



Original Article / 원저

六味地黃湯加味方이 C57BL/6JHam-ob/ob mice의 肥滿 및 제2형 糖尿病에 미치는 影響

김태우 · 강석봉*

대구한의대학교 신계내과학교실

Antiobese and Antidiabetic Effects of *Yookmijihwang-tang-gamibang*, a Traditional Polyherbal Formula on the Obese and Type II Diabetic C57BL/6JHam-ob/ob Mice

Taewoo Kim · Seok Bong Kang*

Department of Korean Internal Medicine, Daegu Haany University Medical Center

ABSTRACT

Objectives : The object of this study was to observe the pharmacological effects of *Yookmijihwang-tang-gamibang* (*Liuweidihuang-tang-jiawefang*, YGB) consisted of 17 types of herbs has been traditionally used in Korean medicine for treating various disorders in clinics, aqueous extracts on the genetically obese and type II diabetic C57BL/6JHam-ob/ob(ob/ob) mice.

Methods : Three different dosages of YGB were orally administered, once a day for 28 days to ob/ob mice with ob/ob control and C57BL/6JJms normoglycemic intact mice. Four weeks after treatments of YGB: the changes on the body weight, food consumption, blood glucose levels, leptin and adiponectin contents were observed for monitoring the antiobese and antidiabetic effects of YGB. The effects were compared to those of CLA(conjugated linoleic acid) which improve type II diabetes and inhibit related obesity.

© 2013 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.ompak.okdanche.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Results : After end of 28 days of continuous treatments, ob/ob control showed increases of adipocyte hypertrophy, vasodilated atrophic glomerulus which were detected with marked hyperplasia of pancreatic islets, insulin and glucagon producing cells. These obese and related type II diabetes induced in ob/ob mice were markedly and significantly inhibited by 28 days of continuous treatment of three dosages of YGB. The YGB 50mg/kg showed similar favorable effects on the diabetes and related diabetic complications as compared with CLA 750mg/kg in ob/ob mice of the present study.

Conclusions : The results obtained in this study suggest that over 25mg/kg of YGB extracts favorably retarded the obese and type II diabetes in genetically obese and type II diabetic ob/ob mice.

Keyword : Yookmijihwang-tang-gamibang, Diabetes, Obese

I. 서 론

당뇨병은 인슐린의 절대적 또는 상대적 결핍과 조직에서의 인슐린 작용저하에 기인한 고혈당 및 이에 수반되는 대사장애를 특징으로 하는 질환군을 말한다¹⁾. 당뇨병 중에서도 제2형 당뇨병은 간의 포도당 생산조절 결손과 낮은 베타세포 기능, 말초 인슐린 저항성이라는 특징이 있는데, 특히 과도한 체중으로 인한 비만증은 인슐린 저항성을 증가시켜 제2형 당뇨병의 위험을 증가시키고 있다²⁾.

비만은 체내의 지방이 건강을 해칠 정도로 과잉 축적되어 대사장애를 유발하는 병리적인 상태를 의미하는데, 이는 심혈관계 질환, 고혈압 및 제2형 당뇨병과 같은 치명적인 질환의 주요 유발 원인으로 알려져 있으며, 최근들어 고열량 식품의 섭취 증가와 함께 운동 부족에 의해 대사증후군이 급증하고 있는 실정이다^{3,4)}.

현재 당뇨의 발병 및 인슐린 저항성을 치료하기 위해 사용되고 있는 항당뇨 약물들은 여러 가지 부작용과 함께 만족할만한 수준의 효과를 나타내지 못하고 있는 실정이므로, 새로운 당뇨병 치료제, 그 중에서도 대사증후군과 같은 제2형 당뇨병에 대한 치료제의 개발이 시급한 실정이며, 특히 부작용이 상대적으로 적고, 효과가 뛰어난 천연물 유래의 대사증후군 치료제의 개발이 절실한 실정이다⁵⁾.

六味地黃湯加味方은 滋陰補血하는 六味地黃湯의 6

가지 구성 약재인 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 澤瀉, 牡丹皮, 茯苓과 清熱瀉火解毒하는 黃連解毒湯의 4가지 구성 약재인 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子에 葛根, 天花粉, 地骨皮, 麥門冬, 五味子, 知母 및 龜板을 가미한 총 17종의 약재로 구성된 처방이다. 기존 연구에서는 六味地黃湯의 항당뇨 효과 이외에 六味地黃湯의 항비만 효과나 黃連解毒湯의 항비만, 항당뇨 효과 등에 대해서 보고된 바는 없지만, 17가지 구성 약재 대부분이 항당뇨, 항비만 효과를 나타내는 것으로 알려져 있어, 六味地黃湯加味方 역시 비만과 관련된 제2형 당뇨 및 다양한 당뇨 합병증에 대해 유효한 효과를 나타낼 것으로 판단되었고, 이를 위해 본 연구에서는 六味地黃湯加味方 물 추출물 25, 50 및 100mg/kg을 각각 28일간 비만 당뇨 C57BL/6J-ob/ob (ob/ob) 마우스에 경구투여하고 그 변화를 측정하여, 항비만 효과 및 항당뇨 효과를 평가하였다. 실험결과는 확실한 항비만 및 항당뇨 효과를 나타내는 것으로 알려진 CLA(conjugated linoleic acid) 750mg/kg 투여군⁶⁾과 비교하였으며, 이를 통하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

5마리의 정상 혈당의 수컷 C57BL/6JJms 마우스 (5-weeks old upon receipt, SLC, Japan) 및 유전적으로 C57BL/6J 마우스의 background를 가지는 25마

*교신저자 : S. B. Kang, 165, Daegu Haany University,
Sang-Dong, Suseong-Gu, Daegu.
· Tel : 82-54-550-7000 · Fax : 82-53-770-2189
· Email : kangsb@dhu.ac.kr

· 접수 2013/11/5 · 수정 2013/11/22 · 채택 2013/11/25

리의 수컷 C57BL/6JHam-ob/ob 마우스 (5-weeks old upon receipt, SLC, Japan)를 28일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간동안 온도(20~25℃)와 습도(40~45%)가 조절된 사육실에서 마우스용 polycarbonate 사육상자에 5마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료(Samyang, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 모든 실험동물은 투여시작일 및 최종 부검일에 각각 18시간 정도 절식을 실시하였으며 (이 기간에도 음수는 자유롭게 공급하였다), picric acid 로 개체를 식별하였다. 본 실험에 사용된 모든 실험동물은 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' 및 대구한의대학교 실험동물윤리위원회의 기준에 준하여 취급하였다.

2) 실험약재

본 실험에 사용된 약재는 지역 약업사 (제천한방약초, 제천, Korea)에서 매입한 것을 현미경 하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, 본 실험에 사용된 六味地黃湯加味方 (Yookmijihwang-tang-gamibang ; YGB) 1첩 분량의 조성은 아래와 같다.

Composition of Yookmijihwang-tang-gamibang used in this study		
韓藥名	藥名	用量(g)
熟地黃	Rehmanniae Radix et Rhizoma Preparata	10
葛根	Puerariae Radix	6
天花粉	Trichosanthis Radix	6
地骨皮	Lycii Radicis Cortex	6
山藥	Dioscoreae Rhizoma	6
山茱萸	Cornus Fructus	6
白茯苓	Hoelen White	4
牡丹皮	Moutan Radicis Cortex	4
澤瀉	Alismatis Rhizoma	4
麥門冬	Liriopsis Tuber	3
五味子	Schisandrae Fructus	3
梔子	Gardeniae Fructus	3
黃芩	Scutellariae Radix	3
黃蓮	Coptidis Rhizoma	3
黃柏	Phellodendri Cortex	3
知母	Anemarrhenae Rhizoma	3
龜板	Testudinis Plastrum	3
	總量	79

3. 방법

1) 六味地黃湯加味方 제조

선정된 약재 10첩 분량 (760g)을 취하여, 정제수 10L로, 80℃에서 3시간 동안 3번 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R144, Buchi Labortechnik AG, Switzerland)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer (Labconco Freezone1, Labconco Corp., USA)를 사용하여 동결 건조시켜 총 112.85g (수율 약 15.05%)의 연갈색 물 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 물 추출한 六味地黃湯加味方 동결 건조물은 -20℃의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 용매인 증류수에 10mg/ml의 농도까지 갈색으로 비교적 잘 용해되었다.

2) 실험군 분리 및 약물의 투여

실험동물은 군당 5마리씩 아래에 기록한 6그룹으로 구분하였다. 즉, C57BL/6JMs 마우스에 멸균 증류수만을 경구 투여한 정상 대조군 (intact control), C57BL/6JHam-ob/ob mice에 멸균 증류수를 투여한 비만 당뇨 대조군 (ob/ob control), C57BL/6JHam-ob/ob mice에 CLA (RexGene Biotech Co., Korea) 750mg/kg 투여군 (CLA 750), C57BL/6JHam-ob/ob mice에 六味地黃湯加味方 물 추출물 25mg/kg (YGB 25), 50mg/kg (YGB 50), 100mg/kg (YGB 100) 투여군의 6군으로 구분하여 실험하였다. YGB 및 CLA은 각각 멸균 증류수에 희석 또는 용해시켜 동물 체중 kg 당 10ml의 용량으로 매일 1회씩 28일간 금속제 sonde가 부착된 1ml 주사기를 이용하여 강제 경구투여하였다. 본 실험에 사용한 CLA 투여용량은 이전에 확실한 항비만 및 항당뇨 효과를 나타내는 것으로 알려진 750mg/kg⁶⁾을 선정하였으며, 六味地黃湯加味方은 이전의 동물실험에서 비교적 우수한 효과를 나타내는 것으로 알려진 50mg/kg을 중간 용량으로 설정하고⁷⁾, 공비 2로 100mg/kg을 최고 투여 용량으로, 25mg/kg을 저용량 투여군으로 각각 설정하였다.

Experimental design used in this study		
Groups	Animals (mice)	Dose (mg/kg/day)
Control	Normal C57BL/6J Mice	Distilled water 10ml/kg
	Obese C57BL/6JHam-ob/ob	Distilled water 10ml/kg
Reference	Obese C57BL/6JHam-ob/ob	CLA 750mg/kg
	Obese C57BL/6JHam-ob/ob	YGB 25mg/kg
Active	Obese C57BL/6JHam-ob/ob	YGB 50mg/kg
	Obese C57BL/6JHam-ob/ob	YGB 100mg/kg

3) 체중 측정

모든 실험동물의 체중을 투여시작 1일 전, 투여 시작일, 투여시작 후 1, 7, 14, 21, 27일 및 최종 희생일에 각각 automatic electronic balance (Precisa Instrument, Switzerland)를 이용하여 측정하였으며, 사료 섭취에 따른 체중 변화를 최소화하기 위해 투여 시작일 및 최종 희생일에 모든 실험동물은 18시간 정도 절식시켰고, 실험 시작시의 개체 차이에 의한 체중 변화를 최소화하기 위해 아래의 공식을 이용하여 약물 투여 후 4주간의 체중 변화량인 증체량 (body weight gains)을 각각 측정하였다.

Body weight gains(g)

Test article-treatment periods

= Body weight at 28 days after initiation of test article treatment

- body weight at first test article treatment

4) 사료 섭취량의 측정

사료 섭취량 측정일에 모든 실험동물은 개별 metabolic cage에 수용하고 150g의 사료를 각각 공급한 다음, 24시간 후 사료 잔량을 automatic electronic balance (Precisa Instrument, Switzerland)를 이용하여 측정하고, 아래의 공식을 이용하여 개체별 1일 사료 섭취량 (Mean daily food consumption; g/day/mouse)을 산출하였다. 사료섭취량은 각각 투여시작 후 1, 7, 14, 21, 25 및 27일에 측정하였다.

Mean daily food consumption (g/day/mice)

= {Amounts of supplied diets (150g)

- Amounts of remainder supplied diets after 24hrs}

5) 혈당의 측정

투여 28일 후, 최종 희생일에 모든 실험동물을 18시간 이상 절식시킨 다음 복대정맥에서 NaF glucose vacuum tube (Becton Dickinson, USA)에 약 0.3ml의 혈액을 채취한 다음 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 이후 자동혈액분석장치 (Toshiba 200 FR, Japan)를 이용하여 혈당을 각각 측정하였다.

6) 혈중 insulin 함량의 측정

투여 28일 후, 최종 희생일에 모든 실험동물을 18시간 이상 절식시킨 다음 복대정맥에서 heparin pretreated vacuum tube (Becton Dickinson, USA)에 약 0.3 ml의 혈액을 채취한 다음 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 이후 혈중 insulin 함량은 이전의 방법에 따라⁸⁾, enzyme-linked immuno sorbent assay kit (ELISA, Boehringer, Germany)를 이용하여 측정하였다.

7) 혈중 leptin 및 adiponectin 함량의 측정

준비된 혈청에서 이전의 Sahai et al. 의 방법에 따라⁹⁾ leptin ELISA kit (Linco Research, USA) 및 adiponectin ELISA kit (Otsuka Pharm., Japan)를 사용하여 혈청 중 leptin 및 adiponectin 함량을 각각 측정하였다.

8) 조직병리학적 관찰

최종 희생일에 장기 증량 측정 후 췌장(비장엽), 10% 중성포르말린에 18시간 이상 고정시킨 후 탈수를 거쳐 파라핀 포매 후 4μm의 절편을 제작하였다. 이후 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하고 광학 현미경 하에서 관찰하였다. 좀더 명확한 조직병리학적 변화를 관찰하기 위해, 이전의 대사 증후군 마우스¹⁰⁾ 또는 당뇨 랫트¹¹⁾에서의 방법에 준하여 췌장섬의 수 및 췌장섬이 차지하는 비율의 변화를 하기의 histomorphometry 방법을 이용하여 각각 평가하였다.

췌장섬의 수 (pancreatic islet numbers) : 단위 면적 당 (10 mm²) 췌장실질 조직내에 존재하는 평균 췌장섬의 수를 자동영상분석장치를 이용하여, numbers/10 mm² of pancreatic parenchyma 단위로 각각 측정하였다.

췌장섬이 차지하는 비율 (percentages of pancreatic islet occupied regions) : 단위 면적 당 (10mm²) 췌장 실질조직 내에서 췌장섬이 차지하는 비율의 변화를 자동영상분석장치를 이용하여, %/10 mm² of pancreatic parenchyma 단위로 각각 측정하였다.

3. 통계처리

모든 수치는 평균±표준편차로 표시하였으며, 다중 비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다²⁾. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences (LSD) test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U (MW) test를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value 가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다³⁾.

Ⅲ. 결 과

1. 비만에 미치는 영향

1) 체중의 변화

실험 시작시부터 정상 대조군에 비해 모든 ob/ob 마우스 실험군에서 유의성 있게 (p<0.01) 현저한 체

중의 증가를 보였으며, 28일의 투여기간 중 증체량 역시 정상 C57BL/6JJms 마우스 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) ob/ob 대조군에서 증가되었다. 한편 체중감소에 있어서는 CLA 투여군은 7일째, YGB 25 투여군은 21일째, YGB 50 투여군은 14일째, 그리고 YGB 100 투여군은 7일째부터 ob/ob 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 체중이 감소되기 시작하였으며, 28일간의 증체량 역시 ob/ob 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 감소를 각각 나타내었다 (Table 1).

2) 사료 섭취량의 변화

정상 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 모든 ob/ob 마우스 실험군에서 사료 섭취량이 증가되었으나, 투여 14일부터 CLA, YGB 50 및 100mg/kg 투여군에서 ob/ob 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01 또는 p<0.05) 사료 섭취량이 감소되었고, YGB 25mg/kg 투여군에서도 투여 21일 후부터 ob/ob 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01 또는 p<0.05) 사료 섭취량이 감소되기 시작하였다 (Table 2).

3) 혈중 leptin 함량의 변화

Ob/ob 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 혈중 leptin 함량이 감소되었고, 모든 YGB 투여군에서는 ob/ob 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 혈중 leptin 함량이 증가되었으나, CLA 투여군에서는 ob/ob 대조군과 유사한 혈중 leptin 함량의 변화가 있었다 (Figure 1).

Table 1. Changes on The Body Weight Gains in Intact or ob/ob Mice

Groups	Body weights (g)		Body weight gains [B] - [A]
	At initial administration [A]	At sacrifice [B]	
Controls			
Intact	22.04±1.32	24.42±0.93	2.38±0.59
ob/ob	43.34±1.48 ^a	53.84±1.42 ^a	10.50±0.36 ^c
CLA	43.30±1.08 ^a	41.10±1.64 ^{ab}	-2.20±2.19 ^{cd}
YGB treated			
25mg/kg	43.10±1.62 ^a	49.08±2.05 ^a	5.98±1.96 ^{cd}
50mg/kg	43.18±1.52 ^a	43.72±2.92 ^{ac}	0.54±2.08 ^d
100mg/kg	42.88±1.89 ^a	41.74±2.35 ^{bc}	-1.14±3.22 ^d

Table 2. Changes on The Mean Daily Food Consumptions in Intact or ob/ob Mice

Groups	Mean daily food consumptions measured at the day after first administration					
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 25	Day 27
Controls						
Intact	5.06±0.63	4.84±0.57	4.84±0.39	4.66±0.34	4.72±0.41	4.94±0.38
ob/ob	7.44±0.51 ^a	6.76±0.56 ^a	6.94±0.51 ^a	6.90±0.39 ^a	7.14±0.29 ^a	6.96±0.34 ^a
CLA	7.46±0.27 ^a	6.74±0.29 ^a	5.04±0.23 ^c	4.96±0.78 ^c	4.78±0.86 ^c	4.50±0.52 ^c
YGB treated						
25mg/kg	7.46±0.42 ^a	6.78±0.50 ^a	6.62±0.28 ^a	6.16±0.67 ^{ad}	5.84±0.62 ^{ac}	5.62±0.66 ^{bc}
50mg/kg	7.36±0.30 ^a	6.68±0.42 ^a	5.26±0.47 ^c	4.76±0.38 ^c	4.96±0.29 ^c	4.64±0.38 ^c
100mg/kg	7.48±0.35 ^a	6.68±0.45 ^a	5.24±0.73 ^c	4.54±0.48 ^c	4.38±0.50 ^c	4.28±0.31 ^{bc}

Values are expressed as Mean ± SD of five mice, g/day/mouse

YGB: *Yookmijihwang-tang-gamibang* aqueous extracts

CLA: conjugated linoleic acid, reference, 750mg/kg

^a p<0.01 and ^b p<0.05 as compared with intact control by LSD test

^c p<0.01 and ^d p<0.05 as compared with ob/ob control by LSD test

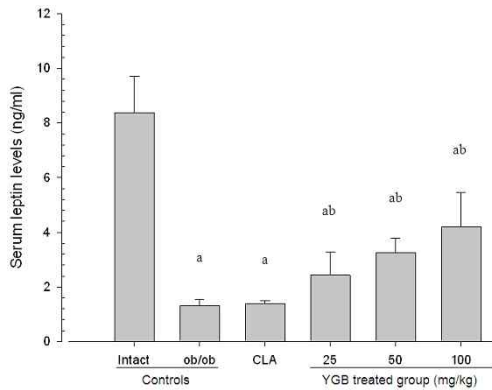


Figure 1. Changes on the serum leptin contents in intact or ob/ob mice

Note that significant decreases of serum leptin levels were detected in ob/ob control as compared with intact control. However, significant (p<0.01) increases of serum leptin contents were detected in all three different dosages of YGB treated mice as compared with ob/ob control, respectively. Anyway quite similar serum leptin levels were detected in CLA treated mice as compared with ob/ob control in this study.

Values are expressed as Mean ± SD of five mice

YGB: *Yookmijihwang-tang-gamibang* aqueous extracts

CLA: conjugated linoleic acid, reference, 750mg/kg

^a p<0.01 as compared with intact control by MW test

^b p<0.01 as compared with ob/ob control by MW test

4) 혈중 adiponectin 함량의 변화

Ob/ob 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 혈중 adiponectin 함량이 감소되었으나,

모든 YGB 투여군에서는 ob/ob 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01 또는 p<0.05) 혈중 adiponectin 함량이 투여 용량 의존적으로 증가되었다. 한편 CLA 투여군에서는 ob/ob 대조군과 유사한 혈중 adiponectin 함량의 변화를 나타내었다 (Figure 2).

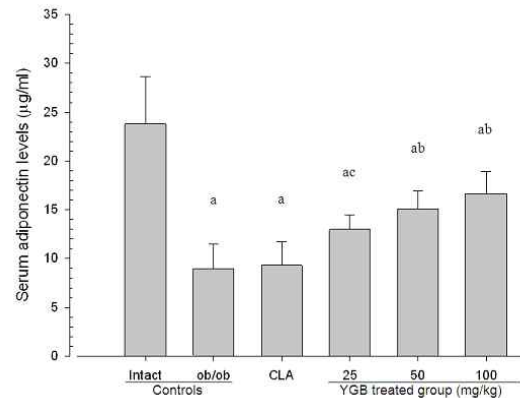


Figure 2. Changes on the serum adiponectin contents in intact or ob/ob mice

Note that significant decreases of serum adiponectin levels were detected in ob/ob control as compared with intact control. However, the serum adiponectin levels were significantly increased in all three different dosages of YGB treated groups as compared with ob/ob control, respectively. In CLA treated mice, similar serum adiponectin levels as ob/ob control mice were observed in the present study.

Values are expressed as Mean ± SD of five mice

YGB: *Yookmijihwang-tang-gamibang* aqueous extracts

CLA: conjugated linoleic acid, reference, 750mg/kg

^a p<0.01 as compared with intact control by LSD test

^b p<0.01 and ^c p<0.05 as compared with ob/ob control by LSD test

2. 항당뇨 효과

1) 혈당의 변화

Ob/ob 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 혈당이 증가되었으나, 모든 투여군에서는 ob/ob 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 혈당이 감소되었고, 특히 YGB 투여군에서는 투여 용량 의존적인 혈당강하 효과가 있었다 (Table 3).

2) 혈중 insulin 함량의 변화

Ob/ob 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 혈중 insulin 함량이 증가되었으나, 모든 투여군에서는 ob/ob 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 혈중 insulin 함량이 감소되었다 (Figure 3).

3) 췌장섬의 조직병리학적 변화

Ob/ob 대조군의 경우, 정상 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 췌장섬의 수 및 전체 췌장에 대한 췌장섬의 비율이 증가되었으나, CLA 및 모든 세 용량의 YGB 투여군에서는 ob/ob 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 췌장섬의 수 및 비율이 감소되었다 (Figure 4).

Table 3. Changes on The Serum Glucose Level in Intact or ob/ob Mice

Groups	Serum biochemistry
	Glucose (mg/dl)
Controls	
Intact	114.00±12.14
ob/ob	615.20±28.86 ^a
CLA	403.40±18.50 ^{ab}
YGB treated	
25mg/kg	496.20±52.94 ^{ab}
50mg/kg	412.20±54.33 ^{ab}
100mg/kg	358.60±44.71 ^{ab}

Values are expressed as Mean ± SD of five mice
YGB: *Yookmijihwang-tang-gamibang* aqueous extracts
CLA: conjugated linoleic acid, reference, 750mg/kg
^a $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test
^b $p < 0.01$ as compared with ob/ob control by LSD test

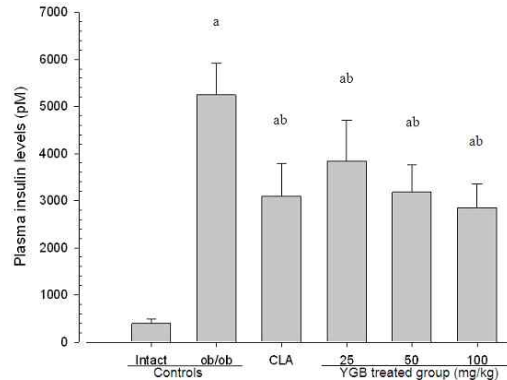


Figure 3. Changes on the plasma insulin levels in intact or ob/ob mice

Note that significant increases of plasma insulin levels were detected in ob/ob control as compared with intact control. However, these increases of plasma insulin levels were significantly inhibited by treatment of CLA, YGB 25, 50 and 100mg/kg as compared with ob/ob control, respectively. Values are expressed as Mean ± SD of five mice
YGB: *Yookmijihwang-tang-gamibang* aqueous extracts
CLA: conjugated linoleic acid, reference, 750mg/kg
^a $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test
^b $p < 0.01$ as compared with ob/ob control by LSD test

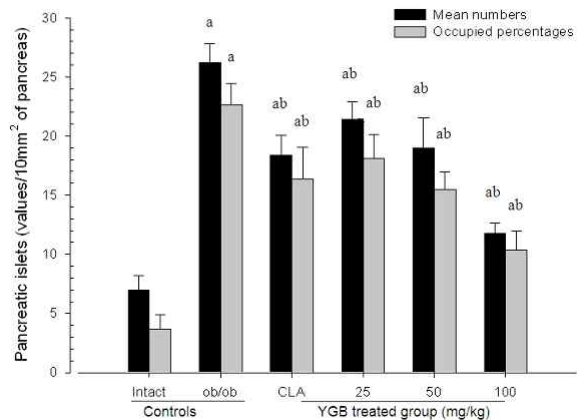


Figure 4. Changes on the pancreatic islet numbers and occupied regions percentage in intact or ob/ob mice

Note that significant increases of pancreatic islet numbers and percentages of islet occupied regions were detected in ob/ob control as compared with intact control, results from marked hyperplasia of pancreatic islet itself or component endocrine cells, respectively. However, these hyperplasia and expansion of islets were significantly reduced by treatment of CLA and all three different dosages of YGB as compared with ob/ob control, respectively. Values are expressed as Mean ± SD of five mice
YGB: *Yookmijihwang-tang-gamibang* aqueous extracts
CLA: conjugated linoleic acid, reference, 750mg/kg
^a $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test
^b $p < 0.01$ as compared with ob/ob control by LSD test

IV. 고 찰

당뇨병은 인슐린의 결핍이나 작용저하에 기인한 고혈당 및 이에 수반되는 대사장애를 특징으로 하는 질환군으로서 아직까지 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다¹⁾. 당뇨병은 제1형 당뇨병과 제2형 당뇨병으로 구분되는데, 그 중 제2형 당뇨병은 간의 포도당 생산 조절 결손과 낮은 베타세포 기능, 말초 인슐린 저항성이라는 특징이 있으며, 과도한 체중은 인슐린 저항성을 증가시켜 제2형 당뇨병의 위험을 증가시킨다²⁾.

비만이란 체내의 지방이 건강을 해칠 정도로 과잉 축적되어 대사장애를 유발하는 병리적인 상태를 의미하는데, 이는 심혈관계 질환, 고혈압 및 제2형 당뇨병과 같은 치명적인 질환의 주요 유발 원인으로 알려져 있다³⁾. 최근 들어, 고열량 식품의 섭취 증가와 함께 운동 부족으로 인해 제2형 당뇨로 알려져 있는 대사 증후군성 비만이 급증하고 있는 실정이다⁴⁾.

六味地黃湯加味方은 六味地黃湯과 黃連解毒湯에 葛根, 天花粉, 地骨皮, 麥門冬, 五味子, 知母 및 龜板을 가미한 총 17종의 약재로 구성된 처방이다. 六味地黃湯은 宋代 錢乙의 小兒藥證直訣에 收錄된 처방으로서, 金匱要略의 八味地黃丸에서 肉桂와 附子를 제외한 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 澤瀉, 牡丹皮, 茯苓의 6종 약재로 구성되어 滋陰補血의 효능을 지니고 있으며, 黃連解毒湯은 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子의 4가지 약재로 구성된 清熱瀉火解毒의 基本方으로서, 抗菌, 消炎, 鎮痛, 解熱, 鎮靜, 止血, 抗潰瘍, 止瀉作用 및 항바이러스 작용 등의 광범위한 작용이 있어 인플루엔자, 뇌염, 패혈증, 뇌막염 등의 急性感染症과 피부의 화농증, 급성출혈증, 급성위장염, 細菌性下痢 등에 사용되어 왔다¹⁴⁾.

ob/ob 마우스는 식욕과 에너지 대사를 조절하는 단백질인 leptin을 생산하는 유전자가 결핍된 실험동물로써, 多食, 肥滿 및 인슐린 저항성을 나타내므로 현재 비만 및 제2형 당뇨 실험동물로 널리 사용되고 있다¹⁵⁾.

CLA는 linoleic acid의 이성질체 그룹으로 현재 항암, antiatherogenic 및 면역조절 효과와 함께 항비만 및 항당뇨 효과가 잘 알려져 있다¹⁶⁾. 또한 CLA는

지방세포의 분화시 지질의 축적을 현저히 감소시키며, 지질의 저장 및 대사를 활성화시키는 결정적인 핵 수용체인 PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾.

본 연구에서는 六味地黃湯加味方의 비만으로 유발된 제2형 당뇨 및 당뇨 합병증에 대한 효과를 비만 당뇨 ob/ob 마우스를 이용하여 평가하기 위해, YGB 25, 50 및 100mg/kg을 각각 28일간 ob/ob 마우스에 경구 투여하고, 혈당강하 및 항당뇨 효과는 혈당, 췌장 내 분비부의 조직병리학적 변화를 기초로 평가하였고, 항비만 효과는 사료 섭취량, 체중, 혈중 leptin 및 adiponectin 함량을 기초로 하여 각각 평가하였으며, 실험결과는 확실한 항비만 및 항당뇨효과를 나타내는 것으로 알려진 CLA 750mg/kg 투여군과 비교하였다⁶⁾.

본 실험의 결과, ob/ob 마우스는 이전의 보고들과 동일하게¹⁸⁾, 현저한 비만과 관련된 당뇨 소견을 나타내었으며, ob/ob 마우스의 비만 및 당뇨 소견이 세 용량의 YGB 25, 50 및 100mg/kg 투여에 의해 현저히 억제되었다.

체중의 변화는 대사성 질환에 효과가 있는 활성 물질의 탐색에 있어 가장 기본적인 지표로 사용되어 왔는데, 본 실험에 사용한 ob/ob 마우스 역시 입수시인 5주령 때부터 현저한 체중의 증가를 나타낸 상태였으나, CLA 투여군은 28일간의 증체량이 ob/ob 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소를 각각 나타내었다. 따라서 六味地黃湯加味方은 제2형 당뇨와 연관된 체중 증가 억제에 매우 유효한 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

지방조직은 단순 에너지 저장소로서의 역할 뿐만 아니라 내분비와 외분비를 동시에 수행하면서 adipokine을 분비하는 것으로 알려져 있고, adipokine의 분비 변화는 비만과 인슐린 저항성과 같은 복합적인 질병을 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 이 중 leptin은 주로 지방세포에 의해 분비되는 adipokine의 일종으로 식욕 억제의 역할을 하는 것으로 알려져 있고, adiponectin 역시 비교적 근래에 밝혀진 adipokine의 일종으로 주로 지방조직에 존재하며, 혈중으로 유리되고 사람과 동물에서 비만시 현저히 감소되며, 인슐린 내성 및 비만과 직결되어 있는 것으로 알려져 있다.

본 실험의 결과, 六味地黃湯加味方은 CLA와 유사하게 leptin 유전자 변이 동물 모델인 ob/ob 마우스의 지방축적 및 지방세포 비대를 유의하게 억제하였으나, 혈중 leptin 및 adiponectin 함량에 별 다른 영향을 미치지 않은 CLA와는 달리, 혈중 leptin 및 adiponectin 함량 역시 六味地黃湯加味方 투여에 의해 투여 용량 의존적으로 증가되었다.

한편 六味地黃湯加味方 자체 및 본 방을 구성하고 있는 六味地黃湯과 黃連解毒湯의 항비만 효과는 알려져 있지 않으나, 구성 약재 중 葛根²⁰⁾, 山茱萸²¹⁾, 茯苓²²⁾, 牡丹皮²³⁾, 澤瀉²⁴⁾ 및 黃芩²⁵⁾의 항비만 효과가 잘 알려져 있다. 본 실험의 결과, YGB 50mg/kg은 750mg/kg의 CLA 투여군과 유사한 항비만 효과를 ob/ob 마우스에서 나타내었다.

혈당의 증가는 당뇨병의 가장 기본적인 현상으로, 본 실험에 사용한 ob/ob 마우스 역시 전형적인 고혈당 소견을 나타내었다. 한편 28일간의 연속 CLA 또는 YGB 투여에 의해 혈당의 증가가 유의성 있게 감소되어, 이들 CLA 및 六味地黃湯加味方이 당뇨병 치료에 매우 효과적인 것으로 판단된다. 또한 제2형 당뇨병이 진행됨에 따라 인슐린 저항의 일환으로 췌장섬의 증생이 초래되고, 증가된 혈당을 조절하기 위해 보다 많은 인슐린 분비가 요구되어 결과적으로 인슐린 생산 세포의 증생이 수반되며, 이를 조절하기 위해 glucagon 생산세포 역시 거의 유사한 비율로 증가된다²⁶⁾. 본 실험의 결과에서도, 정상 대조군에 비해 현저한 췌장섬의 증생과 이와 관련된 단위 면적당 insulin 및 glucagon 면역반응세포의 수적 증가가 ob/ob 대조군에서 인정되었으나, 이러한 췌장 내분비부의 변화가 CLA 및 YGB 투여에 의해 각각 현저히 억제되었다.

한편 六味地黃湯의 항당뇨 효능⁷⁾과 함께 六味地黃湯加味方의 제1형 당뇨병에 대한 치료 효과 및 임상 증례가 보고되어 있으며, 六味地黃湯加味方의 구성 약재 중 熟地黃²⁷⁾, 葛根²⁸⁾, 天花粉²⁹⁾, 茯苓³⁰⁾, 澤瀉³¹⁾, 麥門冬³²⁾ 및 黃柏³³⁾의 항당뇨 효과가 비교적 잘 알려져 있다. 본 실험의 결과, YGB 50mg/kg은 CLA 750mg/kg 투여군과 유사한 항당뇨 효과를 ob/ob 마우스에서 나타내었다.

정상 대조군에 비해 모든 ob/ob 마우스에서 현저하게 사료섭취량이 증가되었으나, CLA 투여군에서는

이전의 보고⁶⁾와 유사하게 ob/ob 대조군에 비해 현저하게 사료섭취량이 감소되었고, 세 용량의 모든 YGB 투여군에서도 ob/ob 대조군에 비해 현저한 사료 섭취량의 감소를 나타내어, CLA와 YGB는 모두 사료섭취량을 감소시켜 항비만 및 항당뇨 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

하지만 최근의 연구에 따르면, 당뇨 및 당뇨병성 신병증의 유발에 free radical에 의한 항산화 방어기전의 변화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, oxidative stress가 여러 가지 당뇨 합병증의 유발에 관여한다고 알려져 있다³⁴⁾. 특히, 항산화 효과의 억제와 함께 oxidative stress의 증가는 당뇨병성 더 많은 free radical을 형성하고, 이렇게 형성된 free radical들은 당뇨 합병증의 원인이 되고 있으며, 六味地黃湯 자체의 항산화 효과 및 모든 六味地黃湯加味方 구성 약재들의 항산화 효과가 이미 잘 알려져 있어, 항산화제를 통한 항비만 및 항당뇨 효과의 가능성 역시 존재하며, 六味地黃湯加味方은 熟地黃, 葛根, 天花粉, 地骨皮, 山藥, 山茱萸, 白茯苓, 牡丹皮, 澤瀉, 麥門冬, 五味子, 梔子, 黃芩, 黃蓮, 黃柏, 知母 및 龜板 17종의 약재로 구성되어 있으며, 각각 수 많은 생리활성 물질을 함유하고 있어³⁵⁾, 금후 개별 구성 약제 각각에 대한 효능 및 생리활성을 나타내는 화학성분의 검색과 더불어 금후 다양한 방면으로 기전적인 연구를 더 수행해야 할 것으로 판단된다.

이상의 결과에서 25mg/kg 이상의 六味地黃湯加味方은 leptin 및 adiponectin과 같은 adipokine의 조절을 통한 식욕 조절로 비만 제2형 당뇨 마우스인 ob/ob 마우스에 매우 유효한 효과를 나타내는 것으로 관찰되었으며, 특히 YGB 100mg/kg은 CLA 750mg/kg 투여군보다 체중 감소에 대한 효과는 비교적 낮았으나 CLA 750mg/kg 투여군보다 더 우수한 혈당강하, 및 항비만 효과를 각각 나타내었고, YGB 50mg/kg 투여군에서는 전체적으로 CLA 750mg/kg 투여군과 유사한 항당뇨 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

V. 결 론



본 연구에서는 六味地黃湯에 黃連解毒湯을 합하고, 葛根, 天花粉, 地骨皮, 麥門冬, 五味子, 知母 및 龜板을 가미하여 총 17가지 약재로 구성된 六味地黃湯加味方的 비만으로 유발된 제2형 당뇨 및 당뇨 합병증에 대한 효과를 비만 당뇨 ob/ob 마우스를 이용하여 평가하였다.

1. YGB 25, 50 및 100mg/kg 투여군에서 모두 ob/ob 대조군에 비하여 유의성 있게 체중이 감소되었다.

2. YGB 25, 50 및 100mg/kg 투여군에서 모두 ob/ob 대조군에 비하여 유의성 있게 항당뇨 효과를 나타내었다.

이상의 결과에서 25mg/kg 이상의 六味地黃湯加味方은 항비만 및 항당뇨 효과가 우수하며, 50mg/kg의 六味地黃湯加味方은 CLA 750mg/kg 투여군과 대체로 유사한 효과를, 그리고 100mg/kg의 六味地黃湯加味方은 CLA 750mg/kg 투여군보다 체중 감소에 대한 효과는 비교적 낮으나, 항비만 및 혈당강하 효과는 더 우수한 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Du HG. Korean Medical Nephrology. Seoul:Korean Medical Research, 1993:1173-8.
2. Doctor's Association of Obesity Research, Handbook of Obesity Treatment. Seoul:Medbook, 2005:1-13.
3. Korean Society for the Study of Obesity. Clinical Obesity. Seoul:Korea Medical Book, 1995:184-9
4. James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The worldwide obesity epidemic. *Obes Res*. 2001;9:228S-233S.
5. Inzucchi SE. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes:scientific review. *JAMA*. 2002;287(3):360-72.
6. Hue JJ, Lee KN, Jeong JH, Lee SH, Lee YH, Jeong SW, Nam SY, Yun YW, Lee BJ. Anti-obesity activity of diglyceride containing conjugated linoleic acid in C57BL/6J ob/ob mice. *J Vet Sci*. 2009;10(3):189-95.

7. Seo SH, Kim YS. The effect of Yookmijihwang-tang(YJT) on mice with diabetic nephropathy induced by alloxan. *Journal of the Society of Korean Oriental Internal Medicine*. 2005;26(4):741-52.
8. Kim JD, Kang SM, Park MY, Jung TY, Choi HY, Ku SK. Ameliorative anti-diabetic activity of dangnyosoko, a Chinese herbal medicine, in diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007;71(6):1527-34.
9. Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF. Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis:role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(5):G1035-43.
10. Jung YM, Lee SH, Lee DS, You MJ, Chung IK, Cheon WH, Kwon YS, Lee YJ, Ku SK. Fermented garlic protects diabetic, obese mice when fed a high-fat diet by antioxidant effects. *Nutr Res*. 2011;31:387-96.
11. Kim JD, Kang SM, Seo BI, Choi HY, Choi HS, Ku SK. Anti-diabetic activity of SMK001, a poly herbal formula in streptozotocin induced diabetic rats: therapeutic study. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(3):477-82.
12. Levene A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. Part I. *Clin Otolaryng*. 1981;6(2):145-51.
13. Ludbrook J. Update:microcomputer statistics packages. A personal view. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24(3-4):294-6.
14. Han JH. Pharmacology of Korean Medicine. Seoul:Euisungdang. 2004:187-90.
15. Kurundkar SB, Sachan N, Kodam KM, Kulkarni VM, Bodhankar SL, Ghole VS. Effect of a novel biphenyl compound, VMNS2e on ob/ob mice. *Eur J Pharmacol*. 2011;650(1):472-8.
16. Parodi PW. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J Nutr*. 1997;127(6):1055-60.
17. Granlund L, Pedersen JI, Nebb HI. Impaired lipid accumulation by trans10, cis12 CLA during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1687(1-3):11-22.

18. Kang SB. Comparison study of the transformations of Sogal and chronic complications of diabetes mellitus, *Journal of Society of Korean Medicine*, 1998;19(2) :137-52.
19. Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction*, 2005;130(5):583-97.
20. Xu ME, Xiao SZ, Sun YH, Zheng XX, Ou-Yang Y, Guan C. The study of anti-metabolic syndrome effect of puerarin in vitro. *Life Sci*, 2005;77(25): 3183-96.
21. Shin JH, Cha GY, Kim HJ, Hwang JH, Han GH, Seo HJ, Shin TS, Oh SJ, Kim JD. Anti-cell adhesion effect of animal cell with regional special natural products of *Anthriscus radix*, *Psoraleae semen*, *Siegesbeckiae herba* and *Corni fructus*. *KSBB Journal*, 2009;24(6):549-55.
22. Yun HJ, Cha HM, Kim SW, Shin WC, Kim HG, Choi SY. Effects of the extract of Hoelen on serum lipid profiles in mice. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2006;35(8):1005-9.
23. Nagasawa H, Iwabuchi T, Inatomi H. Protection by tree-peony (*Paeonia suffruticosa* Andr) of obesity in (SLN x C3H/He) F1 obese mice. *In Vivo*, 1991;5(2) :115-8.
24. Kim WI, Yun DH, Kim HG, Na CS. Effects of pear extracts containing herbal medicine (*Lycii Fructus*, *Coicis Semen*, *Alimatis Rhizoma*, and *Astragali Radix*) on body weight, lipid metabolism, and immune responses of rats fed with high fat diets (I). *J Korean Herbology*, 2012;27(3):7-13.
25. Yang SY, Lee HY, Lee HR, Kim BC, Park SI, Ahn YJ, Oh JH, Lim HS, Yun MJ, Shin SS. Injecheong-geumdan(ICD) reduces body weight gain and blood lipid profiles in high fat diet-fed mice. *J Korean medicine prescription*, 2012;20(1):67-80.
26. Han GC, Ko SK, Sung JH, Chung SH. Compound K enhances insulin secretion with beneficial metabolic effects in db/db mice. *J Agric Food Chem*, 2007;55 (26):10641-8.
27. Shieh JP, Cheng KC, Chung HH, Kerh YF, Yeh CH, Cheng JT. Plasma glucose lowering mechanisms of catalpol, an active principle from roots of *Rehmannia glutinosa*, in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Agric Food Chem*, 2011;59(8):3747 -53.
28. Lee KT, Sohn IC, Kim DH, Choi JW, Kwon SH, Park HJ. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of tectorigenin and kaikasaponin III in the streptozotocin-induced diabetic rat and their antioxidant activity in vitro. *Arch Pharm Res*, 2000;23(5):461-6.
29. Hikino H, Yoshizawa M, Suzuki Y, Oshima Y, Konno C. Isolation and hypoglycemic activity of trichosans A, B, C, D, and E: glycans of *Trichosanthes kirilowii* roots. *Planta Med*, 1989;55(4):349-50.
30. Sato M, Tai T, Nunoura Y, Yajima Y, Kawashima S, Tanaka K. Dehydrotrametenolic acid induces preadipocyte differentiation and sensitizes animal models of noninsulin-dependent diabetes mellitus to insulin. *Biol Pharm Bull*, 2002;25(1):81-6.
31. Nam JW, Lee SH, Kang MS, Choi YG, Jeon CY, Park JH, Kim DW. Effects of different lengths of treatment with rhizoma *alismatis* on diabetic mellitus of streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *J Oriental Internal Med*, 2006;27(4):791-7.
32. Lee YK, Kim JE, Nam SH, Goo JS, Choi SI, Choi YH, Bae CJ, Woo JM, Cho JS, Hwang DY. Differential regulation of the biosynthesis of glucose transporters by the PI3-K and MAPK pathways of insulin signaling by treatment with novel compounds from *Liriope platyphylla*. *Int J Mol Med*, 2011;27(3):319-27.
33. Steinmann D, Baumgartner RR, Heiss EH, Bartenstein S, Atanasov AG, Dirsch VM, Ganzera M, Stuppner H. Bioguided isolation of (9Z)-octadec-9-enoic acid from *Phellodendron amurense* Rupr. and identification of fatty acids as PTP1B inhibitors. *Planta Med*, 2012;78(3):219-24.
34. Collier A, Wilson R, Bradley H, Thomson JA, Small M. Free radical activity in type 2 diabetes. *Diabet Med*, 1990;7(1):27-30.
35. Herbalogy compilation committee of Korean medicine. *Herbalogy*. Seoul:Younggrimsa, 2007:659-61.