

## Bleomycin으로 유발한 폐약(肺弱) 태음인 동물 모델에서의 비만에 대한 영향 평가

김윤하\* · 박정환\* · 곽진영\* · 박정미† · 안택원\*

\*대전대학교 한의과대학 사상체질의학교실, †대전대학교 한의과대학

### Abstract

#### A Study of the Effect on Obesity in Taeumin Animal-experimental Model Induced Lung Fibrosis with Bleomycin

Yoonha Kim\*, Junghwan Park\*, Jinyoung Kwak\*, Jungmi Park†, Taek won Ahn\*

\*Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

†College of Oriental Medicine, Daejeon University

#### Objectives

The objective of this study is to develop a taeumin animal-experimental model induced lung fibrosis with Bleomycin and evaluate the effect on obesity in this animal-experimental model.

#### Methods

The subjects were divided into 3 groups : normal group, high fat diet(HFD) control group, and HFD group administered with bleomycin(n=10 per group). To develop taeumin animal-experimental model with reduced respiratory metabolism, 8-week-old C57BL/6 mice were administered with 0.03ml solution of bleomycin 1U/ml dissolved in distilled water, intratracheal(IT), once. Then, the HFD control group and the experimental group were fed with high fat diet for 6 weeks. Airway hyperresponsiveness(AHR) to methacholine was measured at the 1st and 3rd week after bleomycin was administered. Food intake and body weight were measured at regular time weekly. After the final experiment, blood was gathered by cardiac puncture for bloodchemical examination and organs(liver, fatty tissue) were removed, weighted, and mRNA was analyzed.

#### Results and Conclusions

Through the experiment, it was found that Bleomycin induced Taeumin animal-experimental models have leptin resistance. In the experimental group administered with Bleomycin, fatty acid synthesizing gene expression increased and energy metabolizing gene expression decreased. As mRNA expression of adiponectin decreased, it was found that Taeuim animal-experimental model is susceptible to metabolic syndrome and cardiovascular diseases.

*Key Words*: Taeumin, Obesity, Leptin, Adiponectin, Bleomycin, Animal-experimental model

Received April 17, 2016 Revised May 12, 2016 Accepted June 22, 2016

Corresponding Author Taek-Won Ahn

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, Cheonan Oriental Hospital of Daejeon University  
Doojeong-dong 621, Seobuk-gu, Cheonan city, Chungcheongnamdo, 331-958, Korea  
Tel: +82-41-521-7535 Fax: +82-41-521-7007 E-mail: twahn@dju.kr

© The Society of Sasang Constitutional 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/>)

## I. 緒論

사상체질의학은 조선후기 동무 이제마가 창안한 것으로, 사람의 체질을 體形氣像, 容貌詞氣, 性質材幹, 病證藥理를 기준으로 나눠 질병의 예방과 치료, 양생을 달리하는 의학이다. 이제마는 肺와 肝은 氣液을 呼吸하는 門戶로, 脾와 腎은 水穀을 出納하는 府庫라고 하였다. 태양인·태음인은 肺肝의 大小와 관련된 氣液之氣의 관계로, 소양인·소음인은 脾腎의 大小와 관련된 水穀之氣의 관계로 설명하였다<sup>2</sup>.

사상체질의학에서의 肺는 四象 중 事의 속성으로서 肺氣는 直而伸하고 氣液을 呼散하는 기능을 주관하는 장기이며, 胃脘에서 氣液을 呼할 때 肺가 그것을 衛한다고 하였다. 頭腦의 髓海는 肺의 근본이 되는데 肺는 事務之哀力を 가지고 髓海의 精汁을 吸得하여 肺元을 자양케 하고 안으로는 津海를 擁護하여 그 氣를 鼓動시키고 津을 생성시킨다. 또 肺는 心善學하여 正直中和한 津이 充하게 된다. 만일 偏倚過不及하게 되면 津이 燦한다. 哀性이 遠散하면 氣主肺하여 肺가 더욱 盛하나, 樂情이 促急하면 氣激肺하여 肺가 더욱 衰한다 하였다<sup>3</sup>. 이러한 肺는 呼散之氣의 주체가 되고, 胃脘은 肺의 통제 하에 氣液을 上達而呼散하는 기능을 수행한다. 반면, 肺와 함께 氣液을 관장하는 기관인 肝은 吸聚之氣의 주체가 되며, 小腸은 肝의 통제 하에 氣液을 中執而吸聚하는 기능을 수행한다.

사상체질 중 太陰人は 肝大肺小한 臟局 특징을 가진 체질로, 肺局은 太陰人의 偏小之臟으로 本元에 해당이 되고, 肺局의 呼散之氣는 太陰人의 保命之主가 된다. 태음인 병증분류에 관한 연구에 의하면 太陰人 表裏病證 중 表病證은 胃脘寒을, 裏病證은 肝熱을 그 기본병리로 하여 결국에는 모두 偏小之臟의 本元인 肺局의 呼散之氣 손상 病證으로 귀결되며, 이를 넓은 의미에서 '肺燥證'이라 할 수 있다고 하였다<sup>4</sup>.

人稟 臟理가 肝大肺小하여 呼散之氣가 부족하고 吸聚之氣가 강한 태음인은 쉽게 비만해지는

경향을 보이는데, 이와 관련하여 태음인과 비만의 상관성에 대한 연구들이 많이 이뤄지고 있다<sup>5,8</sup>.

한의학 표준 확립 및 보험적용 확대를 위해서는 한방 의약품의 임상시험 수행과 품목허가를 위한 연구들이 활발히 행해져야 한다. 사상체질별 病證이나 藥理 메커니즘을 연구하기 위해서 비임상시험이 진행되어야 하나, 현재까지 각 체질별 동물 모형이 개발되지 않았다. 이에 체질별 동물 모형 개발을 위한 연구를 진행하게 되었고, 그 시작으로 폐약 태음인 동물 모형을 개발하게 되었다. 그리고 폐약 태음인 동물 모델을 대상으로 태음인에게 가장 취약한 질환인 비만에 대한 영향을 평가해보기로 하였다.

## II. 研究 方法

### 1. 재료

#### 1) 동물

수컷 C57bl/6 생쥐를 대한바이오링크(Korea)로부터 수입하여 사용하였다. 분양 받은 실험동물을 2주간 기본사료(AIN-76A diet)와 물을 자유롭게 공급하면서 실험실 환경에 적응시킨 후, 건강상태가 양호한 8주령의 생쥐를 사용하였다. 동물 사육실의 환경은 항온(25±2°C), 항습(50±5%) 및 12시간 간격의 광주기(light on 07:00~19:00)로 명암으로 조절되는 SPF 환경에서 유지 실험에 사용하였다. 실험동물은 10마리씩 정상대조군(ND), 비만대조군(고지방식이군, HFD), 실험군(Bleomycin+HFD)으로 분리하여 사육하였으며, 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)의 승인을 받았다.

#### 2) 폐섬유화유발 약물

기관지내 투여(intratracheal instillation, IT) 방법으

로 Bleomycin 1U/ml를 증류수 0.03ml에 녹인 용액을 폐 속에 주입하였다. 항암제로 흔히 쓰이는 bleomycin은 폐손상 및 폐섬유화의 부작용을 일으키며 이를 이용하여 실험동물에서 급성 폐손상과 폐섬유화의 모델로 널리 사용하고 있다<sup>9</sup>.

## 2. 방법

### 1) 폐섬유화 유발 방법

C57BL/6J계 생쥐에게 티오펜탈소듐(thiopental sodium) 0.08ml를 복강 내 주사하여 마취시킨 상태에서, 전경부의 피부를 절개하고 근육을 정리하여 기관을 노출시킨 다음 안과용 수술가위로 기관을 조금 절개하였다. 앞을 등글게 만든 30gauge 주사 바늘을 장착한 0.5ml 인슐린 주사기를 사용하여 Bleomycin 1U/ml를 녹인 증류수 용액 0.03ml를 절개된 기관을 통하여 직접 폐 속으로 단번에 주입하였다. 주입 직후 곧 바로 절개한 전경부의 피부를 봉합 하고 일반 사육 케이지에 담아 사육하였다.

### 2) 메타콜린 기관지 유발 검사

C57bl/6 마우스에 Bleomycin을 IT로 단회 투여하고, 1·3주 후에 동물폐용적측정기(one chamber plethysmography, All medius, Seoul)를 이용하여 기도 저항의 지표인 Penh 등을 포함한 다양한 호흡지표들의 변화를 측정하였다. 메타콜린 기관지 유발검사는 3분간 연무기를 통해 메타콜린 농도를 6.25, 12.5, 25, 50mg/mL의 농도로 점차 증가시켜 흡입시킨 후 폐용적측정기에 3분 동안 기록하되 Penh를 평균하여 측정하였다<sup>10</sup>.

### 2) 동물 시험군 분류

C57bl/6 마우스를 2주간 기본사료(AIN-76A diet)로 적응시킨 후 10주령부터 Diet Induced Obesity Diet Formulas(D12451 & D12492) Bleomycin 투여 후 대조군과 시험군에게 고지방식이(HFD) 섭취를 6주간 진행하였다.

정상군과 고지방식이(HFD)군을 비교하여 정상 장부 상태의 쥐에게 고지방식이 미치는 영향을 알아보았으며, HFD 식이군과 Bleomycin+HFD 투여군을 비교하여 정상 폐기능 동물군과 Bleomycin에 의한 폐약 태음인 동물 모델에서의 비만에 대한 영향 차이를 알아보았다.

- (1) 정상 C57bl/6j 생쥐(수컷8주령24g 생쥐) : 정상군 (n=10)
- (2) HFD 식이군: 대조군 (n=10)
- (3) Bleomycin+HFD 투여군: 시험군 (n=10)

### 3) 체중 및 식이효율 측정

체중 및 식이섭취량은 매주 일정한 시간에 측정하여 기록하였다.

#### (1) 체중 (body weight)

- ① 체중변화 : 매주 수요일 9시에 측정, 기록
- ② 총 체중 증가량 : Final body wt - initial body wt
- ③ 1일 평균 체중 증가량 = Total body wt gain/days

#### (2) 식이섭취량(food intake) : 1일 평균 식이 섭취량 Total food intake/days

#### (3) 식이효율 (food efficiency ratio, FER) : FER = [Total weight gain/Total food intake] × 100

### 4) 혈액생화학 검사

최종 실험 종료 후 희생 전 3시간 동안 절식시킨 후 심장천자법으로 채혈하여 혈액생화학적 검사를 실시하기 위하여 채혈 후 30분 이내에 3,000rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하여 혈장(plasma)을 분리하여 -70℃에 보관하였다가 분석하였다. 각 실험동물로부터 분리한 혈장(plasma)에서 간 기능의 지표인 ALT 및 AST를, 신장기능 지표인 BUN, creatinine을, 혈장 및 간의 지질함량의 지표인 총콜레스테롤, HDL(High-density lipoprotein)-cholesterol, LDL(Low-density lipoprotein)-cholesterol, 중성지방(triglyceride), 그리고 혈

중 Leptin, Insulin, Adiponectin, 혈당의 함량을 생화학 자동 분석기(Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다.

### 5) 부검 및 장기조직검사

각 실험동물의 장기조직(간, 지방조직)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 칭량하였다. 적출한 간과 지방조직들의 유전자 발현 양상을 알아보기 위해 간과 지방조직에서 RNA를 추출한 뒤 One-step SYBR Green PCR kit(AB science)를 사용하여 cDNA 및 real-time PCR 분석을 하였다.

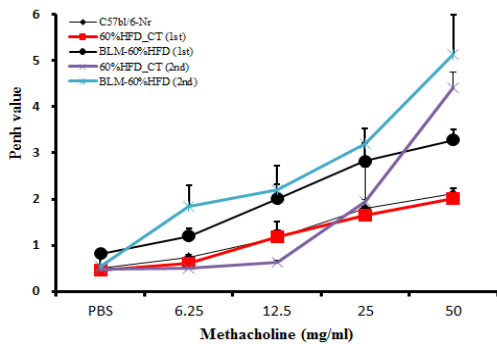
### 3. 통계분석

각 실험군 결과 값은 unpaired student's T-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, p<0.05 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

## III. 結果

### 1. 메타콜린에 대한 기도과민성

메타콜린에 대한 기도과민성은 Bleomycin을 IT로



C57bl/6-Nr: C57bl/6J normal group  
 60% HFD\_CT(1st): High Fat Diet-Negative Control after 1 week  
 60% HFD\_CT(2nd): High Fat Diet-Negative Control after 3 week  
 BLM-60% HFD(1st): High Fat Diet-Bleomycin injection after 1 week  
 BLM-60% HFD(2nd): High Fat Diet-Bleomycin injection after 3 week

Figure 1. Penh value change

단회 투여하고 1·3주 후에 측정하였다. 대조군에 비해 Bleomycin을 투여한 실험군에서 기도과민성이 증가한 것으로 보아, 급성 폐손상과 폐섬유화가 일어났을 것이라고 간접적으로 확인할 수 있었다 (Figure 1).

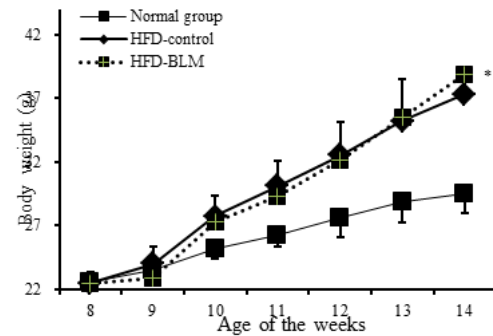
## 2. 체중, 식이효율 비교

### 1) 체중 비교

최종 14주에서 비만대조군은 정상군에 비하여 평균적으로 10g의 체중이 증가하였다. 실험군에서는 비만대조군에 비하여 큰 차이는 볼 수 없었지만, 14주부터 실험군이 비만대조군에 비해 1.4 g의 체중 증가량 차이를 보였다(Figure 2). 하지만 체중의 뚜렷한 차이를 보여주는 결과가 없어 14주 이후 추가적으로 실험 기간을 늘려야 할 것으로 사료된다.

### 2) 식이효율 비교

식이효율 (feeding efficiency ratio: FER%) = 체중증가량(g) / 사료섭취량(g) × 100의 공식에서 의미하는 바와 같이 사료를 섭취하는 양이 많음에도 불구하고 체중의 증가가 적다는 것은 비만조절효과가 있는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 식이효율은 비만 가능성을 나타내는 하나의 척도로 사용할 수 있고, 식이효율



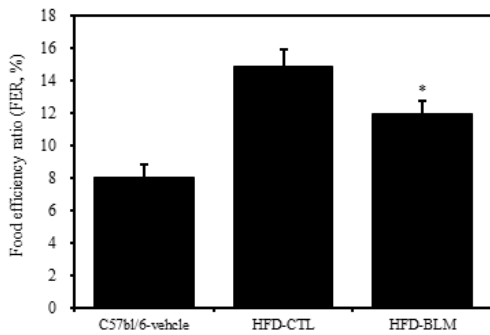
Normal: C57bl/6J normal group  
 HFD-control: High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM: High Fat Diet-Bleomycin injection

Figure 2. Body weight change

Table 1. The Effect of BLM on Food Intake, Body Weight Gain, Food Efficiency Ratio and Tissue Weights in HFD-fed Obese Mice

	Normal	HFD-CTL	HFD-BLM
Food intake (g/day)	2.06	2.48	3
Body weight gain (g/day)	0.17±0.015	0.37±0.026	0.37±0.024
Food efficacy ratio (FER, %)	8.06±0.74	14.85±1.064	11.92±0.797
Subcutaneous fat (g)	0.224±0.025	1.188±0.084	1.259±0.169
Epididymal adipose tissue (g)	0.374±0.043	1.957±0.134	1.870±0.202
Visceral fat (g)	0.144±0.040	0.586±0.087	0.651±0.096
Kidney fat (g)	0.100±0.013	0.764±0.052	0.802±0.097
Liver weight (g)	1.142±0.049	1.175±0.064	1.260±0.081
Lung weight(g)	0.183±0.009	0.228±0.031	0.320±0.051

\* BLM: bleomycin, CTL: control, HFD: high fat diet.



Normal : C57bl/6J normal group  
 HFD-control : High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection

Figure 3. Food efficiency ratio (FER, %)

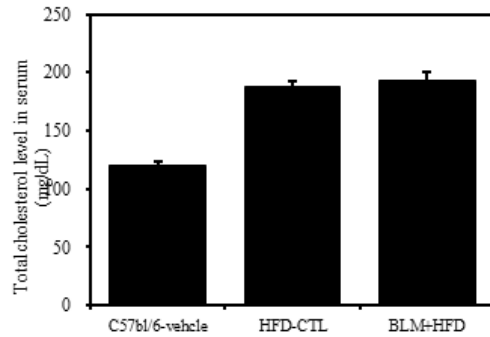
의 수치가 적을수록 비만 조절 효과가 있다고 할 수 있다. 이번 연구 결과에서 비만대조군의 식이효율이 14.8%이었으며, 이에 비하여 실험군에서는 비만대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 식이효율이 감소된 추이를 보였다(Table 1, Figure 3).

이러한 결과는 Bleomycin으로 유도된 폐약 태음인 동물 모델에서 식이섭취량 대비 체중 증가 정도가 다소 억제되었음을 알 수 있었다.

### 3. 혈액생화학 검사

#### 1) 혈청 내 총콜레스테롤

비만대조군의 혈청 내 총콜레스테롤(total cholesterol-



Normal : C57bl/6J normal group  
 HFD-control : High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection

Figure 4. Total cholesterol level in serum

ol) 수준은 정상대조군의 혈청내 총콜레스테롤(total cholesterol)에 비하여 약 36.0% 이상 증가를 나타내었다. 하지만 실험군에서는 비만대조군과 차이를 보이지 않았다(Table 2, Figure 4).

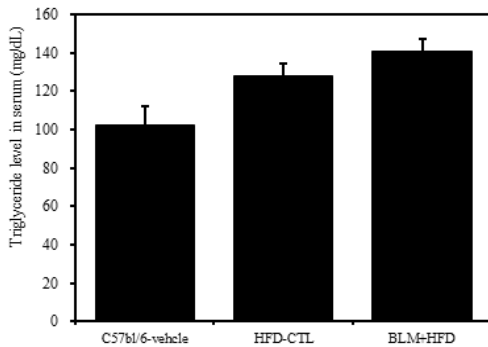
#### 2) 혈청 내 중성지방

비만대조군의 혈청 내 중성지방(triglyceride) 수준은 정상대조군의 혈청 내 중성지방에 비하여 약 20.4% 이상 증가를 나타내었다. 그리고 실험군에서는 비만대조군에 비하여 8.6%이상 증가를 보였다(Table 2, Figure 5).

Table 2. The Effect of BLM on Blood Biochemistry Prameters in HFD-fed Obese Mice

	Normal	HFD-CTL	HFD-BLM
Total-cholesterol, mg/dL	120.0±3.0	187.3±4.8	193.2±6.7
Triacylglycerol, mg/dL	102.2±10.1	128.0±6.4	140.6±6.5
Triacylglycerol, mg/dL (liver)	2.0±0.1	5.5±1.5	10.0±1.0
HDL-cholesterol, mg/dL	71.5±1.1	85.3±1.2	85.7±1.8
LDL-cholesterol, mg/dL	503.6±92.8	634.4±183.9	1066.7±412.7
Glucose, mg/dL	150.0±10.3	233.4±5.9	242.8±7.3
AST, U/L	102.0±17.7	103.2±14.3	138.7±33.2
ALT, U/L	27.4±2.4	40.6±4.0	52.6±4.9
ALP, U/L	79.6±1.8	60.1±4.5	65.2±3.0
IGF-1, pg/ml	6519.7±495.0	7732.5±325.0	8465.9±519.0
Leptin, pg/ml	587.7±86.0	38256.0±3072.0	41300.0±3312.0
Eotaxin2, µg/ml (lung)	0.84±0.192	1.25±0.370	0.86±0.351
IL-4, µg/ml (lung)	0.78±0.112	2.17±1.250	0.89±0.411
IL-5, µg/ml (lung)	1.14±0.394	1.05±0.142	2.20±0.604
IL-6, µg/ml (lung)	2.29±0.238	2.21±1.259	4.19±2.523
MUC5AC, µg/ml (lung)	1.72±0.437	1.18±0.296	3.44±0.979
TARC, µg/ml (lung)	1.07±0.352	1.25±0.375	1.82±0.289
TNF-α, µg/ml (lung)	1.41±0.180	1.34±0.442	3.23±0.842
IL-13, µg/ml (lung)	1.42±0.323	1.57±0.678	0.79±0.209
Eotaxin2, µg/ml (skin)	11.44±0.702	0.89±0.343	0.43±0.118
IL-13, µg/ml (skin)	1.00±0.520	6.53±5.508	6.29±4.028
IL-31R, µg/ml (skin)	0.74±0.164	1.37±0.484	2.16±0.485
IL-6, µg/ml (skin)	1.47±0.715	2.23±1.052	3.54±2.236
TNF-α, µg/ml (skin)	0.79±0.298	1.54±0.948	2.52±1.295
TGF-b, µg/ml (skin)	2.80±1.024	11.21±7.401	19.93±10.831

\* BLM: bleomycin, CTL: control, HFD: high fat diet, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase, IGF: insulinlike growth factor, IL: interleukin, MUC5AC: Mucin 5AC; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; TNF, tumor necrosis factor; TGF, transforming growth factor

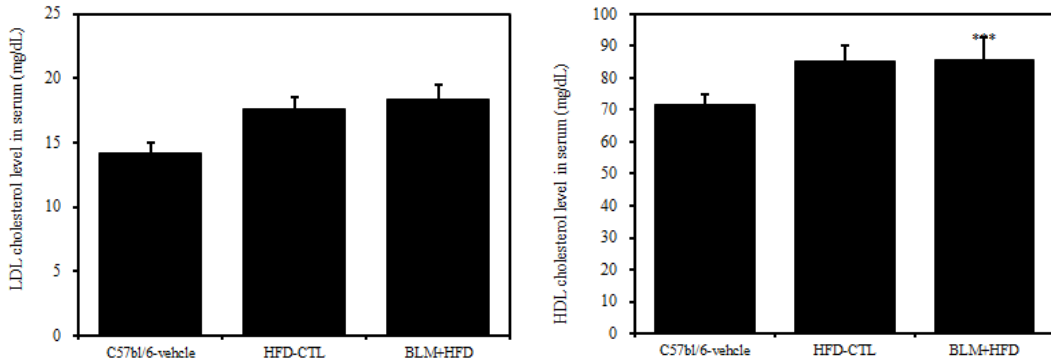


Normal : C57bl/6j normal group  
 HFD-control : High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection

Figure 5. Triglyceride level in serum

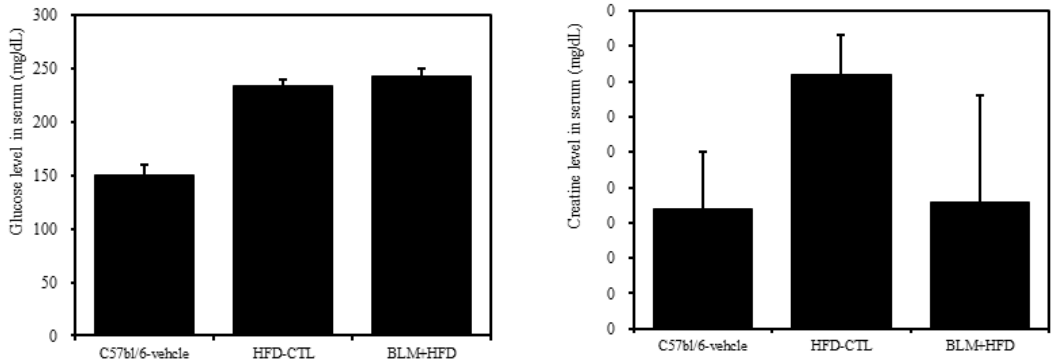
### 3) 혈청 내 고밀도 콜레스테롤 및 저밀도 콜레스테롤

비만대조군의 혈청 내 고밀도 콜레스테롤(HDL-cholesterol) 수준은 정상대조군의 혈청 내 고밀도 콜레스테롤(HDL-cholesterol)과 비교하여 약 16.2% 이상 증가를 나타내었고, 실험군에서 비만대조군에 비하여 큰 차이를 보이지 않았다(Table 2, Figure 6). 혈청 내 저밀도 콜레스테롤(LDL-cholesterol)의 수준을 나타내는 그 래프로, 비만대조군의 혈청 내 저밀도 콜레스테롤(LDL-cholesterol) 수준은 정상대조군의 혈청 내 저밀도 콜레스테롤(LDL-cholesterol)에 비하여 약 20.7% 이상



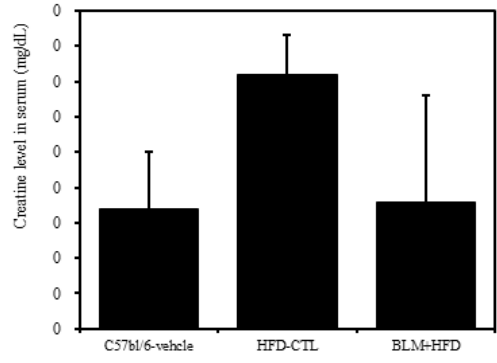
Normal : C57bl/6J normal group  
 HFD-control : High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection

Figure 6. HDL & LDL cholesterol level in serum



Normal : C57bl/6J normal group  
 HFD-control : High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection

Figure 7. Glucose level in serum



Normal : C57bl/6J normal group  
 HFD-control : High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection

Figure 8. Creatine level in serum

증가를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 차이가 없었고 이는 통계학적으로 유의성을 띄었다 ( $p < 0.001$ ). 따라서 Bleomycin으로 유도된 폐섬유화 모델 생쥐는 고지방식이에 따른 차이를 볼 수 없었다.

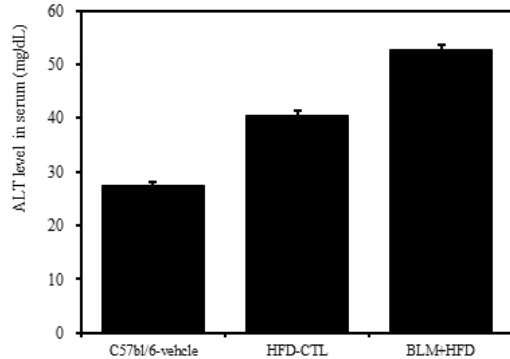
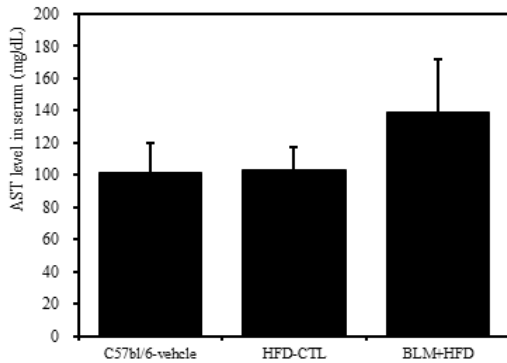
#### 4) 혈청 내 혈당

비만대조군의 혈청 내 혈당(Glucose) 수준은 정상대조군의 혈청 내 혈당에 비하여 약 29.3%이상 증가를 나타내었다. 실험군에서는 비만대조군과 차이를 보이

지 않았다(Table 2, Figure 7).

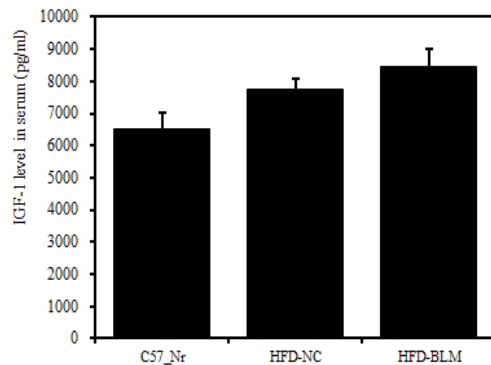
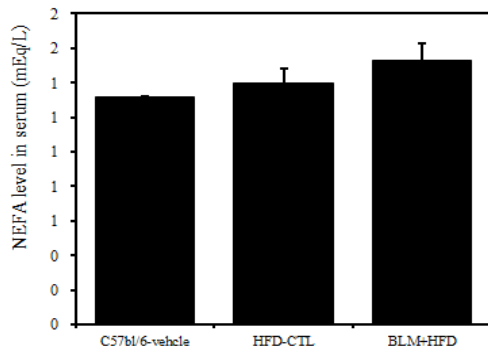
#### 5) 혈청 내 크레아틴

비만대조군의 혈청 내 크레아틴(creatin) 수준은 정상대조군에 비하여 증가를 나타내었다. 하지만 실험군의 혈청 내 크레아틴은 정상대조군 수준으로 관찰되었다(Table 2, Figure 8). 따라서 실험군은 정상대조군과 큰 차이가 없어 신장독성은 나타나지 않았다고 생각된다.



Normal : C57bl/6J normal group  
 HFD-control : High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection  
 \* AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase

Figure 9. AST & ALT level in serum



Normal : C57bl/6J normal group  
 HFD-control : High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection  
 \* NEFA: non-esterified fatty acid

Normal : C57bl/6J normal group  
 HFD-control : High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection  
 \* IGF: insulinlike growth factor

Figure 10. NEFA level in serum

Figure 11. IGF-1 level in serum

### 6) 혈청 내 AST 및 ALT

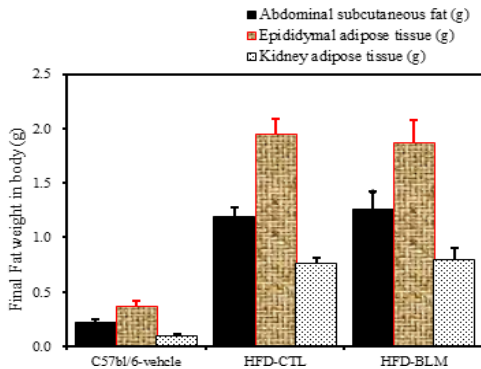
비만대조군의 혈청 내 AST 수준은 정상대조군의 혈청 내 AST와 차이가 없었고, 실험군에서 비만대조군에 비하여 약 25.4% 이상 증가를 나타내었다. 또한 비만대조군의 혈청 내 ALT 수준은 정상대조군에 비하여 약 32.5% 이상 증가를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 약 23.0% 이상 증가를 나타내었다 (Table 2, Figure 9).

### 7) 혈청 내 NEFA

비만대조군의 혈청 내 NEFA 수준은 정상대조군의 혈청 내 NEFA에 비하여 약 7.2% 이상 증가를 나타내었다, 실험군에서 비만대조군에 비하여 약 6.7% 이상 증가를 나타내었다 (Table 2, Figure 10).

### 8) 혈청 내 IGF-1

비만대조군의 혈청 내 IGF-1 수준은 정상대조군의



Normal : C57bl/6J normal group  
 HFD-control : High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection

Figure 12. Fat weight in body

혈청 내 IGF-1에 비하여 약 15.7% 이상 증가를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 약 8.7% 이상 증가를 나타내었다(Table 2, Figure 11).

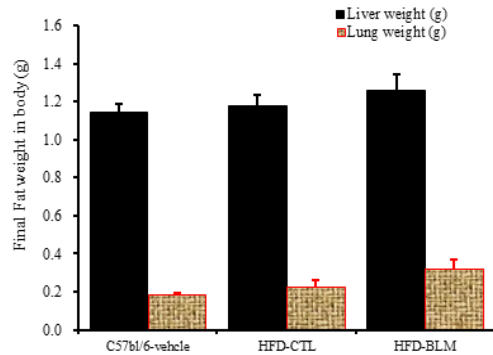
## 4. 장기조직 검사

### 1) 피하 및 복부 지방량 분석

비만대조군의 총피하지방량(total abdominal subcutaneous fat)은 정상대조군의 총피하지방량(total abdominal subcutaneous fat)에 비하여 4.5배 이상 증가를 하였다. 반면 실험군에서 비만대조군에 비하여 차이를 보이지 않았다(Table 1, Figure 12).

### 2) 간 폐무게 분석

비만대조군의 간무게(liver weight)은 정상대조군의 간무게(liver weight)에 비하여 약 2.9% 이상 증가를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군의 간무게에 비하여 약 6.8% 이상 증가를 나타내었다. 또한 비만대조군의 폐무게(Lung weight)는 정상대조군의 폐무게(Lung weight)에 비하여 약 19.8% 이상 증가를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군의 간무게에 비하여 약 28.8% 이상 증가를 나타내었다(Table 1, Figure 13).

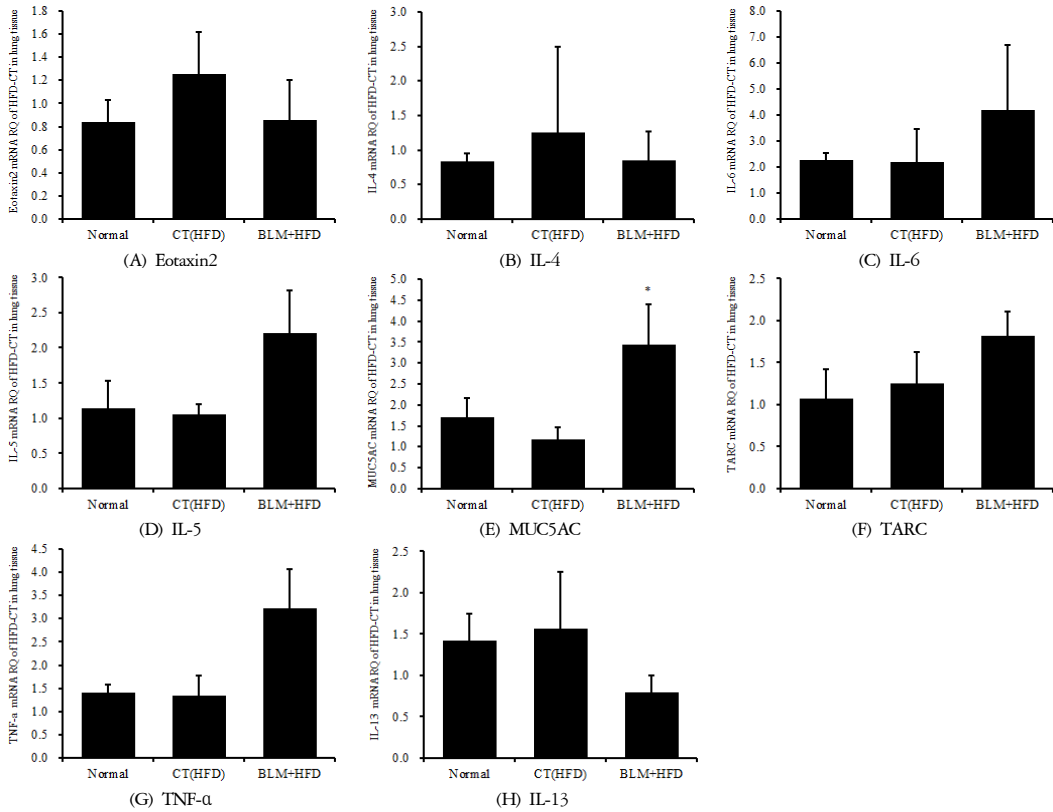


Normal : C57bl/6J normal group  
 HFD-control : High Fat Diet-Negative Control  
 HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection

Figure 13. Liver and Lung weight in body

## 3) 폐 조직의 mRNA 분석

적출한 폐에서 real-time PCR 증폭법을 사용하여 천식과 면역조절에 관련 있는 유전자 발현 양상을 확인해보았다. 폐섬유화와 비만이 연관성이 있는지, 그리고 폐기능과 면역 저하에 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. 호산구가 활성화되는 과정에서 T helper(Th)세포에서 분비하는 cytokine 이 중요한 역할을 한다. Th세포는 cytokine 분비양상에 따라 Th1세포와 Th2 세포로 나누어지는데 Th1세포에서는 IL-2, IFN- $\gamma$ 를 분비하고 Th2세포는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13을 분비한다. IL-4는 순환 호산구를 내피세포로 유착시키는 작용이 있고, IL-5는 chemokine의 작용에 의해서 염증 목표 조직으로의 유도를 이끄는 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 기관지천식에 있어 호산구가 이동하고 활성화하는데 Th2 cytokine이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 호산구 분비 chemokine인 eotaxin은 천식 환자 기관지 점막에 발현이 증가된다는 보고가 있다<sup>11-13</sup>. 실험결과 폐조직에서의 Eotaxin2와 IL-4, IL-13의 발현은 비만대조군에서 정상대조군에 비하여 증가를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 감소를 나타내었다. 또한 폐조직에서의 IL-6와 IL-5, MUC5AC, TARC, TNF- $\alpha$ 의 발현은 비만대조군에서 정상대조군에 비하여 큰 차이를 보이



The mRNA expression of (A) Eotaxin2, (B) IL-4, (C) IL-6, (D) IL-5, (E) MUC5AC, (F) TARC, (G) TNF-α, (H) IL-13 were measured with RT-PCR analysis.

Normal : C57bl/6j normal group

HFD-control : High Fat Diet-Negative Control

HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection

\* BLM: bleomycin, mRNA: messenger ribonucleic acid, IL: interleukin, MUC5AC: Mucin 5AC, TARC: thymus and activation-regulated chemokine, TNF: tumor necrosis factor, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

Figure 14. Effects of BLM on the mRNA expression levels in lung tissue

지 않았다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 증가를 나타내었다(Figure 14).

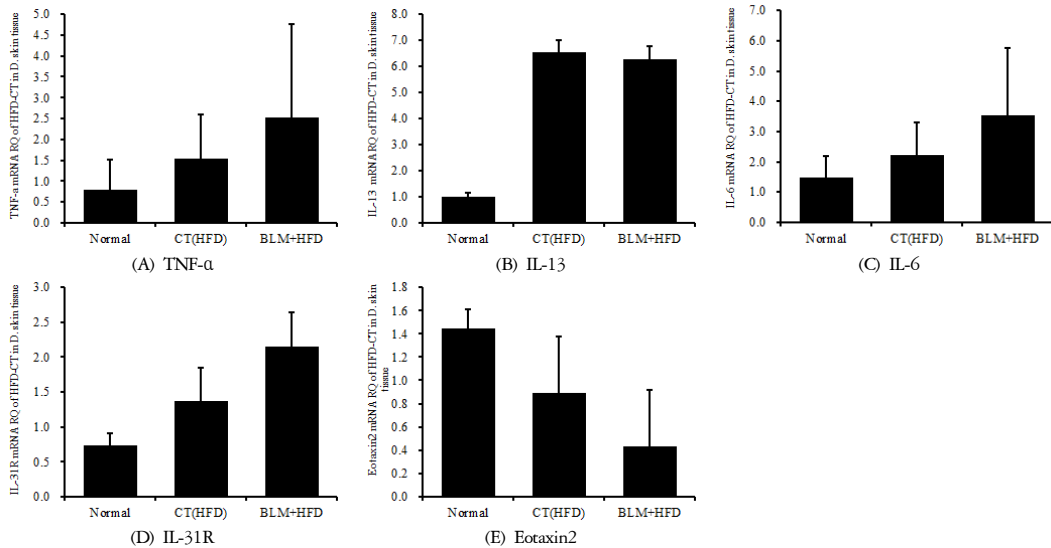
#### 4) 피부 조직의 mRNA 분석

적출한 피부에서 real-time PCR 증폭법을 사용하여 친식과 면역조절에 관련 있는 유전자 발현 양상을 확인해보았다. 실험결과 피부조직에서의 TNF-α와 IL-6, IL-31R의 발현은 비만대조군에서 정상대조군에 비하여 증가를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 증가를 나타내었다. 또한 피부조직에서의 IL-13

의 발현은 비만대조군에서 정상대조군에 비하여 큰 증가를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 차이를 보이지 않았다(Figure 15). 오히려 eotaxin2의 발현은 비만대조군에서 정상대조군에 비하여 감소를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 감소를 나타내었다(Figure 15).

#### 5) 간 조직의 mRNA 분석

적출한 간에서 real-time PCR 증폭법을 사용하여 비만과 에너지 소비에 관련 있는 유전자 발현 양상을 확인하여 폐섬유화와 비만이 연관성이 있는지, 그리



The mRNA expression of (A) TNF-α, (B) IL-13, (C) IL-6, (D) IL-31R, (E) Eotaxin2 were measured with RT-PCR analysis.

Normal : C57bl/6J normal group

HFD-control : High Fat Diet-Negative Control

HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection

\* BLM: bleomycin; mRNA, messenger ribonucleic acid; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction

Figure 15. Effects of BLM on the mRNA expression levels in skin tissue

고 폐기능의 저하가 비만에 어떤 영향을 미치는지 알아보자 하였다.

실험결과 간조직에서의 지방산 합성관련 유전자인 SREBP-1c, FAS, aP2의 유전자 발현은 비만대조군에서 정상대조군에 비하여 증가를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 증가를 나타내었다.

또한 간조직에서의 에너지 소비(thermogenesis activity)와 관련된 단백질들(PPARγ, AMPK-α1, AMPK-α2, UCP2)의 유전자 발현은 비만대조군에서 정상대조군에 비하여 비슷하거나 약간 감소하는 경향성을 보였다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 감소를 나타내었다(Figure 16). 하지만 오히려 PPAR-γ의 발현은 실험군에서 비만대조군에 비하여 증가를 나타내었다.

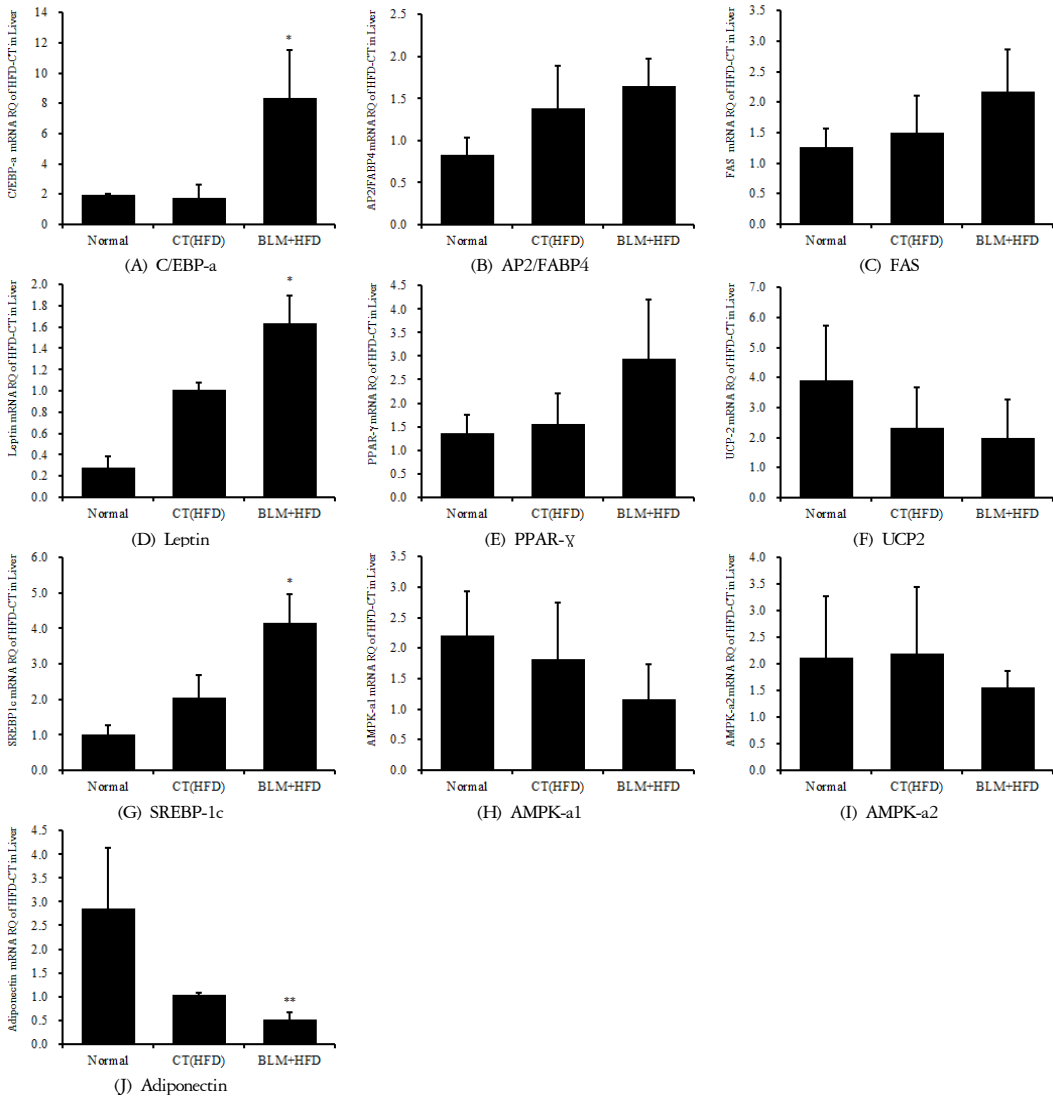
또한 비만과 대사증후군에 핵심적 역할을 하는 렙틴(leptin)과 아디포넥틴(adiponectin) 중 렙틴 유전자 발현은 비만대조군에서 정상대조군에 비하여 증가를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 증가를 나타내었다. 반면 아디포넥틴 유전자 발현은 비만대

조군에서 정상대조군에 비하여 감소를 나타내었다. 실험군에서 비만대조군에 비하여 감소를 나타내었다. 따라서 렙틴과 아디포넥틴 사이에 유의한 역 상관관계를 나타내었다(Figure 16).

#### IV. 考察

체질 동물모델 개발에 있어서 가장 큰 문제점은 인간의 사상체질분류의 기원과 같이性情에 따른 장부편차를 구현할 수가 없다는 것이다. 이에 본 연구에서는 실험이 힘든性情보다는 장부 자체에 치우친 체질모델을 가정하고 실험을 하게되었다.

태음인 병증분류에 관한 연구<sup>4</sup>에서 언급되었듯 결국에는 表裏病 모두 偏小之臟의 本元인 肺局의 呼散之氣 손상 病證으로 귀결된다고 하여, 太陰人 동물모델의 특징으로 太陰人의 偏小之臟인 肺小의 동물모델을 개발하게 되었다. 이에 肺小의 의미에



The mRNA expression of (A) C/EBP-a, (B) AP2/FABP4, (C) FAS, (D) Leptin, (E) PPAR-gamma, (F) UCP2, (G) SREBP-1c, (H) AMPK-a1, (I) AMPK-a2, (J) Adiponectin were measured with RT-PCR analysis.

Normal : C57bl/6j normal group

HFD-control : High Fat Diet-Negative Control

HFD-BLM : High Fat Diet-Bleomycin injection

\* BLM, bleomycin

Figure 16. Effects of BLM on the mRNA expression levels in Liver tissue

대한 고찰이 필요하였다.

太陰人の偏小之臟인 肺小의 의미와 관련하여 사상체질과 폐기능 간의 연관성 연구들이 있었는데, 이<sup>14</sup>는 BMI 정상군(18.5≤BMI<23)에서 태음인의 경우

FVC%pred와 FEV1%pred가 다른 체질에 비해 낮은 것을 확인하였다. 또 다른 연구로 박<sup>15</sup>은 다른체질에 비해 태음인이 FVC%pred가 유의하게 낮은 것을 확인하였다. 또한 태음인과 소양인에서 소음인보다 폐기능

장애의 위험도가 높았는데, 소양인은 FVC만 유의하게 관계가 있었고 태음인은 FVC와 FEV1에서 모두 유의하게 관계가 있었다고 하여 폐기능장애의 양상이 다른 체질에 비해 태음인에서 보다 뚜렷하게 나타나고 있음을 알 수 있다고 하였다. 또한 같은 연구에서 대사증후군의 구성요소 중 이상지질혈증군이 폐기능장애(FVC, FEV1)와 모두 유의한 관계가 있었고, 복부 비만군과 공복혈당상승군은 각각 FEV1, FVC의 폐기능장애와 관계가 있었다고 하여 태음인이 폐기능 저하로 인해 비만 및 대사증후군 질환에 취약할 수 있음을 증명하였다. 이에 太陰人의 肺小가 폐기능 저하와 유의한 관계가 있는 것으로 판단하여 Bleomycin을 이용하여 인위적으로 폐기능 저하를 유발한 쥐 모델을 폐약 태음인 동물 모델로 개발하게 되었다.

렙틴(leptin)은 지방세포에서 분비되는 아디포카인(adipokine) 중 하나로, 뇌의 시상하부에 작용하여 음식 섭취를 억제하고 교감신경을 활성화하여 에너지 소비를 촉진시킨다<sup>14,15</sup>. 최근 연구에서 렙틴이 염증 전 매개물로 작용하며<sup>16</sup>, 만성 폐쇄성 폐질환, 천식, 알레르기성 비염, 비용종 등의 염증성 호흡기 질환에서 혈청 내 렙틴 수치가 증가한다고 하였다<sup>16-19</sup>. 또한 렙틴이 폐포 대식세포의 수용체에 결합하여 Phospholipase D1(PLD1)을 활성화시켜 TNF- $\alpha$ 의 발현을 증가시키는 결과를 얻어, 비만과 호흡기 질환과의 연관성을 밝혀냈다<sup>20</sup>.

본 연구에서 비만대조군에 비해 실험군의 식이효율이 유의하게 낮았으나, 오히려 실험군의 체중이 대조군에 비해 유의하게 높은 양상을 보였다. 이는 실험군의 일일 평균 섭취량이 비만대조군에 비해 20% 이상 많았기 때문인데, 이러한 결과는 식이 섭취를 억제하는 기능을 하는 렙틴의 mRNA 발현이 비만대조군에 비해 실험군에서 유의하게 증가된 결과와 상반된 내용이다.

렙틴이 b형 렙틴수용체(LRb)와 결합하면서 식욕 억제 신경펩티드인 proopiomelanocortin(POMC)의 발현은 증가하고, 식욕 증진 신경펩티드인 Neuropeptide Y(NPY)의 발현은 억제된다. 한편, 렙틴과 LRb의 결합

은 suppressor of cytokine signaling-3(SOCS3)와 protein tyrosine phosphatase 1B(PTP1B)를 증가시켜 LRb로부터의 과도한 신호를 억제하는 역할을 한다. SOCS3와 PTP1B의 증가는 렙틴 과다로 유도되는 렙틴 저항성의 기전이 된다<sup>21</sup>. 실험군에서 렙틴 mRNA의 발현이 증가되었음에도 불구하고 일일 평균 섭취량이 많았던 것은 렙틴 저항성 때문인 것으로 사료된다.

렙틴 저항성과 관련된 과거 선행 연구로 렙틴 저항성과 관련하여 쥐나 비만인에게 고지방 식이를 공급했을 때 근육조직의 렙틴 저항성이 증가하였다는 결과를 보여준 연구가 있었다<sup>22,23</sup>. 최근의 연구를 통해 렙틴 저항성의 원인이 시상하부의 염증이나 소포체 스트레스에 있다고 알려졌는데, 고지방식이와 같은 과도한 영양섭취, TNF- $\alpha$ , IL-6와 같은 염증성 사이토카인이 염증과 소포체 스트레스의 원인으로 인식되었다<sup>24,25</sup>. 본 연구에서도 비록 유의성은 없었으나, 정상군이나 비만대조군에 비해 실험군에서 폐조직과 피부조직에서 TNF- $\alpha$ , IL-6 등의 사이토카인이 증가하는 경향성을 확인할 수 있었다. 실험군에서의 렙틴 저항성 여부를 확인하기 위하여 POCM, NPY의 발현 여부, SOCS3와 PTP1B 등을 추가적으로 조사해볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

아디포넥틴(adiponectin)은 지방조직에서 가장 많이 분비되는 아디포카인으로, 지방·당 대사, 인슐린 감수성 등을 조절한다<sup>26</sup>. 또한 선행 연구들을 통해 인슐린 저항성과 관련하여 아디포넥틴의 낮은 농도가 대사증후군 및 심혈관계 질환 발생의 독립적인 인자임이 밝혀졌다<sup>27,28</sup>. 아디포넥틴의 분비량은 카테콜아민, 글루코코르티코이드, TNF- $\alpha$ , IL-6, 성장호르몬, 치아졸리딘디온(thiazolidinediones), 안드로겐 등의 생물학적 지표들과 대사 스트레스 등에 의해 조절된다<sup>29</sup>. 본 연구에서 실험군의 간조직 내 아디포넥틴 mRNA의 발현이 비만대조군에 비해 유의하게 저하되어 Bleomycin으로 유도한 폐약 태음인 동물 모델이 대사증후군과 심혈관계 질환에 대해 취약함을 확인할 수 있었다.

SREBPs는 인슐린의 역할을 매개하여 지방산 생합

성에 중요한 효소인 acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 fatty acid synthase (FAS) 유전자의 발현을 활성화 시키는 중요한 전사인자이다<sup>30</sup>. SREBP는 1a, 1c, 2의 세 가지 종류로 나뉘는데, SREBP-1a와 SREBP-1c는 지방산과 중성지방의 합성에 관여하고, SREBP-2는 콜레스테롤의 대사 및 합성을 조절한다고 알려져 있다<sup>31</sup>. 이번 연구에서 SREBP-1c를 제외한 다른 결과에서 비록 유의성은 없었지만, 다른 대조군들에 비해 실험군에서의 AST, ALT가 증가하였고, 지방산 합성관련 유전자인 SREBP-1c, FAS, aP2의 활성이 증가하는 경향성을 보였다. 또한 혈청과 간조직 내 중성지방이 다른 대조군들에 비해 증가된 결과를 얻었다. 이를 통해 실험군에서 지방간 병변을 의심할 수 있었다.

성정의 편급과 선천적인 장부대소로 인해 체질의 구분 및 소증과 병증의 차이가 발생하기 때문에 후천적으로 혹은 인위적으로 장기 기능의 불균형을 유발하는 것이 특정 체질의 대표 동물모델이라고 이르기에는 무리가 있다. 하지만 향후 체질별 취약 질환에 대한 연구나 체질 약물에 대한 연구를 위하여 체질 동물 모델의 개발이 꼭 필요하며, 이에 본 연구는 인위적인 장부 기능의 저하를 유도한 새로운 관점으로 체질 동물 모델의 개발을 시도하였다는 것에 의의가 있다.

## V. 結論

Bleomycin으로 유발한 폐약 태음인 동물 모델의 비만에 대한 영향에 대하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. Bleomycin을 IT로 단회 투여한 1·3주 후, 실험군의 기도과민성이 증가하여 급성 폐손상 및 폐섬유화를 간접적으로 확인하였다.
2. 실험군에서 비만대조군에 비해 유의하게 식이 효율이 감소하였으나 식이섭취량이 증가하였다.
3. 실험군과 비만대조군에서 정상군에 비해 혈청 내 총콜레스테롤 및 중성지방, 저밀도 콜레스테롤, 혈

당이 증가하였으나 유의성이 없었다.

4. 실험군과 비만대조군에서 정상군에 비해 고밀도 콜레스테롤이 증가하였다. 실험군과 비만대조군 사이에 차이가 없었고 이는 통계학적으로 유의성이 있었다.

5. 간조직에서의 지방산 합성 관련 유전자인 SREBP-1c, FAS, aP2의 유전자 발현이 실험군, 비만대조군, 정상대조군 순으로 증가하였고, 에너지 대사 관련 유전자인 AMPK- $\alpha$ 1, AMPK- $\alpha$ 2, UCP2의 유전자 발현은 실험군에서 정상군과 비만대조군에 비해 감소하였다. PPAR- $\gamma$ 의 발현은 실험군에서 정상군과 비만대조군에 비해 증가하였다. 지방산 합성 관련 유전자는 발현이 증가하고 에너지 대사 관련 유전자의 발현은 감소하는 경향을 보였으나 SREBP-1c를 제외한 모든 결과에서 유의성이 없었다.

6. leptin 유전자 발현은 실험군, 비만대조군, 정상군 순으로 증가하였고, adiponectin 유전자 발현은 정상군, 비만대조군, 실험군 순으로 증가하여 leptin과 adiponectin 사이에 유의한 역 상관관계를 나타냈다.

이상으로 Bleomycin으로 유발한 폐약 태음인 동물 모델에서 렙틴 저항성의 가능성을 확인하였다. 또한 실험군에서 염증 유발 유전자와 지방산 합성 유전자 발현이 증가하고 에너지 대사 유전자의 발현이 감소하는 경향성을 확인하였다. 아디포넥틴 mRNA의 활성 저하로 Bleomycin으로 유발한 폐약 태음인 동물 모델이 대사증후군과 심혈관계질환에 취약함을 확인하였다.

## VI. Acknowledgement

상기 연구는 미래창조과학부 '체질 특성에 따른 대사성 질환의 치료 약물 및 기기 임상 연구' (과제번호: 2015M3A9B6028311)의 지원을 받아 수행되었음.

## VII. References

1. Lee JM. Dongeiseusebowon. Seoul: Daesungmoonhwsa. 1997;1:5, 4:1,10,29-32. (Korean)
2. Lee JM. Dongeiseusebowon. 2nd rev. Seoul: Yeogang. 2003;36,278. (Korean)
3. Dept. of Sasang Constitutional Medicine. All colleges of Korean med. in Korea(compilation). The revised and enlarged Sasang Constitutional Medicine. Seoul: Jipmoondang. 2012;131. (Korean)
4. Lee JH, Lee EJ, Koh BH. A study on the schematic organization of the sub-classification system of the Taeumin symptomatology. *J Sasang Constitut Med.* 2011;23(1):63-78. (Korean)
5. Moon SH, Sin SH, Kim HJ, Kim JY. A relationship of the obesity and body composition analysis by Sasang constitution. *J Oriental Rehab Med.* 2002;12(4):1-10. (Korean)
6. Kim DR. A study on 4 type constitution and life character of obese patients. *J of Const Med.* 1997;9(1): 303-13. (Korean)
7. Kim DR, Baek TH. Clinical Study on the Relationship of Sasang constitution and Obesity. *J Sasang Constitut Med.* 1996;8(1):319-35. (Korean)
8. Ryu SM, Shin SU, Kim KS, Moon JS, Yoon YS. Analysis of obesity degree and comparison of weight control program among Sasang constitution. *Journal of Korean Oriental Association for Study of Obesity.* 2005;5(1):21-9. (Korean)
9. Adamson IYR, Bowden DH. The pathogenesis of bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol.* 1974;77:185-97.
10. Chandler DB, Hyde DM, Gin SN. Morphometric estimates of infiltrative cellular changes during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am J Pathol.* 1996;112:981-92.
11. Vanhee D, Gosset P, Boitelle A, Wallaert B, Tonnel AB. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Eur Respir J* 1995;8: 834-42.
12. Zhang K, Gharaee Kermani M, McGarry B, Remick D, Phan SH. TNF-alpha-mediated lung cytokine networking and eosinophil recruitment in pulmonary fibrosis. *J Immunol.* 1997;158:954-9.
13. Huaux F, Lardot C, Arras M, Delos M, Many MC, Coutelier JP, et al. Lung fibrosis induced by silica particles in NMRI mice is associated with an upregulation of the p40 subunit of interleukin-12 and Th-2 manifestations. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20: 561-72.
14. Lee SG, Kwak CK, Lee EJ, Koh BH, Song IB. The study on the upgrade of QSCCII(II);the study on the re-validity of QSCCII. *J Sasang Constitut Med.* 2003;15:39-50. (Korean)
15. Pak YS, Kim JS, Lee JH, Lee EJ, Koh BH. Association between Sasang Constitution, Impaired Lung Function and Metabolic Syndrome among Middle-aged Adults in Korea. *J Sasang Constitut Med* 2013;25(3):180-194. (Korean)
16. Muoio DM, Dohm GL. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002;16(4):653-66.
17. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;316: 129-139.
18. Unal M, Eskandari G, Muslu N, Pata YS, Akbas Y. Serum leptin levels in patients with allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;134:331-333.
19. Guler N, Kirerleri E, Ones U, Tamay Z, Salmayenli N, Darendeliler F. Leptin: does it have any role in childhood asthma? *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114: 254-259.
20. Bruno A, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Giammanco S, Gjomarkaj M, et al. Does leptin play

- a cytokine-like role within the airways of COPD patients? *Eur Respir J.* 2005;26:398-405.
21. Guven M, Bulut Y, Aladag I, Yelken K, Erdogan H. Serum leptin levels in patients with nasal polyposis. *J Laryngol Otol.* 2008;122:590-592.
  22. Lee SM, Choi HJ, Oh CH, Oh JW, Han JS. Leptin Increases TNF- $\alpha$  Expression and Production through Phospholipase D1 in Raw 264.7 Cells. *PLoS One.* 2014;9(7):e102373.
  23. Björnholm M, Münzberg H, Leshan RL, Villanueva EC, Bates SH, Louis GW, et al. Mice lacking inhibitory leptin receptor signals are lean with normal endocrine function. *J Clin Invest* 2007;117:1354-60.
  24. Lantz KA, Hart SG, Planey SL, Roitman MF, Ruiz-White IA, Wolfe HR, et al. Inhibition of PTP1B by Trodusquemine (MSI 1436) Causes Fat specific Weight Loss in Diet induced Obese Mice. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:1517-23.
  25. Steinberg GR, Smith AC, van Denderen BJW, Chen Z, Murthy S, Campbell DJ, et al. AMP-activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:4575-4580.
  26. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One.* 2012;7:e30571.
  27. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab.* 2009;9:35-51.
  28. Ziemke F, Mantzoros CS. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr.* 2010;91:258S-61S.
  29. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.* 2001;7(8):947-953.
  30. Matsuzawa Y. Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin. *Proc Jpn Acad* 2010;86:131-140.
  31. Matsuzawa Y. Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atheroscler Suppl.* 2005;6:7-14.
  32. Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Kral JG, et al. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(5):1513-1517.
  33. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997; 89(3):331-340.