염증반응을 제어하는 효과가 있음이 밝혀져 비만치료에 효과를 기대해 볼 수 있으나, 비만에 관해서는 약침액으로 활용한 류 등<sup>30</sup>의 연구만 있었을 뿐 단미제로 경구 투여한 연구는 없었다.

이에 저자는 대황 추출물의 투여가 고지방식이로 비만이 유발된 동물모델의 지방조직의 염증 및 인슐린 저항성에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보고자 하였다.

체중 감량은 인슐린 저항성을 개선하는 adiponectin과 IL-10의 상승을 초래하고, triglyceride, total cholesterol 및 혈압을 개선하며, 사망률을 감소시키고, 염증 표지자들을 감소 혹은 정상화시킨다<sup>32</sup>. 12주간의 고지방식이를 통해 대조군의 체중은 정상군에 비해 유의하게 증가되었으며, 이에 반해 대황 투여군은 체중 증가가 유의하게 억제되었다.

OGTT에서 대조군은 0, 30, 60, 90, 120분에서 정상군에 비해 모두 유의하게 혈당이 상승하여 내당능의 이상이 발생하였다. 대황 투여군은 식후 30분을 제외한 모든 항목에서 대조군에 비해 유의한 혈당 감소 효과를 보였고, 식후 30분에서도 비록 통계학적 유의성은 없었으나 감소하는 경향이 나타났다. 이는 대황이 비만으로 유발된 제 2형 당뇨병의 혈당관리에도 유효함을 보여준다.

많은 비만환자는 체중에서의 인슐린 분비가 증가되어 있다. 인슐린이 부족하면 혈당이 올라가 당뇨병이 되지만 한편으로는 식욕을 증가시키고, 식사량을 많게 하며, 간과 지방조직에서의 지방합성을 증가시키고, 또한 혈액 중의 지방이 지방조직을

로 흡수되는 것을 활발하게 해준다. 또, 저장된 지방조직의 분해를 억제하여 강력한 지방축적을 나타내므로 인슐린의 분비과잉은 비만의 원인이 될 수 있다.<sup>1,33</sup> 인슐린 저항을 동반한 고인슐린혈증은 다른 어떤 내분비 기전의 이상보다 중심성, 내장성 비만에 지대한 영향을 미친다.<sup>33</sup> 본 연구에서 대조군의 공복 시 혈중 인슐린 농도는 정상군에 비해 유의하게 증가하였고 공복 시 혈당도 유의하게 증가하였다. 이를 토대로 인슐린 저항성에 대한 항상성 모델인 HOMA-IR<sup>34</sup>을 측정된 결과 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였다. 대황 투여군에서는 공복 시 혈당 및 인슐린 농도와 HOMA-IR 모두 감소하였으나 공복 시 인슐린 농도의 변화는 유의성이 없었다. 이는 대황의 투여가 제 2형 당뇨병의 주요한 병인인 인슐린 저항성<sup>35</sup>을 억제시키는 효과가 있음을 보여준다.

반면 부고환 지방조직의 무게는 대황 투여군에서 유의한 감소를 보였다. 부고환 지방조직은 포도당과 글리코젠을 합성하고, 인슐린에 민감하게 반응하며, 여러 가지 adipokine을 분비하기 때문에 백색지방조직의 변화를 평가하기에 좋은 지표이다.<sup>36</sup>

간은 비만이 유발되면 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 같은 염증 유발 cytokine의 mRNA가 증가한다.<sup>37</sup> 또한 지방 또는 콜레스테롤 섭취에 의해 지질대사의 이상이 발생하면 지질의 침착에 의해 간의 무게가 증가한다.<sup>2</sup> 본 연구에서 간의 무게는 정상군과 대조군, 대황 투여군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

최근 비만 쥐 모델에서 대식세포(macrophage)에 특이적이고 풍부한 a disintegrin and metalloproteinase (ADAM)8, macrophage inflammatory protein(MIP)-1 $\alpha$ , monocyte chemoattractant protein(MCP)-1, Mac-1, F4/80 and CD68 등의 유전자가 지방세포 내에 증가되어 있다는 보고가 있었다. 또한 이러한 유전자들은 지방세포 중에서도 대식세포가 포함되어 있는 vascular stromal fraction에 많이 발현되어 있다.<sup>2</sup> 비만으로 인해 비대해진 지방세포와 stromal vascular

cell에서는 TNF- $\alpha$ , leptin, MCP-1와 같은 chemokine이 분비된다. 이러한 전염증 물질들로 인해 지방조직 주위에 macrophage를 비롯한 면역세포들이 모이게 되고, 이 macrophage는 지방조직에 침윤된다. 이러한 macrophage를 adipose tissue macrophage(ATM)라고 명명하였다.<sup>5,32,38</sup> 대식세포가 활성화되고 지방조직에 침윤되면 대식세포로 매개된 염증반응이 지방세포에서 인슐린 저항성을 유발한다. 이러한 인슐린 저항성은 분비된 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, MCP-1 등의 수많은 cytokine 및 chemokine으로 인해 발생한다.<sup>2</sup> 인슐린 저항성을 평가하기 위한 방법으로 ATM 중 CD45, CD11b, F4/80과 반응한 macrophage를 측정하여 그 percentage를 분석하였다. Weisberg 등<sup>5</sup>은 연구에서 F4/80(+)인 대식세포가 체질량지수 및 지방세포의 크기와 강한 상관관계가 있음을 밝혔다. 또한 Li 등<sup>39</sup>의 연구에서는 쥐의 부고환 지방조직을 F4/80과 CD11b 항체로 염색하였을 때, 식이로 비만이 유발된 쥐에서 모두 양성으로 나타나는 macrophage의 비율이 증가한다는 것을 밝혔다. 본 연구에서 대황 투여군의 ATM 비율이 대조군에 비해 유의하게 감소하여 대황이 지방세포의 크기감소 및 지방량 감소에 효과가 있고, 지방조직의 macrophage를 감소시켜 인슐린 저항성을 개선시킬 수 있음을 보여준다.

많은 연구에서 TNF- $\alpha$ 는 인슐린 신호전달을 방해하는 것으로 알려져 있으며<sup>40</sup>, 비만한 사람의 피하지방에서 TNF- $\alpha$ , mRNA의 발현이 증가되어 있어, TNF- $\alpha$ 가 비만과 관련된 인슐린 저항성과 관계가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>41</sup> 본 연구에서 대황 투여군은 대조군에 비해 TNF- $\alpha$ 의 발현이 유의하게 감소하였다.

IL-10은 T-cell, CD5<sup>+</sup> B-cell 및 단핵구 등에 생산되고 T 및 B-cell 등에 대한 다양한 활성을 나타내며<sup>42</sup>, stellate cell을 통하여 macrophage의 활성을 억제하여 TNF- $\alpha$ 의 생산을 억제하는 인자를 합성하는 것으로 밝혀졌다.<sup>43</sup> 본 연구에서 대황 투여군은 대조군에 비해 IL-10 유전자 발현을 약간 증가

시켜 TNF- $\alpha$ 의 생산을 억제하는 효과를 기대할 수 있으나 통계학적 유의성은 없었다.

Macrophage의 표지자인 CD68은 F4/80과 유사하게 체질량지수 및 지방세포의 크기와 강한 상관 관계를 보인다<sup>5</sup>. 특히 Pietiläinen 등<sup>44</sup>의 연구에서 지방세포와 분리되어 macrophage에 특이적인 표지자로 TNF- $\alpha$ 의 발현과 CD68의 발현은 밀접한 상관 관계가 증명되었다. 본 연구에서도 대황 투여군에서 대조군에 비해 유의한 CD68발현 억제 반응을 볼 수 있었고 이는 TNF- $\alpha$ 에서의 결과와 일치한다.

이상의 실험결과를 종합해 볼 때 대황은 체중 및 혈당 조절에 효과적이고, 인슐린 저항성을 억제 시키며, 지방조직의 염증반응을 억제하는데 유효하였다. 이는 추후 대황이 비만의 효과적인 치료제로 활용될 수 있는 가능성을 보여준다. 다만 본 연구에서 기존의 인슐린 저항성 개선제제를 양성대조군으로 설정하여 그 효과를 비교하지 못한 것은 추후 연구를 통해 보완해야할 점이다.

## V. 결론

大黃이 고지방식으로 유발된 비만 mouse의 지방조직의 염증 및 인슐린 저항성에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행한 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 大黃은 대조군에 비하여 체중 증가를 유의하게 억제하였다.
2. 大黃은 대조군에 비하여 공복시 혈당 및 경구 당부하 혈당을 유의하게 감소시켰다.
3. 大黃은 대조군에 비하여 HOMA-IR을 감소시켜 인슐린 저항성을 유의하게 개선하였다.
4. 大黃은 대조군에 비하여 부고환 지방조직의 무게 증가를 유의하게 억제하였다.
5. 大黃은 대조군에 비하여 ATM 비율을 유의하게 감소시켰다.
6. 大黃은 대조군에 비하여 지방세포의 TNF- $\alpha$ ,

CD68 유전자 발현을 유의하게 감소시켰다.

## 참고문헌

1. 대한비만학회. 임상 비만학. 서울: 고려의학; 2000, p. 115, 149.
2. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesityrelated insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112(12):1821-30.
3. Flier JS. The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway?. *Cell* 1995;80:15-8.
4. Serrero G, Lepak N. Endocrine and paracrine negative regulators of adipose differentiation. *Int J Obes* 1996;20(Suppl 3):S58-S64.
5. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 2003;112(12):1796-808.
6. Zeyda M, Stulnig T. Obesity, inflammation, and insulin resistance—a mini-review. *Gerontology* 2009; 55(4):379-86.
7. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1(IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 2002; 277(52):50230-6.
8. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106(2):171-6.
9. 韓醫科大學 本草學 編纂委員會. 本草學. 서울: 永林社; 2004, p. 286.
10. 전동주, 차윤엽, 이은. 대황추출물의 염증반응 제어효과. *한방재활의과학회지* 2011;21(1):35-46.

11. Rajala MW, Scherer PE. Minireview : The adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003;144(9):3765-73.
12. 임채민(보건복지부장관). 2011국민건강통계. 보건복지부 건강정책과; 2012, p. 52.
13. 이재성, 이성현. 한방치료의 체지방 및 복부비만감소효과. *대한한방비만학회지* 2001;(1)1:33-42.
14. 馬原臺, 張隱庵. 黃帝內經素問靈樞解析. 서울: 성보사; 1975. 素問, p. 224. 靈樞, p. 272-3.
15. 朱震亨. 新編 丹溪心法附餘. 서울: 대성문화사; 1993, p. 60-1.
16. 劉河間. 劉河間傷寒三六書. 서울: 성보사; 1976, p. 43.
17. 張介賓. 張氏類經. 서울: 성보사; 1982, p. 586.
18. 李仲梓. 醫宗必讀. 上海: 綜合出版社; 1976, p. 10.
19. 傅青主. 傅青主男女科. 서울: 대성문화사; 1984, p. 106.
20. 권오준, 이승욱, 백선호, 한수련, 안영민, 안세영, 등. 길경 투여가 고지방, 고탄수화물 식이로 유발된 비만형 제2형 당뇨병 동물모델에 미치는 영향. *대한한의학회지* 2013;34(1):1-14.
21. 이지숙, 노현인, 윤다래, 이서라, 류재환. 상업의 고지방식이 유도 비만 쥐에 대한 조직학적 및 혈청학적 항비만 효과 연구. *대한한방내과학회지* 2012;33(3):306-16.
22. 백선호, 한수련, 안영민, 안세영, 이병철. 신곡 투여가 비만형 제 2형 당뇨병 동물모델의 대사 인자와 지방조직 염증반응에 미치는 영향. *대한한의학회지* 2012;33(3):33-45.
23. 최선욱, 김동훈, 최승범, 박근희, 김용성. 단삼투여가 고지방식으로 유발된 비만형 당뇨병 동물 모델에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2012; 33(4):429-37.
24. 박종설, 이병철, 두호경, 안영민, 안세영. 수풍순기환 투여가 고지방, 고탄수화물 식이로 유발된 비만형 제2형 당뇨병 동물모델에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2009;30(2):257-69.
25. 박상우, 조충식, 김철중. 야관청혈당이 고지방 식이로 유도된 흰쥐의 비만 억제에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2011;32(2):170-87.
26. 임소연. 감비탕을 복용한 비만환자 22례에 대한 임상보고. *동서의학* 2011;36(4):51-7.
27. 오성원, 김병우. 조위승청탕 추출액이 비만유도 쥐의 지질대사, 항산화계 및 염증반응계에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2013;34(1):1-13.
28. 유은주, 서병관, 남상수, 강성길. 고지방 식이로 유도된 비만 생쥐에서 창출약침의 항비만 효과. *대한침구학회지* 2010;27(6):31-42.
29. 한수련, 백선호, 권오준, 안영민, 이병철, 안세영, 산수유, 산약, 지각, 상업으로 구성된 복합처방 투여가 고지방, 고탄수화물 식이로 유발된 비만형 당뇨병 동물모델의 대사인자 및 지방세포 염증반응 조절에 미치는 영향. *대한한의학회지* 2012;33(3):184-99.
30. 류혜선, 김성필, 김승만, 이동근, 이욱재, 이주희, 등. 脾俞(BL<sub>20</sub>) 大黃약침이 고지방식으로 유발된 肥滿白鼠에 미치는 영향. *대한침구의학회지* 2012; 29(3):9-18.
31. 박철환, 정인철, 이상룡. 大黃이 Alzheimer's Disease 病態 모델에 미치는 影響. *동신신경정신과학회지* 2005;16(1):67-80.
32. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999;257:79-83.
33. Bjorntorp P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 1996; 20(4):291-302 .
34. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose

- clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000;23:57-63.
35. Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn C. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 1992;340:925-9.
  36. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature Medicine* 2002;8(7):731-7.
  37. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- and NF-B. *Nature Medicine* 2005;11:183-90.
  38. Oliver E, McGillicuddy F, Phillips C, Toomey S, Roche HM. The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2010;69(2):232-43 .
  39. Li P, Lu M, Nguyen MTA, Bae EJ, Chapman J, Feng D, et al. Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice. *Journal of biological chemistry* 2010;285(20):15333-45.
  40. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994;43:1271-8.
  41. Peraldi P, Spiegelman B. TNF- $\alpha$  and insulin resistance: Summary and future prospects. *Molecular and cellular biochemistry* 1998;182:169-75.
  42. 이귀녕, 권오현. 임상병리과일. 서울: 의학문화사; 2003, p. 720.
  43. Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, et al. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation in vitro. *Hepatology* 1998;28(6):1518-24.
  44. Pietiläinen KH, Kannisto K, Korshennikova E, Rissanen A, Kaprio J, Ehrenborg E, et al. Acquired obesity increases CD68 and tumor necrosis factor- $\alpha$  and decreases adiponectin gene expression in adipose tissue: a study in monozygotic twins. *The journal of clinical endocrinology & metabolism* 2006;91(7):2776-81.