

## 木香이 고지방 식이에 의한 비만으로 유발된 인슐린 저항성 mouse의 염증 및 인슐린 저항성에 미치는 영향

오재선, 마영훈, 최승범, 김종호, 김경국, 전상윤  
동신대학교 한의과대학 내과학교실

### Effects of *Inula helenium* on Inflammation and Insulin Resistance in Obesity-induced Insulin Resistance Mouse by High Fat Diet

Jae-seon Oh, Young-hun Ma, Seung-bum Choi, Jong-ho Kim, Kyung-kook Kim, Sang-yun Jeon  
Dept. of Internal medicine, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

#### ABSTRACT

**Objectives:** Obesity is an important cause of insulin resistance that leads to obese type 2 diabetes. Recently it has been found that obesity is associated with adipose tissue accumulation which causes systemic inflammation. In this study, we investigated effects of *Inula helenium* on the inflammation in high fat diet-induced insulin resistance mouse.

**Methods:** Insulin resistance was induced in C57BL/6 male mice (19~21 g) on a 60% fat diet. Mice were divided into 3 groups (n=6) of normal, control and *Inula helenium*. After 12 weeks, body weight, FBS, oral glucose tolerance test (OGTT), serum level of insulin, epididymal fat pad, liver weight and the gene expression of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, interleukin (IL)-10 and cluster of differentiation (CD) 68 were measured. Also, adipose tissue macrophage was analyzed by fluorescence activated cell sorting.

**Results:** *Inula helenium* significantly reduces oral glucose tolerance levels, insulin serum level and adipose tissue macrophage. Also *Inula helenium* increased IL-10 gene expression and decreased CD68 gene expression.

**Conclusions:** These results show that *Inula helenium* has anti-insulin resistance and anti-inflammatory effects on a high fat diet-induced insulin resistance mouse model.

**Key words:** *Inula helenium*, obesity, insulin resistance, type 2 diabetes, adipose tissue inflammation

## 1. 서론

제 2형 당뇨병은 인슐린 분비이상, 말초 인슐린 저항, 간에서의 과도한 포도당 생산의 특징적인 병

태생리를 갖는 질환으로, 장기나 중심부 비만이 흔히 보인다<sup>1</sup>.

비만은 지방이 체내에 과잉으로 축적된 경우로 제 2형 당뇨병, 심혈관계 질환, 암과 같은 심각한 질병들을 일으키고 사망의 위험까지 높이는 중요한 건강위험 요인으로 작용한다. 비만은 내당능이상, 고지혈증, 고혈압 등의 다른 심혈관계 위험인자를 동반하며, 그 결과 동맥경화성 질환의 발생을 조장하는데, 그 배경에는 인슐린 저항성이 관여한다<sup>2</sup>.

인슐린 저항성이란 주어진 인슐린 농도 하에서

· 교신저자: 전상윤 광주시 남구 월산로 141번지  
동신대학교 광주한방병원 한방내과  
TEL: 062-350-7207 FAX: 062-350-7551  
E-mail: damiano70@hanmail.net

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

인슐린에 대한 반응이 정상보다 감소되어 있는 상태를 지칭하는 것으로<sup>3</sup>, 비만은 인슐린에 의한 말초조직의 포도당 흡수를 저해함으로써 인슐린 저항성을 유발한다<sup>4</sup>. 인슐린 저항성이 있으면 처음에는 고인슐린 혈증이 발생하고 결국 제 2형 당뇨병으로 진행된다<sup>5</sup>.

만성 염증은 인슐린 저항성을 유발하는 원인 중 하나인데, 비만은 전신에 만성적인 염증 상태를 유발하여 여러 가지 cytokine의 생성을 증가시킨다<sup>2</sup>.

최근의 많은 연구들에 의해 지방조직은 leptin, tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ , interleukin(IL)-6, nonesterified fatty acids(NEFAs) 등의 물질을 분비함으로써 여러 가지 대사를 조절하는 내분비기관의 역할을 수행함이 밝혀졌다<sup>6</sup>.

비만의 정도와 비례하여 지방조직 내에 침착되는 macrophage의 양이 증가하는 것으로 밝혀졌는데 이것을 adipose tissue macrophage(ATM)라고 하며, ATM은 TNF- $\alpha$ , IL-6 등의 염증관련 물질의 분비량을 늘림으로써 염증 상태를 유발한다. 또한 ATM에 의해 유발된 염증 상태는 인슐린 저항성 유발에도 기여한다<sup>7</sup>.

消渴은 飮食, 情志, 房事나 기타 원인으로 多飲, 多食而瘦, 多尿而數 或混濁或尿恬 등의 증상이 나타나는 病證으로 갈증이나 체중감소를 주된 증상으로 갖는 당뇨병, 요붕증, 갑상선 기능 항진증 등을 포괄한다<sup>8</sup>. 『黃帝內經素問·奇病論篇』에서는 “此肥美之所發也, 此人必數食甘美而多肥也. 肥者, 令人內熱, 甘者, 令人中滿, 故其氣上溢, 轉爲消渴<sup>9</sup>.”이라 하여 消渴의 원인으로 비만을 제시했고, 이후에 朱<sup>10</sup>, 張<sup>11</sup>, 喻<sup>12</sup>도 消渴의 원인으로 비만과 식이를 언급하였다.

木香은 行氣止痛, 健脾消食 등의 효능이 있어 胸脘脹痛, 瀉痢後重, 食滯不消, 不思飲食 등의 병증을 치료하는 것으로 알려져 있다<sup>13</sup>. 현재까지 목향에 대한 연구에서 세포독성 효과<sup>14</sup>, 세포사멸 효과<sup>15</sup>, 항암 효과<sup>16</sup>, 항비만 효과<sup>17</sup>, 파골세포 분화<sup>18</sup>, 항염증 효과<sup>19</sup>와 관련된 보고는 있었으나, 아직까지 인슐린 저항

성 동물모델에서의 항염증 효과에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 고지방식으로 유발된 인슐린 저항성 동물모델에 木香 투여가 미치는 영향을 알아보고자 체중, 혈당, 인슐린 저항성, 항염증 효과 등을 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 검체 제조

총량 1,000 g씩의 木香(*Inula helenium*)을 각기 1,500 ml의 80% 에탄올에 넣고 heating mantle를 이용하여 2시간 동안 가열 추출하고 여과한 여액을 500 ml 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 건조한 뒤 동결 건조된 목향 추출물을 실온에서 보관하였다. 木香의 최종 수거율은 12.6%(126 g)였다.

### 2. 고지방 식이 유발 비만 동물 모델의 제작

19~21 g의 male C57BL/6 mouse(중앙실험동물, Korea)를 구매하여 12시간씩 낮과 밤이 교대되며, 20~24 °C의 온도와 40~70%의 습도가 유지되는 stainless-steel cage에서 1주일간 사육시켜 적응기를 거쳤다. 먹이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

그 후 정상군을 제외한 모든 실험군에 인슐린 저항성을 일으킨다고 알려진 60% fat diet(HFD, Research Diets, #D12492)를 12 주간 섭취시켜 비만을 유발하였다(Table 1).

Table 1. Composition of Experimental Diets

	Normal	Control	Inula
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		
Inula (g)			5
Total (g)	100.28	99.99	104.99

Normal : normal diet

Control : 60% fat diet

Inula : 60% fat diet with *Inula helenium*

### 3. 실험군 배정 및 연구 계획

실험군은 male C57BL/6 mouse 6마리씩 정상군(normal), 대조군(control), 木香 투여군(Inula)으로 나누어 진행하였다. 정상군을 제외한 나머지 2개 군들은 60% fat diet를 12주간 섭취시켜 비만형 제 2형 당뇨병을 유발하였다. 木香 투여군은 60% fat diet에 木香을 5%의 비율로 섞어 12주간 섭취하도록 하였다.

### 4. 체중 측정

체중은 실험 개시 일에 최초 측정 한 후 실험 종료일 마지막 sampling하기 전에 측정하였다. 체중 측정은 아침 사료 공급 전에 일괄적으로 전자저울(CAS 2.5D, Korea)을 사용하여 측정하였으며, 측정 시 mouse의 움직임에 따른 체중 오차를 최소화하기 위해 플라스틱 bowl에 mouse를 올려놓고, mouse가 안정 상태에 이르러 나타나는 체중을 기록하였다.

### 5. 공복 혈당 및 경구당부하 검사(Oral glucose tolerance test, OGTT) 측정

경구당부하 검사는 실험 11주째 12시간 이상 금식시킨 후 공복 혈당을 측정한 다음 glucose(2 g/kg body weight)를 distilled water에 녹여 경구 투여시킨 다음 30분 후, 60분 후, 90분 후, 120분 후 mouse의 tail vein에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 혈당은 strip-operated blood glucose sensor(ONETOUCH ultra, Inverness Medical ltd, UK) 기기를 이용하여 측정하였다.

### 6. 인슐린 저항성 측정

인슐린 저항성은 homeostasis model of assessment-insulin resistance(HOMA-IR)를 이용하여 측정하였다. 실험 시작 12주째에 12시간 이상 금식시킨 후 공복 혈당 및 인슐린을 측정하였고, HOMA-IR은 다음의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{HOMA-IR} = \text{공복 혈당(fasting blood glucose)} (\text{mg/dl}) \times \text{공복 인슐린(fasting blood insulin)} (\text{ng/dl}) \times 0.0717225161669606$$

### 7. 혈중 인슐린 농도 측정

고지방 식이 투여 12주째 실험쥐의 tail vein에서 혈액을 채취한 다음 4 °C에서 2,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 인슐린은 ultra sensitive mouse insulin ELISA kit(Crystal Chem inc, USA)을 이용하여 측정하였다. 96 well antibody-coated microplate에 insulin standards 및 샘플을 5 µl씩 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.

## 8. 부고환 지방 및 간 무게 측정

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

## 9. Stromal vascular cell(SVC)의 분리

지방조직은 male C57BL/6 mouse로부터 실험 시작 12 주째 mouse를 희생시킨 후 개복하여 부고환 지방 조직(epididymal fat pad)을 채취하였다. mouse로부터 채취한 지방조직은 phosphate buffered saline (PBS, Gibco, USA)에 2% bovine serum albumin (BSA, Gibco, USA)를 넣은 용액에 넣은 다음 round shape scissor를 이용하여 1~2 mm 크기의 작은 조각으로 분쇄하였다. 여기에 collagenase(Sigma, USA)와 DNase I(Roche, USA)을 넣어 37 °C에서 20분간 shake하여 조직이 분쇄되도록 하였다. 2% BSA/PBS에 5 mM EDTA를 넣은 용액을 각 tube에 넣고 섞은 다음 250 µm 필터로 분쇄되지 않은 지방조직을 걸러낸 다음 1,000 rpm으로 3분간 원심 분리하였다. 지방세포(adipocyte)가 포함된 上清液을 스포이드를 이용해 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 biosciences, USA)를 이용하여 불필요한 조직을 제거하고 200 ×g에서 10분 동안 원심 분리 하여 하부의 모아진 세포를 RBC lysis buffer (eBioscience, USA)에 10분 간 처리, 원심 분리 하여 SVC를 모은다.

## 10. 지방 조직에서의 RNA 분리

실험 시작 12주째 mouse를 희생시킨 후 개복하여 부고환 지방 조직(epididymal fat pad)을 분리하여 알루미늄 호일에 싸서 신속하게 액화질소에 담가 RNA 분리전까지 -70 °C에 보관하였다. 지방 조직에서의 RNA 분리는 mini RNA isolation II kit™(Zymo Research, USA)을 이용하였다. 보관된 지방 조직을 해동시켜 tube에 넣고 여기에 ZR RNA

buffer 300 µl씩을 분주한 다음 homogenizer를 이용하여 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직이 담긴 tube를 1,000 rpm에서 원심 분리한 후 상층액을 Zymo-Spin III Column에 옮겼다. 이를 2 ml collection tube에 꽂고 2,000 rpm으로 1분간 원심 분리하였다. Column에 RNA wash buffer 350 µl를 분주하고 1분간 원심 분리하여 2회 세척한 후 Column을 1.5 ml tube에 옮겨 꽂았다. 그 다음 RNA-free water 50 µl를 분주하여 1,000 rpm으로 원심 분리한 후 최종적으로 RNA를 수거하여 사용하기 전까지 -70 °C에 보관하였다.

## 11. Adipose tissue macrophage(ATM)에 대한 fluorescence activated cell sorting(FACS) 분석

지방조직에서 분리한 SVC를 cellometer(Nexcelom Bioscience llc, USA)를 이용하여 세포수를 측정한다. 다음 각 샘플당 106 cell 농도로 조정한다. Fc Block (BD Pharmingen, USA)(20 µg/ml)을 1:100의 비율로 넣고 10분간 반응시킨 다음 fluorophore-conjugated 된 antibodies인 CD45-APC Cy7(BD Pharmingen, USA), F4/80-APC(eBioscience, USA), CD11b-phycoerythrin (CD11b-PE, BD Biosciences, USA)를 넣고 차광 상태에서 20분간 반응시킨다. 2% FBS/PBS 용액으로 세척한 다음 FACS LSRII(BD biosciences, USA)를 이용하여 분석한다. 이후 FlowJo 프로그램(Tree star inc, USA)을 이용하여 CD45(+), CD11b(+), F4/80(+ )인 macrophage의 퍼센트를 분석한다.

## 12. 염증관련 유전자 발현 분석

지방 세포의 TNF-α, IL-6, IL-10 및 cluster of differentiation 68(CD68) 유전자의 발현 측정은 실시간 정량 역전사 연쇄중합반응(quantitative real time-polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 이용하여 측정하였다. qRT-PCR에 앞서 complementary DNA (cDNA)의 제작은 Advantage RT for PCR Kit (Clontech, USA)을 이용하였다. 지방 조직에서 분리한 1 µg의 RNA에 OligodT와 RNase-free H<sub>2</sub>O를

넣고 70 °C에서 2분간 반응시킨 다음 10 nM dNTP, recombinant RNase inhibitor, MMLV reverse transcriptase, 5× reaction buffer를 각각 넣고 42 °C에서 60분, 94 °C에서 5분씩 반응시켰다.

역전사를 통해 얻어진 각각의 cDNA에 2× SYBR reaction buffer, primers, dH<sub>2</sub>O를 혼합하여 7.900 HT fast real-time PCR System(Applied Biosystems®, USA)을 이용하여 연쇄중합반응을 시행하였다. 유전자 발현 분석은 SDS software 2.4(Applied Biosystems®, USA)를 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.

### 13. 통계 분석

통계학적 비교분석은 GraphPad PRISM statistical package(ver 2.00, Graphpad software inc, USA)로 이용하였고, 각 군 간의 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)에 이어 Tuckey's post-hoc test로 사후 검증하였다. 각각의 수치는 평균±표준오차(mean±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 체중은 대조군(38.89±1.24 g)이 정상군(26.07±0.59 g)보다 유의하게 높았다(P<0.001). 木香 투여군(38.67±1.17 g)은 대조군과 비교하여 유의한 차이는 없었다.

### 2. 당대사에 미치는 영향

실험 11주째에 시행한 공복 혈당은 대조군(113.29±1.96 mg/dl)이 정상군(75.86±5.28 mg/dl)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(99.00±5.28 mg/dl)

은 대조군 보다 유의하게 낮았다(P<0.05)(Fig. 1).

경구당부하 검사 결과 정상군과 木香 투여군에서는 30분 후에 최고 혈당치를 보였으며, 대조군에서는 60분 후에 최고 혈당치를 보인 후 지속적으로 감소하는 모습을 보였다. 30분 후 혈당에서는 대조군(320.57±59.09 mg/dl)이 정상군(203.14±15.79 mg/dl)과 비교하여 유의한 차이는 없었고, 木香 투여군(398.80±55.24 mg/dl)도 대조군과 비교하여 유의한 차이는 없었다. 60분 후 혈당에서는 대조군(368.14±30.10 mg/dl)이 정상군(191.43±9.74 mg/dl)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(329.20±49.33 mg/dl)은 대조군과 비교하여 유의한 차이는 없었다. 90분 후 혈당에서는 대조군(316.57±33.37 mg/dl)이 정상군(150.00±8.03 mg/dl)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(210.20±18.32 mg/dl)은 대조군보다 유의하게 낮았다(P<0.05). 120분 후 혈당에서도 대조군(240.14±20.61 mg/dl)이 정상군(124.43±7.28 mg/dl)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(169.20±15.38 mg/dl)은 대조군보다 유의하게 낮았다(P<0.05)(Fig. 1).

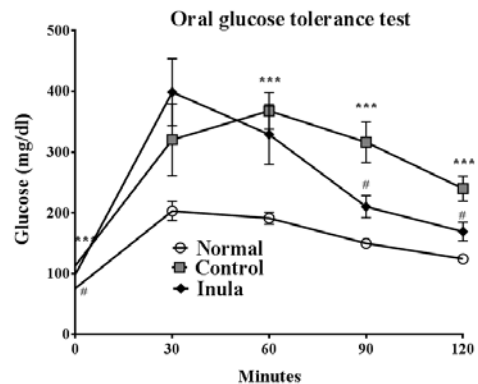


Fig. 1. Oral glucose tolerance test of each experimental group.

Normal : normal diet

Control : 60% fat diet

Inula : 60% fat diet with *Inula helenium*

\* Significantly different from the normal group. (\* P<0.05, \*\*\* P<0.001)

# Significantly different from the control group. (# P<0.05)

3. 인슐린 저항성에 미치는 영향

실험 12주째에 시행한 공복 혈당은 대조군(109.29 ±3.26 mg/dl)이 정상군(61.71±2.52 mg/dl)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(93.80±6.06 mg/dl)은 대조군보다 유의하게 낮았다(P<0.05)(Table 2).

혈청 인슐린 농도는 대조군(1.37±0.12 ng/dl)이 정상군(0.65±0.08 ng/dl)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(1.14±0.05 ng/dl)은 대조군과 비교하여 유의한 차이는 없었다(Table 2).

인슐린 저항성(HOMA-IR)에서는 대조군(10.78 ±1.19)이 정상군(2.98±0.48)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(7.75±0.83)은 대조군보다 유의하게 낮았다(P<0.05)(Table 2).

Table 2. Fasting Blood Glucose, Serum Level of Insulin and Homeostasis Model of Assessment -Insulin Resistance of Each Experimental Group

	Normal	Control	Inula
fasting blood glucose (mg/dl)	61.71 ±2.52	109.29 ±3.26***	93.80 ±6.06#
serum insulin (ng/dl)	0.65 ±0.08	1.37 ±0.12***	1.14 ±0.05
HOMA-IR	2.98 ±0.48	10.78 ±1.19***	7.75 ±0.83#

Normal : normal diet

Control : 60% fat diet

Inula : 60% fat diet with *Inula helenium*

\* Significantly different from the normal group. (\*\*\*) P<0.001

# Significantly different from the control group. (# P<0.05)

4. 지방 및 간 무게에 미치는 영향

부고환 지방층의 무게는 실험 시작 12주째 대조군(2.11±0.17 g)이 정상군(0.65±0.06 g)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(1.93±0.06 g)은 대조군과 비교하여 유의한 차이는 없었다.

간의 무게는 대조군(1.53±0.18 g)이 정상군(1.04 ±0.04 g)보다 유의하게 높았고, 木香 투여군(1.23 ±0.03 g)은 대조군과 비교하여 유의한 차이는 없었다.

5. Adipose tissue macrophage(ATM)에 미치는 영향

ATM number에서는 대조군(1131160.00±75514.53)이 정상군(171894.90±12806.21)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(850596.90±57090.04)은 대조군보다 유의하게 낮았다(P<0.05)(Table 3).

CD45(+), CD11b(+), F4/80(+) ATM의 percentage에서도 대조군(63.58±3.17%)이 정상군(29.98±2.04%)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(50.53 ±2.93%)은 대조군보다 유의하게 낮았다(P<0.05)(Table 3).

Table 3. Adipose Tissue Macrophage Number and Percentage of Each Experimental Group

	Normal	Control	Inula
ATM number	171894.90 ±12806.21	1131160.00 ±75514.53***	850596.90 ±57090.04#
ATM percentage (%)	29.98 ±2.04	63.58 ±3.17***	50.53 ±2.93#

Normal : normal diet

Control : 60% fat diet

Inula : 60% fat diet with *Inula helenium*

\* Significantly different from the normal group. (\*\*\*) P<0.001

# Significantly different from the control group. (# P<0.05)

6. 염증 관련 유전자 발현에 미치는 영향

TNF-α 유전자의 발현은 대조군(5.31±0.71)이 정상군(1.00±0.03)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(2.97±0.88)은 대조군과 비교하여 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

IL-6 유전자의 발현도 대조군(4.34±1.11)이 정상군(1.00±0.03)보다 유의하게 높았고(P<0.05), 木香 투여군(1.47±0.39)은 대조군과 비교하여 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

IL-10 유전자의 발현은 대조군(0.24±0.12)이 정상군(1.00±0.01)보다 유의하게 낮았고(P<0.01), 木香 투여군(0.70±0.16)은 대조군보다 유의하게 높았다(P<0.05)(Fig. 2).

CD68 유전자의 발현은 대조군(17.72±1.24)이 정상군(1.01±0.02)보다 유의하게 높았고(P<0.001), 木香 투여군(11.99±1.21)은 대조군보다 유의하게 낮았다.

다( $P<0.05$ )(Fig. 2).

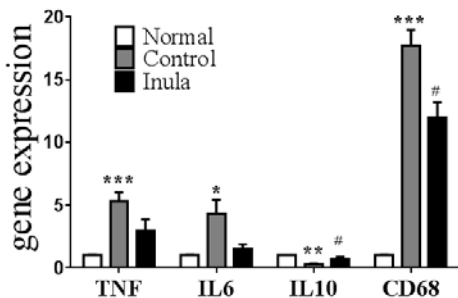


Fig. 2. The gene expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, interleukin-10 and cluster of differentiation 68 of each experimental group.

Normal : normal diet

Control : 60% fat diet

Inula : 60% fat diet with *Inula helenium*

\* Significantly different from the normal group.

(\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ )

# Significantly different from the control group.

(#  $P<0.05$ )

#### IV. 고찰

당뇨병이란 혈당 조절에 필요한 인슐린의 절대적 혹은 상대적 결핍 및 조직에서의 인슐린 작용성 저하에 기인한 고혈당과 그에 수반되는 대상 장애로 정의된다<sup>8</sup>. 이 중 당뇨병의 95%에 해당하는 제 2형 당뇨병은 고혈당, 인슐린 저항성, 상대적인 인슐린 분비 장애를 특징으로 하는 질환으로 오늘날 성인에게서 흔한 질환이며<sup>4</sup>, 근래에 활동량이 적은 생활습관과 비만이 늘어감에 따라 급속히 증가하고 있다<sup>8</sup>.

인슐린 저항성이란 주어진 인슐린 농도 하에서 인슐린에 대한 반응이 정상보다 감소되어 있는 상태로<sup>3</sup>, 인슐린 분비 이상과 함께 2형 당뇨병의 특징 중 하나로 분류되며, 고혈압, 고지혈증, 죽상동맥 경화증 등 심혈관질환 위험인자들의 중심적인 병인으로 작용한다. 이런 인슐린 저항성은 유전적 결합이 주된 원인이고, 비만, 운동부족 등 환경적인

요인이 결합되어 발생한다고 알려져 있다<sup>8</sup>.

비만은 특히 인슐린 저항성의 발생에 있어서 중요한 역할을 하며, 제 2형 당뇨병의 특징 중 하나이기도 하다<sup>20</sup>. 비만은 에너지섭취와 에너지소비의 불균형으로 인해 일어나는 것으로 과도한 에너지가 지방의 형태로 저장되고 이로 인해 지방세포 수가 늘거나 비대해지게 된다. 이러한 지방세포의 과다형성과 비대가 비만의 병리학적 특성이다<sup>5</sup>.

비만인구는 전 세계적으로 급속히 늘고 있으며, 비만인구의 증가는 기존의 질병 양상도 변화시켜 제 2형 당뇨병과 심혈관계 질환과 같은 비만관련 질병들의 발생을 특히 급격하게 늘리고 있다<sup>2</sup>.

비만한 환자에서 인슐린 저항성의 주 원인은 인슐린 작용에 있어서 수용체 후 결합이며, 이는 과다하게 확장된 저장소와 관련이 있다. 이로 인해 초래되는 고인슐린 혈증은 인슐린 수용체의 하향 조절로 인슐린 저항성을 더욱 항진시킨다. 고혈당증이 발생하면 인슐린 표적조직 내의 특정 포도당 수용체 단백질도 지속적인 활성화 후에 하향 조절되며, 이어 수용체후 인슐린 작용의 결합을 더 일으켜 고혈당증을 더욱 악화시키게 된다<sup>21</sup>.

비만과 인슐린 저항성의 정도에 비례하여, 지방조직 내에 macrophage의 침착량도 증가하게 되는데, 이를 adipose tissue macrophage(ATM)라고 한다. ATM의 침착량이 늘면서 TNF- $\alpha$ , IL-6 등의 염증관련 물질의 분비량 또한 늘어나게 되어 전신적인 염증 상태가 유발된다<sup>6</sup>.

당뇨병은 한의학적으로 消渴의 범주에 해당한다. 消渴은 陰虛燥熱로 인해 체내의 氣血津液이 失調되어 발생하는 일련의 변화를 지칭하는 것으로, 주된 인자는 體素陰虛, 肥滿, 飲食不節, 情志失調, 勞傷過度, 過服辛燥, 外瀉入裏化熱이다<sup>8</sup>. 『丹溪心法』에서는 “酒麵無節, 酷嗜炙煇糟藏, 鹹酸醃醢, 其肥腥羶之屬, 復以丹砂玉石濟其私, 於是炎火上熏, 臟腑生熱, 燥熾盛, 津液乾焦, 渴飲水漿而不能自禁<sup>10</sup>.”이라고 했고, 『景岳全書』에서는 “消渴雖有數者之不同, 其爲病之肇端, 則皆膏粱肥甘之變, 酒色勞傷之過, 皆富

貴人病之, 而貧賤者鮮有也<sup>11</sup>.”라고 했으며, 『醫門法律』에서는 “肥而且貴, 醇酒厚味, 孰爲限量哉, 久之食飲釀成內熱, 津液乾涸, 救濟於水, 然水入尙, 能消之也, 愈消愈渴, 其膏粱愈無己而中消之病遂成矣<sup>12</sup>.”라고 하여 비만과 식이가 당뇨병의 주요원인으로 작용함을 언급하였다.

木香은 국화과에 속한 다년생 본초인 운목향의根으로 性은 溫하고, 味는 辛苦하다. 悤경은 脾, 胃, 大腸, 三焦, 膽經이며, 行氣止痛, 健脾消食 등의 효능이 있어, 胸脘脹痛, 瀉痢後重, 食滯不消, 不思飲食을 다스린다<sup>13</sup>. 현재까지 목향에 대한 연구에서 세포독성 효과<sup>14</sup>, 세포사멸 효과<sup>15</sup>, 항암 효과<sup>16</sup>, 항비만 효과<sup>17</sup>, 파골세포 분화<sup>18</sup>와 관련된 보고가 있었고, 최근 설치류 대식세포에서 木香 추출물을 이용한 항염증 효과가 입증되었으나<sup>19</sup>, 비만형 인슐린 저항성 동물 모델에 대한 항염증효과는 보고된 바가 없었다.

비만과 이로 인한 제 2형 당뇨병에서 체중 감소를 통해 긍정적 효과를 얻을 수 있다는 것은 널리 알려진 사실이다<sup>22</sup>. 실제로 약물을 사용한 경우를 제외하고 생활 습관 개선 등을 통해 체중 감량을 했을 경우 당뇨병 발생의 위험도가 감소되는 것으로 나타났다<sup>2</sup>. 본 실험에서는 木香 투여군에서 대조군에 비해 유의한 체중 감소 효과가 나타나지 않았다.

조절되지 않는 고혈당은 좋지 않은 지질단백 형태를 띠게 하고 모든 조직에 당화 종말 생성물을 증가시켜 혈전 발생의 위험을 증가시키므로 비만한 당뇨 환자에게는 엄격한 혈당 조절이 중요하다<sup>5</sup>. 당뇨병 진단 시 공복 혈당만을 사용할 경우 약 30%의 미진단군이 발생할 수 있으며, 경구당부하 검사만이 내당능장애를 진단할 수 있는 유일한 방법이다<sup>4</sup>. 본 실험에서 공복 혈당은 木香 투여군이 대조군보다 유의하게 낮았고, 경구당부하 검사 결과에서도 90분 후, 120분 후 혈당에서 木香 투여군이 대조군보다 유의하게 낮아 당대사를 개선시켰다.

인슐린 저항성은 HOMA-IR을 이용하여 측정하

였다. HOMA법은 일회의 공복 혈당과 인슐린 측정치를 일정한 공식에 대입하여 인슐린 감수성을 측정하는 방법이며 비교적 적은 측정간 오차를 가지고 있으며 표준검사인 클램프법과의 상관관계가 높아서 임상적인 사용에 고려될 수 있는 방법이다<sup>4</sup>. 공복 혈청 인슐린 농도는 木香 투여군이 대조군보다 낮았으나 유의성은 없었다. HOMA-IR에서 木香 투여군이 대조군보다 유의하게 낮아 인슐린 저항성을 개선시킨 것으로 보인다.

부고환 지방 조직은 백색지방조직의 변화를 평가하기 위한 지표로 사용되는데, 이는 포도당과 글리코젠을 합성하고 인슐린에 민감하게 반응하며, 여러 가지 adipocytokine을 분비하기 때문이다<sup>23</sup>. 또한 간은 정상적인 혈당을 유지하는데 중요한 역할을 하기 때문에 췌장과 독립적으로 당대사 질환을 예방 또는 치료하는데 있어 표적기관이 되고 있다<sup>24</sup>. 본 실험에서 부고환 지방 조직과 간의 무게에 있어서 대조군에서는 모두 정상군보다 유의하게 증가하였으나 木香 투여군에서는 모두 대조군에 비해 유의한 감소효과가 나타나지 않았다.

지방조직내의 macrophage의 침착량이 증가할수록 염증 관련 인자들의 분비량이 증가하여 염증상태가 유발되므로<sup>6</sup> 본 실험에서 염증 상태의 개선 효과를 알아보기 위해 ATM의 number와 percentage를 분석하였다. ATM number와 percentage에 있어서 대조군에서 정상군보다 모두 유의하게 증가하여 본 실험에서도 고지방식이로 유발된 비만이 지방조직의 염증상태를 유발한 것으로 확인되었다. 木香 투여군에서는 대조군에 비해서 ATM의 수와 percentage에 있어서 모두 유의하게 감소하여 木香이 지방조직 내의 macrophage의 침착을 억제함으로써 염증 상태를 개선시킨다는 것을 알 수 있었다.

TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 지방세포에서 생성되는 cytokine으로 비만이나 인슐린 저항성이 있을 때 증가한다<sup>5</sup>. 비만 환자에서 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가하는 것을 통해서 고인슐린 혈증과 지방 세포에서의 TNF- $\alpha$ 의 발현양이 크게 연관되어 있는 것을 알 수 있었으며,



체중 감소를 통해 TNF- $\alpha$ 의 발현량이 줄면서 인슐린 저항성이 개선된다는 점에서 TNF- $\alpha$ 가 인슐린 저항성에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다<sup>25</sup>. TNF- $\alpha$ 는 실제로 인슐린 신호전달을 막는 것으로 나타났는데, 이는 인슐린 수용체의 세린기(serine group)를 인산화 시키거나 인슐린 수용체의 발현 억제를 통한 것으로 밝혀졌다<sup>26</sup>. 본 실험에서 대조군에서는 정상군보다 TNF- $\alpha$  유전자 발현이 유의하게 증가하였으나 木齧 투여군에서는 대조군에 비해 감소하였으나 유의한 억제 효과는 없었다.

IL-6 역시 TNF- $\alpha$ 와 더불어 가장 많이 연구되고 있는 cytokine 중 하나로<sup>27</sup>, 염증 반응의 주축이 된다. 동물 실험에서 인슐린 신호를 직접적으로 방해하며 간세포에서 당원이 생성되는 것을 막아서 인슐린 저항성을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>2</sup>. 본 실험에서 IL-6 유전자 발현은 木齧 투여군에서 대조군에 비해 감소하였으나 유의한 억제 효과를 보이지 않았다.

IL-10은 T 세포, B 세포, 단핵구, 대식세포 등의 여러 세포에서 분비되어 전반적인 면역 반응의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 여러 가지 염증 반응을 억제하는 역할을 한다<sup>28</sup>. 또한 대식세포의 TNF- $\alpha$  분비를 억제함으로써 대식세포의 활동을 억제하는 것으로 밝혀졌다<sup>29</sup>. 본 실험에서는 대조군이 정상군보다 IL-10 유전자 발현이 유의하게 낮았다. 木齧 투여군에서는 대조군보다 유의하게 높아, IL-10 유전자 발현을 증가시켜 대식세포의 활동과 염증 반응을 억제시킨 것으로 생각한다.

CD68은 대식세포의 표지자중 하나로 지방 세포에서 그 유전자의 발현이 나타나는데, CD68 유전자 발현이 증가 할 때 TNF- $\alpha$ , IL-6의 분비량 또한 증가하며, 인슐린 저항성과도 강한 연관성이 있다<sup>30</sup>. 본 실험 결과 대조군에서 정상군보다 CD68 유전자 발현이 유의하게 높았다. 木齧 투여군에서는 대조군보다 유의하게 낮아 유전자 발현을 억제하여, TNF- $\alpha$ , IL-6의 분비를 억제시킬 수 있을 것으로

기대되나 추가적인 실험이 필요하리라 생각한다.

이번 연구를 종합하면 비만을 동반한 인슐린 저항성 동물모델에서 木齧 투여군은 비만 자체를 개선시키지는 못하였으나, 고혈당을 억제 하고 인슐린 저항성을 완화시켰다. 이는 IL-10, CD68 유전자의 발현을 조절하고 대식 세포의 지방 침착을 억제하여 염증 반응을 억제함으로써 나타난 결과로 보여지나 추가적인 실험이 필요하리라 생각한다. 또한 추후 木齧의 장기적인 투여에 따른 치료효과에 대한 평가와 추가적인 임상연구가 필요할 것으로 생각한다.

## V. 결 론

木齧이 고지방식이에 의한 비만으로 유발된 인슐린 저항성 mouse의 혈당과 인슐린 저항성, 염증 관련 지표에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 木齧은 공복 혈당을 감소시켰다.
2. 木齧은 경구당부하 검사 결과 고혈당을 감소시켰다.
3. 木齧은 인슐린 저항성을 완화시켰다.
4. 木齧은 ATM number와 percentage를 감소시켰다.
5. 木齧은 IL-10 유전자 발현을 증가시켰다.
6. 木齧은 CD68 유전자 발현을 감소시켰다.

## 참고문헌

1. 대한내과학회 해리슨내과학 편집위원회. HARRISON'S 내과학. 서울: MIP; 2010, p. 2744.
2. 대한비만학회. 임상비만학. 서울: 고려의학; 2008, p. 143, 167, 263-4, 275.
3. 대한당뇨병학회. 당뇨병학. 서울: 고려의학; 2005, p. 310.
4. 대한내분비학회. 내분비대사학. 서울: 군자출판사;

- 2011, p. 639-40, 645, 647-8.
5. 박용우. 비만치료의 최신지견. 서울: 한미의학; 2007, p. 49, 107, 242.
  6. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes (Lond)* 1998;22:1145-58.
  7. 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;112:1796-808.
  8. 전국 한의과대학 신계내과학교실. 신계내과학. 서울: 군자출판사; 2011, p. 89, 91, 300, 303.
  9. 윤창렬, 이남구, 김선호. 黃帝內經素問 王冰注(中). 대전: 주민출판사; 2003, p. 231-2.
  10. 朱震亨. 丹溪醫集. 북경: 인민위생출판사; 1995, p. 324.
  11. 張介賓. 景岳全書 雜證謨(上). 서울: 한미의학; 2006, p. 836.
  12. 대성문화사편집부. 欽定 四庫全書 子部 五醫家類. 서울: 대성문화사; 1995, p. 527-8.
  13. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 본초학. 서울: 영림사; 2012, p. 395.
  14. 이영준, 구세광, 강수진. A549세포에 대한 목향 추출물의 ROS 매개 세포독성. *대한예방한의학회지* 2013;17(2):169-78.
  15. 김대성, 이성진, 이장천, 우원홍, 임규상, 문연자. 목향에탄올추출물의 ROS-MAPKs 경로를 통한 세포사멸 유도. *약학회지* 2012;56(3):173-9.
  16. 오히라, 고성규. 木香과 車前草가 胃癌細胞의 活性, 增殖, 自己殺害能 및 세포주기관련 유전자 발현에 미치는 영향. *대한한방중약학회지* 2001(1):7:1-18.
  17. 윤태숙, 성윤영, 장자영, 양원경, 지윤의, 김호경. 목향 추출물의 항비만 활성 효과. *韓藥作誌* 2010; 18(3):151-6.
  18. 이명수, 김정중, 오재민, 최민규, 송미진, 안용환, 등. 파골세포 분화에 목향 물 추출물의 효과. *동의생리병리학회지* 2011;25(3):516-20.
  19. 이민석, 류도곤, 권강범. 설치류 대식세포에서 木香 추출물의 항염증 효과. *동의생리병리학회지* 2011;25(2):275-9.
  20. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106(4):473-81.
  21. 전국의과대학교수. 오늘의 진단 및 치료. 서울: 한우리; 2000, p. 1252.
  22. 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.
  23. 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.
  24. 백선호, 한수련, 권오준, 안영민, 안세영, 이병철. 神麴 투여가 비만형 제 2형 당뇨병 동물모델의 대사인자와 지방조직 염증반응에 미치는 영향. *대한한의학회지* 2012;33(3):33-45.
  25. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin. Invest* 1995;95:2409-15.
  26. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$  and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271(5249):665-8.
  27. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:911-9.
  28. Yilma AN, Singh SR, Fairley SJ, Taha MA, Dennis VA. The anti-inflammatory cytokine, interleukin-10, inhibits inflammatory mediators in human epithelial cells and mouse macrophages

- exposed to live and UV-inactivated *Chlamydia trachomatis*. *Mediators Inflamm* 2012;2012:1-10.
29. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 1991; 174(1):1549-55.
30. Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, et al. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues. *Diabetes* 2005;54(8):2305-13.