

Original Article

## 神麴 투여가 비만형 제 2형 당뇨병 동물모델의 대사인자와 지방조직 염증반응에 미치는 영향

백선호, 한수련, 권오준, 안영민, 안세영, 이병철

경희대학교 한의과대학 신계내과학교실

### The Effects in Metabolism and Adipose Tissue Inflammation Induced by the Massa Medicata Fermentata on Obese Type 2 Diabetes Mouse Model

Sun-Ho Paik, Su-Ryun Han, Oh-Jun Kwon, Young-Min Ahn, Se-Young Ahn, Byung-Cheol Lee

Dept. of Internal medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

**Objectives:** Recent data have revealed that the plasma concentration of inflammatory mediators is increased in the insulin-resistant states of obesity and type 2 diabetes. The purpose of this study was to investigate the antidiabetic and anti-obesity effect of Massa Medicata Fermentata on obese type 2 diabetes mice.

**Methods:** In order to examine the effects of Massa Medicata Fermentata, obese type 2 diabetes mice induced by Surwit's high fat, high sucrose diet. Mice were divided into 4 groups of ND (normal diet), HFD (high fat and high sucrose diet), Met (high fat and high sucrose diet with metformin) and MMF (high fat and high sucrose diet with Massa Medicata Fermentata) and investigated over 8 weeks. Diabetic and obese clinical markers, including body weight, glucose level, lipid level, leptin concentration, epididymal fat pad and liver weights and adipose tissue macrophage (ATM) were determined.

**Results:** Compared with the HFD group, body weight, fructosamine, triglyceride, epididymal fat pad weight and ATM were significantly reduced in the MMF group.

**Conclusions:** From the above results, the intake of Massa Medicata Fermentata may be effective in anti-hyperglycemia and anti-obesity by the attenuation of glucose and lipid levels and also inflammation state. Massa Medicata Fermentata may be beneficial for controlling diabetes mellitus type 2 in humans.

**Key Words** : Massa Medicata Fermentata, type 2 diabetes, insulin resistance, obesity, adipose tissue, inflammation

### 서론

당뇨병은 가장 흔한 내분비 질환으로 인슐린의 상대적 혹은 절대적 결핍 및 인슐린 저항성에 의해 나타나는 일련의 증후군이다<sup>1)</sup>. 제 2형 당뇨병은 인슐린의 분비량이 상대적으로 적거나 근육, 지방세포, 간 등에

서 인슐린의 작용이 저하된 인슐린 저항성과 함께  $\beta$ -cell의 기능부전으로 여러 대사 이상과 합병증을 일으키게 된다<sup>2)</sup>. 현대 생명과학의 발전에도 불구하고 당뇨병은 암 및 순환기계 질환과 더불어 극복되지 않은 3대 질병 중의 하나로 사회적으로도 관심의 대상이 되고 있다<sup>3)</sup>.

· Received : 3 May 2012

· Revised : 20 July 2012

· Accepted : 20 July 2012

· Correspondence to : 이병철(Byung-Cheol Lee)

서울특별시 동대문구 회기동 1 경희의료원 부속한방병원 한방 6내과

Tel : +82-2-958-9158, Fax : +82-2-958-9158, E-mail : hydrolee@korea.com

비만 역시 현대사회의 중요한 건강 문제로 대두되고 있다. 비만과 당뇨병은 인슐린 저항성이라는 연결고리를 갖는데<sup>4)</sup>, 비만은 체내 인슐린 저항성을 악화시켜 포도당 대사의 장애를 유발하여 제 2형 당뇨병 발병의 주된 원인이 되는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>.

당뇨병이 오래 지속되고 적절한 치료가 이루어지지 않으면 심각한 만성 합병증을 야기하게 된다<sup>6)</sup>. 이에 더욱 안전하고 우수한 효능을 지닌 새로운 제약을 개발하기 위한 많은 연구가 진행 중이며, 그 해결책을 동양의학에서 찾기 위한 노력 역시 활발히 이루어지고 있다<sup>7)</sup>.

한편 발효는 체내흡수율과 생체이용율을 높이며, 향산화물질, 항암물질, 면역증강물질 등의 생리활성 물질이 새로이 만들어지거나 증강되어 약리적 기능성을 향상시킬 수 있다<sup>8)</sup>. 이 같은 이유로 최근 발효를 이용하여 한약의 효능을 높이거나 새로운 기전을 찾으려는 연구가 점차 늘어나고 있다<sup>9)</sup>.

神麴(Massa Medicata Fermentata)은 대표적인 발효 한약재로, 여름에 밀가루 또는 밀기울에 赤小豆末, 杏仁泥, 菁蒿汁, 蒼耳子汁, 野薤汁 등의 재료를 반죽하여 누룩같이 만들어 짚이나 마대 또는 삼잎으로 싸 온실에서 발효한 것으로 神麴으로 불리기도 한다<sup>10)</sup>. 健脾和中하며 解表作用의 효능을 지니며, 발효한 약품은 특히 健脾胃, 助消化의 효능이 뛰어나다<sup>11)</sup>. 「東醫寶鑑·湯液編 穀部」에서 神麴은 紅麴과 같으며, 紅麴은 피를 잘 돌게 하고 음식이 소화되게 하며 이질을 멎게 한다고 기술되어 있다<sup>12)</sup>. 紅麴은 일반쌀을 찌서 紅麴균으로 발효시켜 살균 건조시킨 후에 분말 형태로 제조한 원료로, 주된 기능성분인 monacolin-K는 statin 계열 약물의 주성분이다<sup>13)</sup>. Statin 계열 약물은 당뇨병 환자, 공복혈당 및 내당능 장애 환자의 콜레스테롤 개선과 함께 혈중 중성지방을 감소시켜 당대사와 관련된 개선 효과가 보고되고 있으며<sup>14)</sup>, 紅麴 역시 이중 맹검, 무작위배정, 위약 대조 인체시험을 통해 동일한 실험결과가 도출되었다<sup>15)</sup>. 또한 최근 연구에서는 紅麴에서 항비만 효과를 관찰한 바 있다<sup>16)</sup>. 현대의 紅麴과 神麴을 동일하다고 보는 것은 무리가 있으나, 발효한 누룩의 일종이라는 공통점이 있기에 神麴에서도 위와 같은 혈당 개선 효과 및 항염증효과가 기대되는 바이다.

이에 저자는 神麴 단일 약재를 비만형 제2형 당뇨

병 마우스에게 투여하여 체중, 혈중 지질과 혈당 및 염증상태 개선에 대한 효능을 확인하고자 본 연구를 실시하였다.

## 연구 방법

### 1. 검체 제조

경희의료원 약재과에서 구입한 총량 1,000g의 神麴을 1,500ml의 80% 에탄올에 넣고 heating mantle를 이용하여 2시간 동안 가열 추출하고 여과한 여액을 500ml 플라스크에 applicator를 이용하여 넣은 후 filter로 걸러냈다. 걸러진 여과액을 Rotary evaporator (Model NE-1, 東京理化學株式會社, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조기(Model FD-1, 東京理化學株式會社, Japan)로 건조시켰다. 동결 건조된 神麴 추출물을 실온에서 보관하였다. 神麴의 최종 수거율은 19.8%였다.

### 2. 고지방 고탄수화물 식이 유발 비만형 제 2형 당뇨병 동물 모델의 제작

23-25g의 4주령 male ICR mice(중앙실험동물, Korea)를 구매하여 12시간씩 낮과 밤이 교대되며 40-70%의 습도를 유지하고 stainless-steel cage에서 1주일간 사육하며 적응기를 거쳤다. 먹이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 그 후 정상군을 제외한 모든 실험군에 인슐린 저항성을 일으킨다고 알려진 Surwit's high fat, high sucrose diet(HFD, Research Diets #D 08020201, 45 kcal% Fat and 32 kcal% Sucrose)를 8주간 섭취시켜 비만형 제 2형 당뇨병을 유발했다. 모든 동물 실험 과정은 경희의료원 동물실험윤리위원회의 승인(KHMC-IACUC:11-032)을 받았다.

### 3. 실험군 배정 및 연구 계획

실험군은 ICR mouse 10마리씩 정상군(ND), 대조군(HFD), Metformin 투여군(Met), 神麴 투여군(MMF)으로 나누어 진행하였다. 정상군을 제외한 나머지 3개 군들은 Surwit's high fat, high sucrose diet를 8주간 섭취시켜 비만형 제 2형 당뇨병을 유발했다. Metformin 투여군은 Surwit's high fat, high sucrose diet에 Metformin(Sigma, USA)을 0.5%의 비율

로 섞었다. 神麩 투여군은 1일 500mg/Kg 경구투여 용량을 환산하여 5% 비율로 Surwit's high fat, high sucrose diet에 배합하여 8주간 섭취하도록 하였다. 각 군 Mouse 1마리 당 1일 평균 사료 섭취 열량은 ND 11.70Kcal, HFD 20.23Kcal, Met 21.59Kcal, MMF 19.86Kcal로 측정 되었다.

#### 4. 체중 측정

체중은 실험 개시일에 최초 측정 한 후 매주 1회씩 측정하였고, 실험종료일 마지막 sampling하기 전에 측정하였다. 체중 측정은 아침 사료 공급 전에 일괄적으로 전자저울(CAS 2.5D, Korea)을 사용하여 측정 하였으며, 측정 시 mouse의 움직임에 따른 체중 오차를 최소화하기 위해 플라스틱 bowl에 mouse을 올려 놓고, mouse가 안정 상태에 이르러 나타나는 체중을 기록하였다.

#### 5. 경구 당부하 검사 (OGTT ; Oral Glucose Tolerance Test) 측정

경구 당부하 검사는 실험 7주째 8시간 이상 금식 시킨 후 공복 시 혈당을 측정한 후 glucose(1g/kg body weight)를 D.W.에 녹여 경구 투여시킨 다음 30분 후, 60분 후, 90분 후 mouse의 tail vein에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 혈당은 strip-operated blood glucose sensor(ONETOUCH Ultra Inverness Medical Ltd. Stockport. UK)기기를 이용하여 측정하였다.

#### 6. 지질 및 당대사 분석

실험 시작 8주째 mouse의 심장에서 채혈을 시행하여 3,000rpm에서 20분간 원심분리 한 다음 上清液을 얻어 -40℃에 보관한 후 Total Cholesterol(TC), High Density Lipoprotein(HDL) cholesterol, Low Density Lipoprotein(LDL) cholesterol, Triglyceride(TG) 등의 생화학적 분석을 시행하였으며, 동시에 fructosamine(glycoprotein) 검사를 시행하였다.

#### 7. 지방 및 간 무게 측정

실험 시작 8주째 mouse를 희생시킨 후 개복하여 부고환 지방 조직(epididymal fat pad) 및 간의 무게

를 측정하였다.

#### 8. 혈청 leptin 측정

실험 시작 8주째 mouse의 심장에서 채혈을 시행, 3,000rpm에서 20분간 원심분리 한 다음 上清液을 얻어 -40℃에 보관한 후 삼광재단에 의뢰하여 leptin을 분석하였다. 검체에 125 I가 부착된 인간 leptin과 leptin 항혈청을 결합시키고, 이 결합체에 PEG 침전액을 넣어, 결합된 form에서 leptin의 양을 측정하는 이중항체법 원리를 이용하였다. 방사면역측정법으로 Human Leptin 125 Tubes RIA kit(USA, Linco Research, Inc)를 이용하여 측정하였다.

#### 9. Stromal Vascular Cell의 분리

지방조직은 male ICR mice로부터 실험 시작 8주째 mouse를 희생시킨 후 개복하여 부고환 지방 조직(epididymal fat pad)을 채취하였다. Mouse으로부터 채취한 지방조직은 phosphate buffered saline (PBS, Gibco, USA)에 2% bovine serum albumin(BSA, Gibco, USA)을 넣은 용액에 넣은 다음 작은 조각으로 분쇄하였다. 여기에 collagenase (Sigma, USA)와 DNase I (Roche, USA)를 넣어 37℃에서 30분간 shake하여 조직이 분쇄되도록 하였다. 2% BSA/PBS에 5mM EDTA를 넣은 용액에 넣고 섞은 다음 1000rpm으로 3분간 원심분리하였다. 上清液을 분리한 다음 하층의 pellet을 제외한 나머지 용액을 제거하고 PBS에 2% Fetal Bovine Serum(FBS, Sigma, USA)을 넣은 용액에 넣은 다음 100 μm cell strainer(BD bioscience, USA)를 이용하여 불필요한 조직을 제거하고 200 × g에서 10분 동안 원심분리 하여 하부의 모아진 세포를 RBC lysis buffer(eBioscience, San. Diego, CA, USA)에 10분 간 처리, 원심분리 하여 SVC를 채집하였다.

#### 10. Adipose tissue macrophage(ATM)에 대한 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) 분석

지방조직에서 분리한 SVC를 얼음에 넣고 세포수를 측정한 다음 각 샘플당 10<sup>6</sup> cell 농도로 조정한다. FcBlock(20 μg/ml)(BD Pharmingen, USA)를 넣고 20

분간 반응시킨 다음 fluorophore-conjugated된 1차 antibodies인 CD45-FITC(BD Pharmingen, USA), F4/80-APC (eBioscience, USA), CD11b-phycoerythrin (CD11b-PE, BD Pharmingen, USA) 혹은 isotype control antibodies인 Rat IgG2B FITC (BD, USA), Rat IgG2B PE (BD, USA), Rat IgG2a,k APC isotype (eBioscience, USA)를 넣고 차광상태에서 20 분간 반응시킨다. 2% FBS/PBS 용액로 세척한 다음 FACSCalibur (BD bioscience, USA)를 이용하여 분석하였다. 이후 FlowJo 프로그램 (Tree star, inc, USA)을 이용하여 CD45 (+), CD11b (+), F4/80 (+) 인 macrophage의 백분율을 분석하였다.

8주간의 실험기간 동안 체중은 모든 실험군에서 증가하였다. 대조군은 87.6%의 체중이 증가하였으며, 정상군이 47.4%의 체중증가를 보인 것과 비교했을 때 유의한 비만이 유도되었음을 알 수 있다(p<0.001). 2주차부터 대조군은 정상군보다 유의성 있는 체중증가를 보이기 시작하여(p<0.05) 이후 실험종료시점까지 비만이 유지되었다(p<0.01). 神麴 투여군은 8주간 67.7%의 체중 증가를 보여 대조군보다 10.61% 억제된 체중 증가를 보였다. 체중변화를 주 단위로 살펴보면 6주차까지 대조군과 유사한 증가세를 보이다 7주차에 이르러서 대조군에 비해 유의성 있는 체중 증가 억제가 관찰되었다(p<0.05)(Table 1).

### 11. 통계 분석

통계학적 비교분석은 GraphPad PRISM statistical package(ver 2.00, Graphpad software inc., San Diego, USA)를 이용하였고, 각 군 간의 비교는 one-way analysis of variance(t-test)에 이어 Tuckey's post-hoc test로 사후 검증하였다. 표(Table)와 그림(Figure)에서 각각의 수치는 평균 ± 표준편차(mean ± S.D.)로 표시했으며, 양방 검정 유의도(Two-tailed p value)는 p값이 <0.05 수준일 때를 기준으로 하였다.

### 2. 神麴 투여가 당대사에 미치는 영향

대조군의 FBS는(180.22±40.45mg/dL) 정상군(113.70±19.19mg/dL)에 비해 유의성 있게 높았다(p<0.01). 전체적으로 대조군, Metformin 투여군, 神麴 투여군, 정상군의 순의 혈당 추이를 보였다. OGTT 결과, 30분 후 혈당은 대조군(399.11±79.78mg/dL)이 정상군(326.60±48.69mg/dL)보다 유의하게 높았고(p<0.05), 神麴 투여군은 30분(328.10±54.31g/dL), 60분(256.60±38.18g/dL), 90분(201.50±26.04g/dL) 후에서 모두 대조군보다 혈당이 유의성 있게 낮았다(p<0.05)(Table 1 & Fig. 1).

## 결 과

### 1. 神麴 투여가 체중에 미치는 영향

Table 1. Effect of MMF on Weight and Glycometabolism of Mice Fed Experimental Diets for 8 Weeks.

	ND	HFD	Met	MMF
Initial body weight(g)	25.50±0.97	25.80±0.92	26.00±0.50	25.70±1.16
Final body weight(g)	37.60±1.96	48.40±3.43***	43.00±6.77 †	43.11±3.52 † †
Weight gain(g)	12.1±2.42	22.67±3.16***	16.30±6.15 †	17.56±3.28 † †
FBSI(mg/dL)	113.70±19.19	180.22±40.45***	180.00±35.22	156.22±25.71
OGTT 30min(mg/dL)	326.60±48.69	399.11±79.78*	380.33±30.15	328.10±54.31 †
OGTT 60min(mg/dL)	249.60±37.65	341.00±95.79*	287.00±47.94	265.60±38.18 †
OGTT 90min(mg/dL)	187.5±40.54	285.22±108.85*	203.55±50.09 †	210.50±26.04 †
Fructosamine(mg/dL)	162.40±34.83	242.20±34.27**	197.80±22.90 †	199±17.89 †

Group abbreviation : ND; normal diet, HFD; high fat, high sucrose diet, Met: high fat, high sucrose diet with Metformin, MMF; high fat, high sucrose diet with Massa Medicata Fermentata. Significantly different between the ND and the HFD by ANOVA(\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001). Significantly different between the HFD and the Met by ANOVA(† p<0.05). Significantly different between the HFD and the MMF by ANOVA(† † p<0.05, † † † p<0.01).

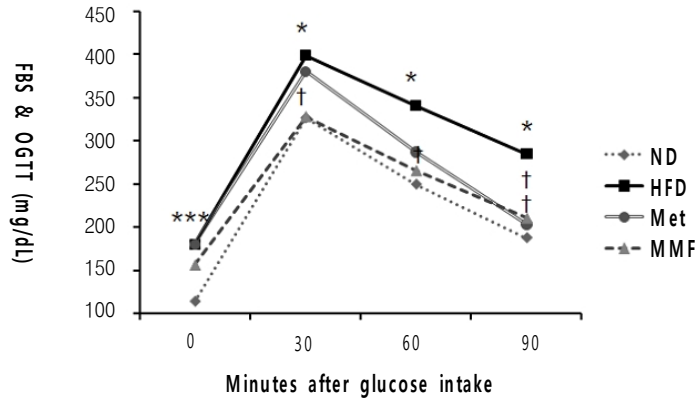


Fig. 1. Fasting Blood Sugar, Oral Glucose Tolerance Test of Each Experimental Group.

Group abbreviation : ND; normal diet, HFD; high fat, high sucrose diet, Met; high fat, high sucrose diet with Metformin, MMF: high sucrose diet with Massa Medicata Fermentata, FBS; fasting blood sugar, OGTT; oral glucose tolerance test. Significantly different between the ND and the HFD by ANOVA(\* p<0.05, \*\*\* p<0.001). Significantly different between the HFD and the Met by ANOVA(† p<0.05). Significantly different between the HFD and the MMF by ANOVA(† p<0.05).

Table 2. The Biochemistry Index of Each Experimental Group After 8 Weeks.

	ND	HFD	Met	MMF
<b>Total Cholesterol(mg/dL)</b>	128.60±40.59	173.20±5.72*	171.29±23.09	171.00±23.64
<b>HDL Cholesterol(mg/dL)</b>	121.96±11.75	111.24±6.80	131.10±11.47 † †	115.04±13.11
<b>LDL Cholesterol(mg/dL)</b>	5.80±2.77	11.80±2.77**	6.71±2.43 † †	9.60±3.05
<b>Triglyceride(mg/dL)</b>	124.00±17.73	159.00±35.06	118.71±54.60	65.80±12.42 † † †
<b>Leptin(ng/mL)</b>	1.37±.015	1.91±0.31**	1.61±0.25	1.616±0.19

Group abbreviation : ND; normal diet, HFD; high fat, high sucrose diet, Met: high fat, high sucrose diet with Metformin, MMF; high fat, high sucrose diet with Massa Medicata Fermentata. Significantly different between the ND and the HFD by ANOVA(\* p<0.05, \*\* p<0.01). Significantly different between the HFD and the Met by ANOVA(† † p<0.01). Significantly different between the HFD and the MMF by ANOVA(† † † p<0.001).

Fructosamine 농도는 대조군(242.20±34.27 $\mu$ mol/L)에서 정상군(162.40±34.83 $\mu$ mol/L)보다 증가하는 방향으로 유의성 있는 차이가 관찰되었으며(p<0.01), Metformin 투여군(197.80±22.90 $\mu$ mol/L)과 神麴 투여군(199.00±17.89 $\mu$ mol/L)은 대조군과 비교 시 유의하게 감소하였다(p<0.05)(Table 1 & Fig. 1).

### 3. 神麴 투여가 혈장 지질농도에 미치는 영향

TC 농도는 정상군에서 가장 낮고, 대조군(173.20±5.72mg/dL)은 이에 비해 유의성 있게 높았

다(p<0.05)(Table 2 & Fig. 2). HDL Cholesterol 농도는 Metformin 투여군(131.10±11.47mg/dL)에서 가장 높았으며 대조군에 비해 유의성을 보였다(p<0.01). LDL Cholesterol 농도는 대조군(11.80±2.77mg/dL)에서 가장 높았으며, 이는 정상군(5.80±2.77mg/dL)에 비해 유의성(p<0.01)이 있었다(Table 2 & Fig. 2).

TG 농도는 대조군과 정상군 사이에 유의한 차이가 없었고, 神麴 투여군(65.80±12.41mg/dL)에서만 대조군(159.00±35.06mg/dL)과 유의한 차이가 관찰되었다(p<0.01)(Table 2 & Fig. 2).

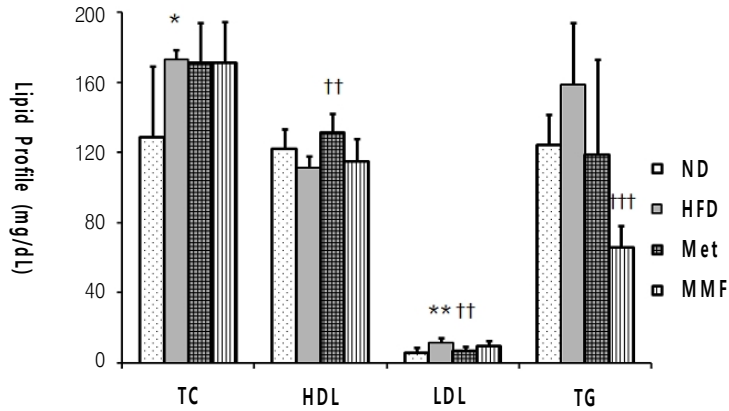


Fig. 2. Lipid profile of Each Experimental Group.

Group abbreviation : ND; normal diet, HFD; high fat, high sucrose diet, Met; high fat, high sucrose diet with Metformin, MMF; high sucrose diet with Massa Medicata Fermentata. Significantly different between the ND and the HFD by ANOVA(\* p<0.05. \*\* p<0.01). Significantly different between the HFD and the Met by ANOVA(† † p<0.01). Significantly different between the HFD and the MMF by ANOVA(† † † p<0.001).

Table 3. Fat, Liver Weight and Adipose Tissue Macrophage of Each Experimental Group.

	ND	HFD	Met	MMF
Fat(g)	0.61±0.36	2.75±0.57***	1.79±0.73 † †	2.12±0.42 †
Liver(mg/dL)	1.83±0.15	2.13 ±0.32	2.11±0.34	1.86±0.35
Adipose tissue macrophage %(ATM)	2.49±0.43	7.99±1.56***	3.00±0.82 † †	3.33±1.24 †

Group abbreviation : ND; normal diet, HFD; high fat, high sucrose diet, Met; high fat, high sucrose diet with Metformin, MMF; high fat, high sucrose diet with Massa Medicata Fermentata. Significantly different between the ND and the HFD by ANOVA(\*\*\* p<0.001). Significantly different between the HFD and the Met by ANOVA(† † p<0.01). Significantly different between the HFD and the MMF by ANOVA(† p<0.05).

4. 神麴 투여가 지방 및 간 무게에 미치는 영향

먼저 부고환 지방층의 무게를 살펴보면, 정상군 (0.61±0.36g)과 비교했을 때 대조군(2.75±0.57g)에서 유의성 있는 증가세를 보였고(p<0.001), Metformin 투여군(1.79±0.73g)은 대조군에 비교하여 유의한 체중감소를 나타냈으며(p<0.01), 神麴 투여군 (2.12±0.42g)에서도 역시 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 관찰되었다(p<0.05)(Table 3). 간의 무게는 神麴 투여군, 대조군, 정상군 간의 유의한 차이가 없었

다(Table 3).

5. 神麴 투여가 leptin 농도에 미치는 영향

Leptin 농도의 경우 대조군(1.91±0.31ng/mL)은 정상군(1.37±0.15ng/mL)에 비해 유의성 있게 증가하였으나(p<0.01), 대조군과 Metformin 투여군 (1.61±0.25ng/mL), 대조군과 神麴 투여군 (1.616±0.19ng/mL) 사이에서는 유의한 차이가 발견되지 않았다(Table 2).

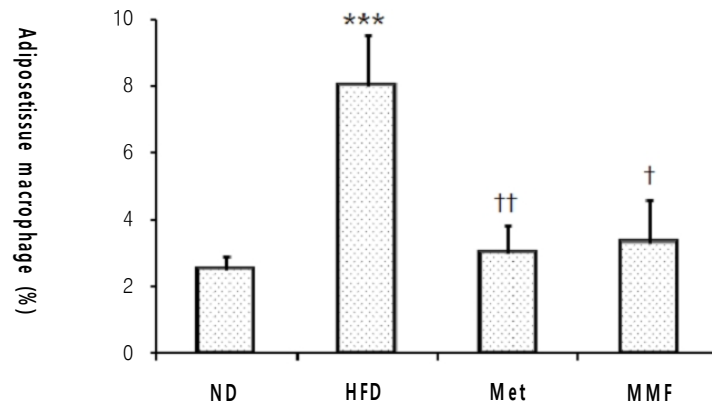


Fig. 3. Adipose Tissue Macrophage of Each Experimental Group.

Group abbreviation : ND; normal diet, HFD; high fat, high sucrose diet, Met; high fat, high sucrose diet with Metformin, MMF: high sucrose diet with Massa Medicata Fermentata. Significantly different between the ND and the HFD by ANOVA(\*\*\*  $p < 0.001$ ). Significantly different between the HFD and the MMF by ANOVA(††  $p < 0.01$ ). Significantly different between the HFD and the MMF by ANOVA(†  $p < 0.05$ ).

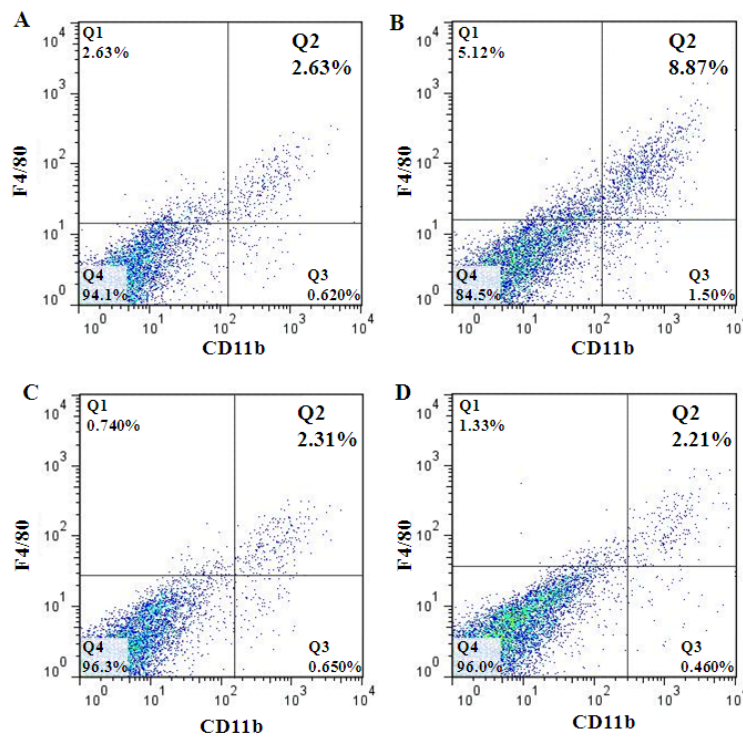


Fig. 4. Fluorescence Activated Cell Sorting(FACS) Analysis of Positive Cells of F4/80 and CD11b from a Mouse of Each Experimental Group.

Group abbreviation : (A) ND; normal diet, (B) HFD; high fat, high sucrose diet, (C) Met; high fat, high sucrose diet with Metformin, (D) MMF: high sucrose diet with Massa Medicata Fermentata.

### 6. 神麩 투여가 Adipose tissue macrophage(ATM)에 미치는 영향

Mouse의 ATM은 대식세포 표지자인 F4/80과 CD11b를 지니고 있기 때문에 Fluorescence Activated Cell Sorting(FACS)을 통해 CD11b(+), F4/80(+인 ATM을 분석하였다. 그 결과를 Fig. 4의 Q2 사분면에 도식화하여 ATM에 의한 염증 상태를 나타내었다. 정상군(2.49±0.43%)에 비해 대조군(7.99±1.56%)에서 유의성 있는 뚜렷한 증가를 보였다(p<0.001). Metformin 투여군(3.00±0.82%)은 대조군에 비해 유의한 ATM 감소를 나타냈으며(p<0.01), 神麩 투여군(3.33±1.24%)의 ATM 또한 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(p<0.05)(Table 3 & Fig. 3, 4).

## 고 찰

인슐린 저항성이 제 2형 당뇨병의 중요한 기전임<sup>17)</sup>은 이미 잘 알려져 있지만, 어떻게 이러한 비정상성이 발생하게 되는지, 당뇨병과 중심성 비만, 고혈압, 죽상동맥경화, 이상지질혈증 등을 포함한 대사증후군의 임상증상 및 생화학적 특성이 연관되어 있는지는 정확히 밝혀지지 않았으며, 최근 제 2형 당뇨병의 기전으로 만성 염증이 새롭게 대두되고 있다.

제 2형 당뇨병 및 대사증후군 발병의 폭발적인 증가는 에너지소모에 비해 과다한 에너지섭취에 따른 비만과 밀접한 관련이 있다. 비만 역시 cytokine 생성의 이상, 급성기 작용물질(acute phase reactant)의 증가, 염증 신호전달계의 활성화 등으로 유추해볼 때, 만성 염증과 관련이 있을 것으로 추정되고 있다<sup>18)</sup>. 지방조직은 단순히 지방의 저장고일 뿐만 아니라 에너지의 균형을 유지하기 위한 내분비기관으로 대사작용 및 염증반응에 관여한다. 비만에 의해 유도된 만성염증은 지방조직에서 시작되나 비만의 증가 또는 인슐린 저항성의 지속적인 악화로 인해 결국 전신적인 상태로 발전된다.

현재 임상에서 많이 사용하고 있는 경구용 당뇨제는 α-glucosidase 억제제, sulfonylurea계 약물, biguanide계 약물, peroxisome proliferatoractivated receptor-γ(PPAR-γ) 효능제 등이 있다<sup>19)</sup>. 지속적으로 다양한 약물이 개발되고 있으나 부작용이 없으면서

동시에 여러 합병증에 대해 전반적인 효과를 나타내는 약물은 극히 드물다. 당뇨병 자체가 만성 소모성 질환이기 때문에 장기적인 약물 투여가 요구됨에 따라 비교적 안정성이 확보된 천연 약물이 주목을 받고 있으며, 특히 동양의학에서 새로운 해결책을 찾으려는 노력이 활발하게 진행되고 있다<sup>20)</sup>.

본 연구에서 사용한 神麩은 밀, 菁蒿, 赤小豆, 蒼耳子, 杏仁, 野蓼 六味로 구성된다. 그 氣味는 甘辛溫하고 無毒하며, 脾胃二經에 들어간다. 주효능은 健脾和中시켜 飲食停滯, 胸痞腹脹, 嘔吐, 瀉痢, 產後 瘀血에 의한 腹痛, 小兒 腹大堅積등을 치료한다<sup>21)</sup>. 神麩의 구성 중 대부분을 차지하는 밀은 세계 제 1위의 생산량을 유지하는 곡물로 서구에서는 wheatglass라는 밀순을 영양부족 및 성인병 등의 건강 기능성보조식품으로 많이 이용하고 있다<sup>22)</sup>. 또한 최근 streptozotocin으로 유도한 제 1형 당뇨병 마우스모델에서 소맥엽물추출물을 투여해 혈당 및 체중개선을 보고한 바 있으나<sup>23)</sup> 제 2형 당뇨병에 대한 연구는 아직 보고된바 없으며<sup>24)</sup>, 神麩의 혈당 및 체중개선에 대한 연구는 전무하다.

당뇨병은 한의학에서 消渴의 범주에 속하는데 消渴은 「黃帝內經」에서부터 언급된 병증으로 원인은 「素門·陰陽別論」에서 “二陽結爲之消”라 하였다. 二陽結이란 手足陽明의 大腸과 胃의 기능실조를 말하는데 手陽明大腸은 津液을 주관하니 熱邪를 받게 되면 津液이 부족하게 되고, 足陽明胃는 血을 주관하니 血中에 火가 잠복하게 되면 燥하게 된다. 이와 같이 消渴은 水液運化와 밀접한 관련이 있는데, 脾 역시 水液運化의 큰 축을 담당한다<sup>17)</sup>. 脾는 中焦에 위치하여 升降의 축이 되는데, 「素門·藏氣法時論」에서는 “脾病者, 身中善飢”라고 하였다. 李梴은 “治渴初宜 養肺降心, 久宜滋腎養脾...然心腎皆通於脾, 養脾則津液自生”이라 하여 消渴의 치료에 養脾를 중시<sup>17)</sup>하였으므로, 健脾和中하는 神麩 역시 당뇨병 치료에 응용될 수 있다. 덧붙여 당뇨병은 ‘甘肥貴人, 則膏粱之疾也’라 하여 살이 찌고 좋은 음식을 먹는 상류층에서 많이 발생하는 질환으로서, 비만한 사람은 체내에 熱이 축적되어 消渴이 발생한다고 하여<sup>25)</sup> 이미 비만과 당뇨병과의 관계를 인식하였다.

이번 연구에서 체중과 당 및 지질대사와 염증상태에 미치는 영향을 살펴본 결과, 전반적인 개선효과를 보였다.



무엇보다 비만 및 대사증후군 치료에 있어서 생활 습관 개선의 효과는 여러 전향적 연구에서 증명된 바 있는데, 체중 감소와 운동은 당뇨병 발생률을 50% 이상 감소시킬 수 있다<sup>26)</sup>. 체중 감량은 인슐린 저항성을 개선하는 adiponectin과 IL-10의 상승을 초래함과 동시에 TG, TC 및 혈압을 개선하고 사망률을 감소시키고<sup>27)</sup>, 염증 표지자들을 감소 혹은 정상화시킨다<sup>28)</sup>고 알려져 있다.

체중은 실험 시작 시 각 실험군 간에 의미 있는 차이가 없었다. 2주차부터 대조군은 정상군보다 유의성 있는( $p<0.001$ ) 체중증가를 보이기 시작, 이후 비만한 상태가 유지되었다. 神麩 투여군은 6주차까지 대조군과 비슷한 증가세를 보이다 7주차에 이르러 대조군과 유의성 있는( $P<0.05$ ) 체중 증가를 억제시켜 神麩의 체중 조절 가능성을 보여주어 기존의 항당뇨효과에 대한 한약처방의 연구 결과와 차별성을 나타냈다<sup>29),30)</sup>.

당대사에서 神麩 투여군은 대조군보다 30분, 60분, 90분 후 혈당 모두 유의성 있게( $P<0.05$ ) 낮은 경향을 보여 대조군보다 인슐린 저항성이 감소하였음을 확인하였다. Fructosamine은 최근 2주간의 혈당 평균치를 반영하는 당뇨병의 치료 효과 판단 및 진단 지표로<sup>31)</sup>, 神麩 투여군은 대조군과 유의성 있게( $P<0.05$ ) fructosamine 농도가 감소하여 神麩의 혈당 조절력을 보였다.

지질대사의 경우 본 연구에서 ICR mice에 고지방 식이를 투여하여 나타난 HDL/LDL cholesterol 비율이 다른 연구<sup>32),33)</sup>에서 C57BL/6 mice 등에 고지방 식이를 투여하여 나타난 HDL/LDL 비율에 비해 높게 나타났으나 고지방 식이 투여후 HDL/LDL 비율이 감소하는 즉 HDL Cholesterol에 비해 LDL cholesterol이 고지방식으로 증가하는 경향성은 일치하였다. 각 지표별 실험 결과를 살펴보면 TC, HDL cholesterol, LDL cholesterol 농도는 神麩 투여군에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 반면 神麩 투여군에서는 대조군에 비해 상당히 유의성 있는( $P<0.001$ ) TG 농도 저하를 나타냈다.

당뇨병 환자에 있어서 혈청 지질 농도는 혈당 조절과 더불어 대혈관 합병증 예방을 위한 중요한 변수가 된다<sup>34)</sup>. 당뇨병 환자 2/3에서는 TG 농도가 높고 HDL cholesterol 농도가 낮은 공통점을 보인다는 사실이 발견되었다. 인슐린 저항성으로 인해 고인슐린

혈증 상태가 되면 지방조직에서 혈류로의 지방산 배출이 증가하고, 간으로의 유리 지방산 유입 증가는 VLDL cholesterol의 생성 및 분비를 자극하여 고중성지방혈증을 초래한다<sup>35)</sup>. 또한 VLDL cholesterol은 cholesterol ester transfer protein(CETP)를 통해 HDL cholesterol과 LDL cholesterol로부터 VLDL cholesterol로의 cholesteryl ester의 이동을 자극하여 HDL cholesterol의 양이 감소한다<sup>36)</sup>. 神麩은 당뇨병 환자에서 특징적으로 보이는 TG 농도 증가를 억제하는 효과가 우수한 것으로 사료된다.

지방 무게를 평가하기 위해 부고환 지방 조직을 사용하였는데, 부고환 지방 조직은 포도당과 글리코젠을 합성하고, 인슐린에 민감하게 반응하며, 여러 가지 adipocytokine을 분비하기 때문에 백색지방조직의 변화를 평가하기 위한 지표로 사용된다<sup>37)</sup>. 神麩 투여군은 유의성 있는( $P<0.05$ ) 지방 무게의 감소를 보였다. 이는 神麩이 고지방 고탄수화물 식이로 인하여 유도되는 지방층의 증가정도를 억제할 수 있음을 의미하며, 7주차에서 보인 체중 증가 속도 둔화 역시 이와 연관 있음을 알 수 있다.

간은 정상적인 혈당을 유지하는데 중요한 역할을 하기 때문에 췌장과 독립적으로 당대사 질환을 예방 또는 치료하는 데 있어 표적기관이 되고 있으나 본 연구에서 간 무게는 대조군, Metformin 투여군, 神麩 투여군, 정상군 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않아 간에서의 중성지방 축적과 관련해서 의미 있는 결과를 도출할 수 없었다.

지방조직에서 분비되는 대표적 adiponectin인 leptin은 체내 지방조직이 증가하면 농도가 증가하여 시상하부의 수용체에 작용, 포만감을 느끼고 에너지 소비가 늘며 교감신경이 항진되어 식욕을 감소시킬 뿐 아니라 에너지소비도 증가시키는 원심성 신호를 만들어낸다<sup>38)</sup>. 하지만 고지방식은 시상하부에서 leptin 신호전달의 향상을 억제하여 leptin 저항성을 유발시켜 혈중 leptin이 증가하여도 식욕을 억제시키지 못하는 것으로 알려져 있다<sup>39)</sup>. 본 연구에서도 역시 고지방식은 정상군에 비해 혈청 leptin 농도를 증가시켰고 이것은 leptin 저항성이 증가하였다는 것을 나타낸다. 하지만 神麩 투여군의 leptin 농도는 유의성 있는 감소를 보이지 않았다.

마지막으로 神麩이 염증에 미치는 영향을 알고자

Fluorescence Activated Cell Sorting(FACS)을 통해 ATM을 분석하였다.

현재 비만형 제 2형 당뇨병의 가장 유력한 가설 중 하나는 염증이다. Proinflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$ 가 지방세포로부터 발현되고, 비만이 진행될수록 증가되며, TNF- $\alpha$  저해 시 인슐린 저항성이 회복된다는 연구로부터 염증 가설은 체계화 되었다<sup>40)</sup>. 2003년, 주로 innate immune response에 관여하는 것으로 알려진 macrophage가 비만한 쥐의 지방조직에 침윤된다는 것이 보고되었으며, 후에 이 macrophage는 adipose tissue macrophage라고 명명되었다<sup>41),42)</sup>. 지방세포의 비대와 부족한 혈관신생은 지방세포 괴사와 저산소증을 초래한다. 그 결과 지방세포와 Stromal Vascular Cell로부터 proinflammatory cytokine과 TNF- $\alpha$ , leptin, 특히 대식세포와 강력한 chemoattractant로 알려진 MCP-1<sup>43)</sup>와 같은 chemokine이 분비된다. 이러한 전염증 물질들은 macrophage를 비롯한 면역세포들을 지방조직 내로 불러 모으게 되고, 염증 상태를 악화시킨다<sup>44)</sup>. 특히 혈액 내 순환 단핵세포가 유입됨으로써 직접적으로 ATM의 증가가 유발된다<sup>44)</sup>. 또한 TNF- $\alpha$ 는 강력한 대식세포의 활성화로서의 역할을 하며, 지방전구세포의 염증 유전자로의 발현을 유도한다. 즉 지방조직에서는 국소적인 지방전구세포의 대식세포로의 변화, 상주 대식세포와 순환 단핵세포의 동원 및 활성화 등의 기전으로 대식세포의 활성도가 증가된다. 일단 지방조직에서 macrophage 활성화 및 침윤이 일어나면 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, MCP-1 등의 수많은 cytokine 및 chemokine이 분비되어 인슐린 저항성을 일으킨다<sup>41)</sup>. TNF- $\alpha$ 의 경우 인슐린 전달 신호에 영향을 미쳐 직접적으로 인슐린 감수성을 저해하며<sup>45)</sup>, 대식세포가 분비하는 인자들은 GLUT4와 IRS-1을 하향 조절시킴으로써 인슐린 작용을 막는다<sup>46)</sup>. 지방조직내의 대식세포는 지방덩어리의 성장을 조절하고 제한하는 역할을 하며 동시에, 비만 합병증의 발생을 가능하게 하는 chemokine과 염증관련 cytokine을 분비하여 해로운 전신적인 작용을 갖는다.

본 실험에서도 대조군은 정상군에 비해 혈당상승과 더불어 상당히 유의한(P<0.001) ATM의 증가를 보여 고지방 고단수화물 식이로써 유발된 당뇨 및 비만이 지방조직의 염증상태를 유발한 것이 확인하였다. 神麩 투여군은 대조군에 비해 58.32%의 ATM 감

소를 보였으며 이는 통계적으로 유의(P<0.05)한 것으로 나타났다. 이는 神麩이 식이로 유발된 비만 개체의 지방조직내 대식세포 침착을 감소시켰음을 의미하며, 이는 앞서 神麩이 체중증가 억제, 혈당 및 지질 농도를 개선, 지방무게 감소시킨 것과 일맥상통하는 결과이다. 나아가 神麩 투여가 염증 촉진 매개체들의 생성을 감소시켜 인체의 전신적인 염증 상태 개선 및 인슐린 감수성 회복에 도움을 주리라 기대해 볼 수 있다.

### 결론

神麩이 Surwit's high fat, high sucrose 식이로 유발된 비만형 제 2형 당뇨병 모델 mouse의 체중, 공복혈당, 당 및 지질대사, 부고환 지방 무게 및 간 무게, leptin, ATM에 미치는 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 神麩 투여는 Surwit's high fat, high sucrose 식이로 인한 체중 증가 억제 가능성을 보였다.
2. 神麩 투여는 공복 혈당(FBS)과 경구 당부하 검사(OGTT)에서 내당능을 회복시켰다.
3. 神麩 투여는 Fructasamine을 유의하게 감소시켰다.
4. 神麩 투여는 Triglyceride를 유의하게 감소시켰다.
5. 神麩 투여는 부고환 지방층(Epididymal Fat Pad)의 무게를 대조군보다 유의하게 감소시켰다.
6. 神麩 투여는 Adipose Tissue Macrophage를 유의하게 감소시켰다.

본 연구결과에 따르면 神麩은 임상학적 당뇨 증상 완화 및 당뇨 합병증 예방 및 치료제로의 충분한 가능성을 보였다. 향후 본 연구에서는 진행되지 못한 장기간의 神麩 투여에 대한 평가와 투여 용량에 따른 실험이 이루어져야 할 것으로 보인다.

### 감사의 글

본 연구는 2009년도 경희대학교 연구비지원에 의한 결과임(과제 고유번호 KHU-20090581).

참고문헌

1. Powers AC. Diabetes Mellitus. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, eds. Harrison's textbook of medicine. 15th ed. NewYork:McGraw-Hill. 2001:2109-32.
2. 대한당뇨병학회. 픽업의 핵심 당뇨병학. 서울:E PUBLIC. 2006:2-4.
3. Lee TH. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. J Food Sci Nutr. 1999;4(2):61-5.
4. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. J Cline Invest. 2000;106(4):473-81.
5. Jung ED, Lee JH, Son HS. The correlation between Central Obesity and glucose, Lipid metabolism and macrovascular Complication in Elderly Type 2 Diabetes. Diabetes Metab J. 2007;31(4):343-50.
6. Koivisto VA. Insulin therapy in type II diabetes. Diabetes Care. 1993;16:29-39.
7. Wang E, Wylie-Rosett J. Review of selected Chinese herbal medicines in the treatment of type 2 diabetes. Diabetes Educ. 2008;34(4):645-54.
8. Oh CS, Kim MS, Kim I, Kim HY, Park SE, Choi SE, et al. Acne Treatment Cases with Hwangryeonhaedok-tang. J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2009;22(3): 228-36.
9. Choi JH, Hwang SJ, Jeong SN, Lee YK, Jin MH, Park SG, et al. Anti-aging Effect on Skin with 9 Repetitive Steaming and Fermenting Process Herbal Composition Extract. Kor. J. Herbology 2009;24(4):101-6.
10. 전국한의학대학교 본초학교수 공편저. 本草學. 서울:영림사. 2000:415.
11. Lee ES, Seo BE. The property of Bacillus sp. B-222 isolated from MASSA MEDICATA FERMENTATA. J Appl Orient Med. 2003;3(1): 43-7.
12. 허준. 동의보감. 서울:남산당. 2004:648.
13. Patrick L, Uzick M. Cardiovascular disease; C-reactive protein and the inflammatory Disease Paradigm: HMG-CoA reductase, Red yeast rice and olive oil polyphenols. Altern Med Rev. 2001;6(3):248-71.
14. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. JAMA 2003; 290(4):486-94.
15. Kang MR, Kim JY, Hyun YJ, Kim HJ, Yeo HY, Song YD, et al. The Effect of Red-Yeast-Rice Supplement on Serum Lipid Profile and Glucose Control in Subjects with Impaired Fasting Glucose or Impaired Glucose Tolerance. Korean J Nutr. 2008;41(1):31-40.
16. Yu TS, Kim HH, Yoon CG. Hepatic Oxygen Free Radical Metabolizing Enzyme Activities and Serum Lipid Profile in Rats Fed Diet Supplemented with Monascus Pigment. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2003;32(2):244-9.
17. 전국한의학대학교 신계내과학 교실. 신계내과학. 서울:군자출판사. 2011:93.
18. Park CY, Yoo HJ. Inflammation and Obesity. Endocrinol Metab. 2004;19(2):97-108.
19. Zhang BB, Moller DE. New approaches in the treatment of type 2 diabetes. Curr. Opin. Chem. Biol. 2000;4:461-7.
20. Park JS, Lee BH, Doo HK, Ahn YM, Ahn SY. The Effects of Supungsunki-hwan on High Fat, High Carbohydrate Diet-induced Obese Type 2 Diabetic Mouse Model. Korean J. Orient. Int. Med. 2009;30(2):257-69.
21. Kim JK. The Anti-depressant Effect of Chilbokum Under The Forced Swimming Test in Rats[Dissertation]. Seoul: Donngguk University; 2005.

22. Hanninen O, Rauma AL, Kaartinen K, Nenonen M. Vegan diet in physiological health promotion. *Acta Physiol Hung*. 1999;86:171-80.
23. Lee SH, Lee YM, Lee HS, Kim DK. Anti-oxidative and anti-hyperglycemia effect of *Massa Medicata Fermentata* wheat sprout water extracts on the streptozotocin-induced diabetic mice. *Kor J Pharmacogn*. 2009;40:408-14.
24. Lee SH, Lim SW, Mihn NV, Hur JM, Song BJ, Lee YM, et al. Administration of *Triticum aestivum* Sprout Water Extracts Reduce the Level of Blood Glucose and Cholesterol in Leptin Deficient ob/ob Mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2011;40(3):, 401~8.
25. 권건혁. 편집 황제내경. 서울:도서출판 반룡. 2000:77,120.
26. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 2002;346:393-403.
27. Jung SH, Park HS, Kim KS, Choi WH, Ahn CW, Kim BT, et al. Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *J Nutr Biochem*. 2008;19(6):371-5.
28. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Research Communications*. 1999;257:79-83.
29. Song SY, Ahn SY, Ahn YM, Um JY, Jang HJ, Lee BC. Anti-Glycemic and Anti-Lipid Effect of Ethanol Extract of *Supungsunkihwan-ga-gambang* in High Fat Diet-induced Obese Mice. *J Korean Oriental Med*. 2011;32(5):1-11.
30. Park JS, Lee BC, Doo HK, Ahn YM, Ahn SY. The Effects of *Supungsunki-hwanon* HighFat, High Carbohydrate Diet-induced Obese Type 2 Diabetic Mouse Model. *Korean J. Orient. Int. Med*. 2009;30(2):257-69.
31. Kim JH, Kang MS, Kwon OH, Lee SM. Evaluation of Fructosamine Tests and Prenalytical Errors. *Korean J Pathol*. 1991; z11(2):333-9.
32. Gajda AM, Pellizzon MA, Ricci MR, Ulman EA. Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rodent Models. 2012;[4screens]. Available at: URL:<http://www.researchdiets.com/system/resources/BAhbBlshOgZmIkAyMDEyLzA0LzIwLzE0XzQwXzQyXzYzOV9EaWV0X0luZHVjZWRFfTWV0YWJvbGljX1N5bmRyb21lLnBkZg/Diet-Induced%20Metabolic%20Syndrome.pdf>. Accessed February 27, 2012.
33. Mingorance C, Duluc L, Chalopin M, Simard G, Pierr, Ducluzeau PH, Herrera MD, Sotomayor M A, Andriantsitohaina R. Propionyl-L-carnitine Corrects Metabolic and Cardiovascular Alterations in Diet-Induced Obese Mice and Improves Liver Respiratory Chain Activity. 2012;[5screens] Available at: URL:<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0034268>. Accessed February 27, 2012
34. Ditzel J. Oxygen transport impairment in diabetes. *Diabetes*. 1976;25(2):832-8.
35. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000;106: 453-8.
36. Bruce C, Chouinard RA Jr, Tall AR. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr* 1998;18:297-330.
37. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002;8(7):731-7.

38. Kim YW. Leptin Resistance. *Endocrinol Metab.* 2007;22(5):311-16.
39. Scarpace PJ, Zhang Y. Leptin resistance: a pre-disposing factor for diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296:493-500.
40. Hotamisligil GS, Shargil NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259(5091):87-91.
41. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-808.
42. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Research Communications.* 1999;257:79-83.
43. Han CY, Chan CK, Omer M, Chiba T, Wight TN, Chait A, Subramanian S. Adipocyte-derived serum amyloid A3 and hyaluronan play a role in monocyte recruitment and adhesion. *Diabetes.* 2007;56(9):2260-73.
44. Oliver E, McGillicuddy F, Phillips C, Toomey S, Roche HM. Postgraduate Symposium. 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. *Proc Nutr Soc.* 2010;69:232 - 43.
45. Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 1996; 271:13018 - 22.
46. Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:166-74.