

黃柏이 비만 유발 mouse의 대사기능에 미치는 영향

마영훈¹, 김효재¹, 한양희¹, 김한옥², 오재선³

¹동신한방병원 한방내과, ²동서한방병원 한방내과, ³동신대학교 부속 목포한방병원 한방내과

Effects of *Cortex Phellodendri* on the Metabolic Function in Experimental Mouse Model of Obesity

Young-hoon Ma¹, Hyo-jae Kim¹, Yang-hee Han¹, Han-ok Kim², Jae-seon Oh³

¹Dept. of Oriental Internal Medicine, Dong-Shin Oriental Medical Hospital

²Dept. of Oriental Internal Medicine, Dongseo Oriental Medical Hospital

³Dept. of Oriental Internal Medicine, Dong-Shin University Mok-Po Oriental Medical Hospital

ABSTRACT

Objectives: This study was undertaken to investigate how *Cortex Phellodendri* affects metabolic functional change in an experimental rat model of obesity.

Methods: An obesity model was induced in a C57BL/6 mouse with a high-fat diet. Mice were divided into three groups (n=6) of normal diet, high-fat diet (=control), and high-fat diet with *Cortex Phellodendri*. After 12 weeks, we measured the three mice groups' body weight, FBG, FBI, HOMA-IR, OGTT, the weight of epididymal fat and liver, the percentage of ATM, and the gene expression of TNF- α , IL-10, and CD68.

Results: *Cortex Phellodendri* significantly reduced blood glucose and oral glucose tolerance levels. It also reduced ATM numbers and TNF- α and CD68 gene expression and increased IL-10 gene expression.

Conclusions: This study suggests that *Cortex Phellodendri* normalized the blood glucose and reduced the expression of inflammatory markers. However, with respect to other indicators of metabolic function in obesity, there were no significant results.

Key words: *Cortex Phellodendri*, obesity, blood glucose, anti-inflammatory, metabolic function

1. 서론

비만은 인슐린 저항성, 제 2형 당뇨병, 간 질환, 심혈관계 질환과 같은 대사성 질환을 비롯해 몇몇

암 질환 등 다양한 질병 발생의 위험인자로 작용한다. 특히, 비만 시 증가되는 지방조직 내 염증세포 및 염증 매개자들은 인슐린 저항성, 제 2형 당뇨병, 동맥경화 병변 발생의 원인 또는 촉진자 역할을 한다^{1,2}. 따라서 지방조직의 염증제어는 비만성 대사질환의 발생 및 진행을 지연시키기 위한 새로운 전략으로 인식되고 있다³.

최근 박 등⁴의 연구에 의하면 지방세포의 증가에 따른 이차적인 반응으로 인슐린 저항성 및 지방세포의 증가가 일어나는 것이 아니라 만성염증

· 투고일: 2015.09.30, 심사일: 2015.12.11, 게재확정일: 2015.12.29
· 교신저자: 한양희 서울시 양천구 목동 오목로 351
동신한방병원
TEL: 02-2640-2931 FAX: 02-2640-2727
E-mail: omdhyh@hanmail.net
· 이 논문은 2014년 2월 동신대학교 일반대학원 한의학과 내과
학전공 석사학위 논문임.

상태에 지방조직의 염증 및 대식세포의 침윤, 그리고 고칼로리 섭취에 의한 에너지 유입의 증가가 대식세포의 활동성 증가의 병태 생리의 초기 반응이라는 보고가 있었다.

韓醫學에서는 비만을 肥, 肥人, 肥貴人, 肥胖, 肥胖症, 肥胖病이라고 표현하고 있으며 비만의 주원인을 先天稟賦, 過食肥甘厚味, 久臥久坐, 外感濕邪, 內傷七情 등으로 인한 氣滯, 痰濁, 水濕 및 血瘀 등으로 보고 있다⁵. 따라서 濕燥 瀉火 解毒하는 효능이 있는 黃柏⁶의 기능과 비만과의 연관성에 관한 연구들이 진행되고 있다. 류마티오이드 관절염의 interleukin-1(IL-1) cytokine의 활성화 및 발현 억제에 유의적인 결과가 있음을 밝힌 박 등⁷, 지방세포의 분화를 억제한다는 김 등⁸, 그리고 glucose uptake 촉진활성에 효과가 있다는 김 등⁹의 연구결과가 있었으나, 만성 염증 상태의 개선에 따른 대사성 질환의 개선과 황백과의 직접적인 연구는 부족한 실정이었다.

이에 본 실험에서는 비만형 동물 모델에 황백 추출물을 투여하여 체중, 혈당, 혈청 인슐린 농도, 인슐린 저항성, 지방조직 및 간의 무게, macrophage 발현 및 cytokine 등의 변화를 측정 관찰한 결과 대사 기능의 변화에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 실험약제

본 실험에 사용된 약제인 黃柏(*Cortex Phellodendri*)은 운향과에 속한 낙엽교목인 황벽나무 *Phellodendron amurense* Ruprecht의 주피를 벗긴 수간피로서, 경희한약에서 구입하여 사용하였다.

2) 동물

19~21 g의 male C57BL/6(중앙실험동물, Korea)을 구매하여 12시간씩 낮과 밤이 교대되며 40~70%의 습도가 유지되는 stainless-steel cage에서 1주일

간 사육하며 적응기를 거쳤다. 먹이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

3) 시약 및 기기

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

측정을 위해 사용된 기기는 rotary evaporator (Model NE-1, 東京理化學{株式會社, Japan), 동결 건조기(Model FD-1, 東京理化學{株式會社, Japan), 전자저울(CAS 2.5D, Korea), strip-operated blood glucose sensor(ONETOUCH Ultra Inverness Medical Ltd. Stockport. UK), Ultra sensitive mouse insulin ELISA kit(Crystal Chem INC, USA), cell strainer (BD bioscience, USA), Mini RNA Isolation II™ (ZYMO RESEARCH, USA), cellometer(Nexcelom Bioscience LLC. USA), FACS LSRII(BD bioscience, USA), FlowJo 프로그램(Tree star, inc, USA), Advantage RT for PCR Kit(Clontech, USA), 7,900HT Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems®, USA), SDS Software 2.4(Applied Biosystems®, USA), 통계학적 비교 분석기(GraphPad PRISM statistical package(ver 2.00), Graphpad software inc., San Diego, USA)를 사용하였다.

2. 방법

1) 검체 제조

총량 1000 g의 황백(*Cortex Phellodendri*)을 1,500 ml의 증류수에 넣어 4시간 동안 가열추출하고 여과한 여액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조기로 건조시켰다. 동결 건조된 각 약제 1차 추출물 1 g씩을 10 ml의 증류수로 용해시킨 후 95 °C

수조에서 2시간 동안 재차 가열 추출하였고, 이들 추출물을 원심분리용 시험관에 담아 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상청액을 수거하였다. 이 상청액을 직경 0.2 μm의 여과지를 통과시켜 여과 멸균하였으며, 사용할 때까지 -70 °C에 보관하였다. 황백의 최종 수거율은 4.9%(49 g)였다.

2) 고지방 식이 유발 비만 동물 모델의 제작

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

3) 실험군 배정 및 연구 계획

Male C57BL/6 mouse 6마리씩을 정상군(normal), 대조군(control), 황백 투여군(Phellodendri)으로 나누었다. 정상군을 제외한 나머지 2개 군들은 60% fat diet를 12주간 섭취시켜 비만을 유발했다. 황백 투여군은 60% fat diet에 황백을 5%의 비율로 섞어 12주간 섭취했다.

4) 체중 측정

체중은 실험 개시일에 최초 측정 한 후 실험 종료일에 마지막 sampling하기 전에 측정하였다. 체중 측정은 아침 사료 공급 전에 일괄적으로 전자 저울을 사용하여 측정하였으며, 측정 시 mouse의 움직임에 따른 체중 오차를 최소화하기 위해 플라 스틱 bowl에 mouse을 올려놓고, mouse가 안정 상태에 이르러 나타나는 체중을 기록하였다.

5) 혈청 인슐린 농도 및 인슐린 저항성 측정

공복 시 혈당 및 혈청 인슐린 농도 측정을 위해 고지방 식이 투여 12주째에 12시간 이상 금식시킨 후 실험쥐의 tail vein에서 혈액을 채취한 다음, 4 °C에서 2,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 인슐린은 ultra sensitive mouse insulin ELISA kit을 이용하여 측정하였다. 96well 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 10분 후 ELISA reader를 이용하여 450 nM에서 분석하였다. 인슐린 저항성은 HOMA-IR을 이용하여 측정하였다. HOMA-IR은 다음의 공식을 이용하여 계산하였다.

$HOMA-IR = \text{공복 시 혈당(fasting blood glucose)} (mg/dl) \times \text{공복 시 인슐린(Fasting serum insulin)} (ng/ml) \times 0.0717225161669606^{20}$

6) 경구당부하검사(Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 측정

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

7) 부고환 지방조직 및 간 무게 측정

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

8) 지방조직에서의 RNA 분리

실험 시작 12주째 mouse를 희생시킨 후 개복하여 부고환 지방조직을 분리하여 알루미늄 호일에 싸서 신속하게 액화질소에 담가 보관 후 RNA 분리 전까지 -70 °C에 보관하였다. 지방조직에서의 RNA 분리는 Mini RNA Isolation II™을 이용하였다. 보관된 지방조직을 해동시킨 다음 tube에 넣고 여기에 ZR RNA buffer 300 μl씩을 분주한 다음, homogenizer를 이용하여 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직이 담긴 tube를 1,000 rpm에서 원심분리한 후 상층액을 Zymo-Spin III column에 옮기고 이를 2 ml collection tube에 꽂은 다음, 2,000 rpm으로 1분간 원심 분리하였다. Column에 RNA wash buffer 350 μl를 분주하고 132,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 2회 세척한 후 column을 1.5 ml tube에 옮겨 꽂은 다음, RNA-free water 50 μl를 분주

하여 1,000 rpm으로 원심분리하여 최종적으로 RNA를 수거하였으며 실험에 사용하기 전까지 -70 °C에 보관하였다.

9) Stromal Vascular Cell(SVC)의 분리

지방조직은 실험 시작 12주째 mouse를 희생시킨 후 개복하여 부고환 지방조직을 채취하였다. Mouse 으로부터 채취한 지방조직은 phosphate buffered saline에 2% bovine serum albumin을 용액에 넣은 다음, round shape scissor를 이용하여 1~2 mm 크기의 작은 조각으로 분쇄하였다. 여기에 collagenase와 DNase I를 넣어 37 °C에서 20분간 shake하여 조직이 분쇄되도록 하였다. 2% BSA/PBS에 5 mM EDTA를 넣은 용액을 각 tube에 넣고 섞은 다음, 250 µM 필터로 분해되지 않은 지방조직을 걸러내고 1,000 rpm으로 3분간 원심 분리하였다. 지방세포(adipocyte)가 포함된 상청액을 스포이드를 이용해 분리한 다음 하층의 pellet을 제외한 나머지 용액을 제거하고 PBS에 2% fetal bovine serum를 넣은 용액에 넣은 다음 100 µm cell strainer를 이용하여 불필요한 조직을 제거하고 200× g에서 10분 동안 원심 분리하여 하부의 모아진 세포를 RBC lysis buffer에 10분 간 처리, 원심분리하여 SVC를 모았다.

10) Adipose Tissue Macrophage(ATM)에 대한 Fluorescence Activated Cell Sorting(FACS) 분석

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

11) 염증관련 유전자 발현 분석

지방 세포의 TNF- α , IL-10 유전자의 발현 측정

은 실시간 정량 역전사 연쇄중합반응(quantitative Real time-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 이용하여 측정하였다. qRT-PCR에 앞서 cDNA의 제작은 Advantage RT for PCR Kit을 이용하였다. 지방조직에서 분리한 1 µg의 RNA에 OligodT와 RNase-free H₂O를 넣고 70 °C에서 2분간 반응시킨 다음, 10 nM dNTP, Recombinant RNase Inhibitor, MMLV Reverse Transcriptase, 5X Reaction Buffer를 각각 넣고 42 °C에서 60분, 94 °C에서 5분씩 반응시켰다. 역전사를 통해 얻어진 각각의 complementary DNA(cDNA)에 2× SYBR Reaction buffer, primers, dH₂O를 혼합하여 7900HT Fast Real-Time PCR System를 이용하여 연쇄중합반응을 시행하였다. 연쇄중합반응에 사용된 각각의 primer의 염기 서열은 TNF- α 의 경우 5'-TTCTG TCTAC TGAAC TTCGG GGTGA TCGGT CC-3'과 5'-GTATG AGATA GCAA TCGGC TGACG GTGTG GG-3'을, IFN- γ 의 경우 5'-GGC GAC AGT TCA GCC ATC ACT T-3'과 5'-GCA TCG TTT TGG GTT CTC TTG G-3'을 housekeeping gene으로는 GAPDH의 경우 5'-AGTCCATGCCATCACTGCCACC-3'과 5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'을 각각 사용하였다. 유전자 발현 분석은 SDS Software 2.4를 이용하여 얻은 각각의 유전자에 대한 threshold cycle (CT)값을 GAPDH 기준으로 relative quantitation (RQ)값을 환산한 다음 fold change값을 계산하였다. 측정된 fold change값은 정상군을 1로 산정하여 이에 대한 값으로 환산하여 표시하였다.

12) 통계 분석

통계학적 비교분석은 GraphPad PRISM statistical package를 이용하였고, 각 군 간의 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)에 이어 Tuckey's post-hoc test로 검증하였다. 표(Table)와 그림(Figure)에서 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 대조군의 체중은 39.80±1.17 g로서 정상군의 25.19±0.40 g에 비해 유의하게 증가하여 비만이 유도되었다(p<0.001). 황백 투여군은 35.65±1.91 g로 대조군에 비해 체중증가가 억제되는 경향이 있었으나 유의성은 없었다(Table 1).

Table 1. Body Weight of Each Experimental Group

	Normal	Control	Phellodendri
Body weight (g)	25.19±0.40	39.80±1.17***	35.65±1.91

Normal : normal diet, Control : 60% fat diet, Phellodendri : *Cortex Phellodendri* 5 g with 60% fat diet

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

2. 공복 혈당과 혈청 인슐린 농도 및 인슐린저항성에 미치는 영향

대조군의 공복 혈당은 106.00±5.20 mg/dl로서 정상군의 61.56±1.65 mg/dl에 비해 유의성 있는 증가를 보였다(p<0.001). 황백 투여군의 공복 혈당은 91.20±2.03 mg/dl로 대조군에 비해 혈당 상승을 유의하게 억제하였다(p<0.05)(Table 2, Fig. 1).

대조군의 혈청 인슐린 농도는 1.30±0.11 µg/dl로 정상군의 0.65±0.11 µg/dl에 비해 유의성 있게 상승하였다(p<0.01). 황백 투여군의 혈청 인슐린 농도는 1.25±0.07 µg/dl로 대조군에 비해 하락하였으나 유의성은 없었다(Table 2).

대조군의 HOMA-IR은 10.01±1.26으로 정상군의 2.91±0.53에 비해 유의하게 상승하였다(p<0.001). 황백 투여군의 HOMA-IR은 8.17±0.53으로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 2).

Table 2. Fasting Blood Glucose, Fasting Serum Insulin and HOMA-IR Level of Each Experimental Group

	Normal	Control	Phellodendri
FBG (mg/dl)	61.56±1.65	106.00±5.20***	91.20±2.03#
FBI (µg/dl)	0.65±0.11	1.30±0.11**	1.25±0.07
HOMA-IR	2.91±0.53	10.01±1.26***	8.17±0.53

Normal : normal diet, Control : 60% fat diet, Phellodendri : *Cortex Phellodendri* 5 g with 60% fat diet

* Significantly different from normal group (** p<0.01, *** p<0.001)

Significantly different from control group (# p<0.05)

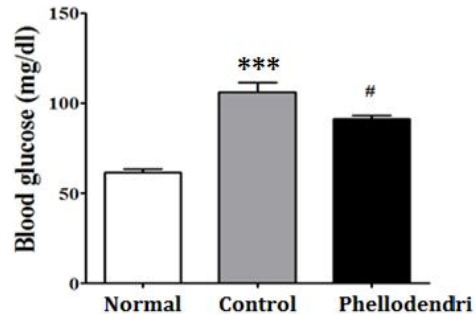


Fig. 1. Fasting blood glucose of each experimental group.

Normal : normal diet, Control : 60% fat diet, Phellodendri : *Cortex Phellodendri* 5 g with 60% fat diet

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

Significantly different from control group (# p<0.05)

3. 경구 당부하 검사에 의한 미치는 영향

공복 시 혈당은 대조군(111.29±2.39 mg/dl)이 정상군(72.11±2.67 mg/dl)보다 유의하게 높았다(p<0.001). 황백 투여군은 101.60±2.74 mg/dl로 대조군에 비해 유의하게 낮았다(p<0.05). 30분 후 혈당은 대조군(378.00±60.67 mg/dl)이 정상군(213.33±16.47 mg/dl)에 비해 유의하게 높았다(p<0.001). 반면, 황백 투여군은 321.00±21.04 mg/dl로 대조군에 비해 낮았

으나 유의하지는 않았다. 60분 후 혈당은 대조군 (409.43±21.95 mg/dl)이 정상군(187.89±5.90 mg/dl)에 비하여 유의하게 높았고(p<0.001), 황백 투여군은 292.80±20.22 mg/dl로 유의하게 낮았다(p<0.01). 90분 후 혈당은 대조군(366.43±33.26 mg/dl)이 정상군(154.78±5.77 mg/dl)보다 유의하게 높았고(p<0.001), 황백 투여군은 265.40±14.35 mg/dl로 대조군에 비해 유의하게 낮았다(p<0.05). 120분 후 혈당은 대조군 (272.71±16.27 mg/dl)이 정상군(124.67±5.47 mg/dl)보다 유의하게 높았고(p<0.001), 황백 투여군은 173.00±12.11 mg/dl로 대조군에 비해 유의하게 낮았다(p<0.01) (Table 3, Fig. 2).

Table 3. Oral Glucose Tolerance Test of Each Experimental Groups

	Normal	Control	Phellodendri
OGTT (mg/dl)			
0 min	72.11±2.67	111.29±2.39***	101.60±2.74 [#]
30 min	213.33±16.47	378.00±60.67***	321.00±21.04
60 min	187.89±5.90	409.43±21.95***	292.80±20.22 [#]
90 min	154.78±5.77	366.43±33.26***	265.40±14.35 [#]
120 min	124.67±5.47	272.71±16.27***	173.00±12.11 [#]

Normal : normal diet, Control : 60% fat diet, Phellodendri : *Cortex Phellodendri* 5 g with 60% fat diet
 * Significantly different from normal group (***) p<0.001)
 # Significantly different from control group (# p<0.05, ## p<0.01)

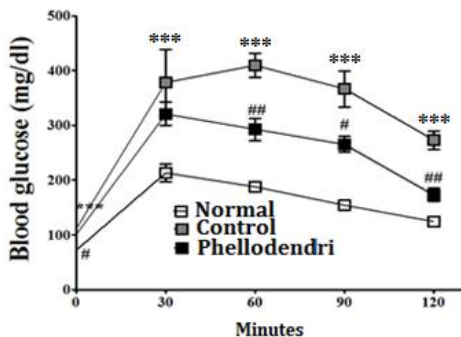


Fig. 2. Oral glucose tolerance test of each experimental group.

Normal : normal diet, Control : 60% fat diet,

Phellodendri : *Cortex Phellodendri* 5 g with 60% fat diet

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

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

4. 부고환지방 및 간의 무게에 미치는 영향

부고환 지방조직의 무게는, 대조군에서 2.06±0.17 g으로 정상군의 0.67±0.06 g에 비해 유의하게 증가하였으며(p<0.001), 황백 투여군에서는 1.73±0.08 g으로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 4).

간의 무게는 대조군에서 1.39±0.11 g으로 정상군의 1.01±0.03 g에 비해 유의하게 증가하였으며(p<0.05), 황백 투여군에서는 1.14±0.04 g으로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 4).

Table 4. Organ Weight of Each Experimental Group

	Normal	Control	Phellodendri
Epididymal fat (g)	0.67±0.06	2.06±0.17***	1.73±0.08
Liver (g)	1.01±0.03	1.39±0.11*	1.14±0.04

Normal : normal diet, Control : 60% fat diet, Phellodendri : *Cortex Phellodendri* 5 g with 60% fat diet

* Significantly different from normal group (* p<0.05, *** p<0.001)

5. 지방세포의 macrophage 발현에 미치는 영향

ATM의 숫자는 대조군에서 1130146.50±75006.85로 정상군의 175267.08±9530.45에 비해 유의하게 증가하였으며(p<0.001), 황백 투여군에서는 763392.40±165809.72로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(p<0.05)(Table 5, Fig. 3). CD45+cell은 대조군에서 1756382.72±117159.85로 정상군의 586836.29±18536.10에 비해 유의하게 증가하였으며(p<0.001), 황백 투여군은 1494673.20±340792.21로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 5). ATM과 CD45+ cells의 비율은 대조군에서 65.02±3.34로 정상군의 30.14±1.93에 비해 유의하게 증가하였고(p<0.001),

황백 투여군에서는 54.24 ± 4.10 으로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 5).

Table 5. Adipose Tissue Macrophage Number, CD45+ Cells and the Ratio of Adipose Tissue Macrophage /CD45+ Cells in Each Experimental Group

	Normal	Control	Phellodendri
ATM number	175267.08 ± 9530.45	1130146.50 $\pm 75006.85^{***}$	763392.40 $\pm 165809.72^{\#}$
CD45+ cells	586836.29 ± 18536.10	1756382.72 $\pm 117159.85^{***}$	1494673.20 ± 340792.21
ATM/ CD45+ cells (%)	30.14 ± 1.93	65.02 $\pm 3.34^{***}$	54.24 ± 4.10

Normal : normal diet, Control : 60% fat diet, Phellodendri : *Cortex Phellodendri* 5 g with 60% fat diet.

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

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

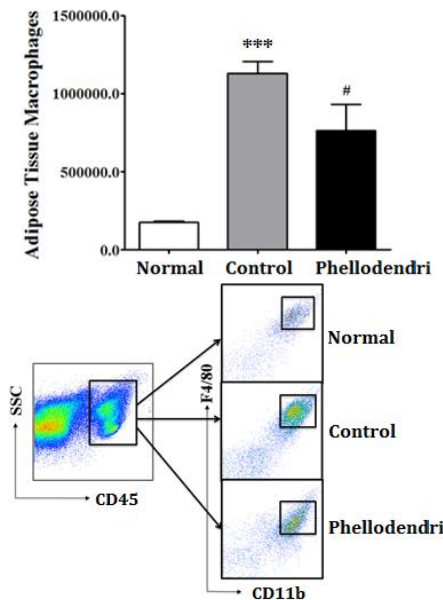


Fig. 3. The number of adipose tissue macrophage (ATM) in each experimental group.

Normal : normal diet, Control : 60% fat diet, Phellodendri : *Cortex Phellodendri* 5 g with 60% fat diet

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

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

6. 염증관련 유전자 발현에 미치는 영향

TNF- α 는 정상군을 1로 산정하였을 때, 대조군에서 5.93 ± 0.49 로 유의하게 증가하였고($p < 0.001$), 황백 투여군에서는 3.25 ± 0.70 으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.01$).

IL-10은 정상군을 1로 산정하였을 때, 대조군에서 0.25 ± 0.11 로 유의하게 감소하였고($p < 0.001$), 황백 투여군은 0.69 ± 0.09 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다($p < 0.05$)(Table 6, Fig. 4).

Table 6. The Gene Expression of Tumor Necrosis Factor (TNF)- α and Interleukin (IL)-10 of Epididymal Adipocyte in Each Experimental Group

	Normal	Control	Phellodendri
TNF- α	0.99 ± 0.02	5.93 $\pm 0.49^{***}$	3.25 $\pm 0.70^{\#}$
IL-10	1.01 ± 0.02	0.25 $\pm 0.11^{***}$	0.69 $\pm 0.09^{\#}$

Normal : normal diet, Control : 60% fat diet, Phellodendri : *Cortex Phellodendri* 5 g with 60% fat diet

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

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

$p < 0.01$

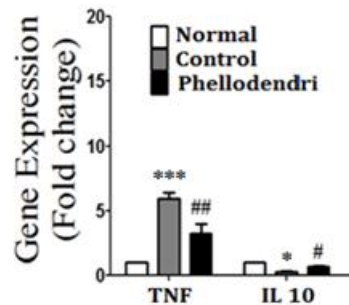


Fig. 4. The gene expression of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-10 of epididymal adipocyte in each experimental group.

Normal : normal diet, Control : 60% fat diet, Phellodendri : *Cortex Phellodendri* 5 g with 60% fat diet

* Significantly different from normal group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)

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

IV. 고 찰

비만 그리고 비만과 관련된 대사 질환은 최근 성인의 50% 이상을 차지할 정도로 많은 유병률을 보인다. 이 질환은 복부비만, 인슐린 저항성, 이상 지혈증 등과 같은 대사성 위험인자들이 군집하는 현상이다. 최근 비만 관련 대사증후군 발병의 병리적 인과관계를 설명하고자 하는 분자생물학적 연구에 의하면 비만으로 야기된 지방조직에서 사이토카인 생산의 이상, 급성기 작용물질(acute phase reactants)의 증가, 염증 신호전달계의 활성화된 상태가 관찰되며 이는 만성 염증 상태와 관련이 있다⁴¹⁰. 즉, 지방조직 대식세포가 염증 신호전달계에 주요한 영향을 미치며, 염증 신호전달계는 인슐린 작용을 억제하고 인슐린 저항성을 유발하는 것으로 보아, 비만과 대사성 질환의 이해에 있어 염증 반응 및 대사기능의 변화는 중요하다고 판단된다^{11,12}.

淸熱燥濕藥으로 분류되는 황백(*Cortex Phellodendri*)은 황벽나무의 주피를 벗긴 樹幹皮로, 性은 寒하고, 味는 苦하다. 歸經은 腎, 膀胱, 大腸經이며, 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱하는 효능이 있어 治濕熱瀉痢, 黃疸, 帶下, 熱麻, 脚氣, 痿躄, 骨蒸勞熱, 盜汗, 遺精, 瘡瘍腫毒, 濕疹瘙癢을 다스린다¹³. 또한 《東醫寶鑑》에서는 “寒性, 味苦, 無毒, 主五藏腸胃中結熱, 黃疸, 腸痔, 療泄痢, 女子漏下赤白, 陰蝕瘡, 殺疔蟲, 疥癬, 治目熱赤痛, 口瘡, 除骨蒸勞熱¹⁴.”이라 하여 황백이 항염증작용이 있음을 언급하였다.

그 동안 황백에 관하여 아질산염 소거에 의한 항산화와 항암작용에 관한 이 등¹⁵과 멜라닌 생합성 억제에 관한 이 등¹⁶ 그리고 충치 억제에 관한 곽¹⁷의 연구가 있었다. 또한 최근 지질 대사와 관련된 김 등⁸과 당 대사와 관련된 김 등⁹, 그리고 염증 관련 cytokine의 수치 및 면역세포의 변화와 관련된 김 등¹⁸의 연구는 있었으나, 전반적인 대사기능의 변화에 있어 황백과 대사성 질환 치료에 대한 연관성은 보고된 바가 없었다. 이에 저자는 비만이 유발된 동물 모델에 있어 황백이 염증 반응을 포

함한 대사 기능에 미치는 영향에 대해 알아보려고 하였다.

체중 조절은 비만 치료뿐만 아니라 제 2형 당뇨병 치료에 영향을 주며, 5~10%정도의 체중 감량으로도 당뇨병 위험 감소 및 혈압, 혈당, 지질을 감소시키는 것으로 알려져 있다¹⁹. 12주간의 고지방식을 섭취시킨 결과, 대조군의 체중은 정상군에 비해 유의하게 증가하였다. 황백 투여군은 대조군에 비해 체중 증가가 억제되는 경향은 있었으나, 통계학적 유의성은 없었다.

대사성 질환 중 대표적인 당뇨병의 진단에 있어 혈당 측정 및 혈청 인슐린 농도 측정은 필수적이다. 따라서 공복 혈당과 혈청 인슐린의 농도를 측정하여 그 두 가지로 수치를 매기는 HOMA-IR은 내당능 진단이 가능한 대표적인 지표이다¹⁹. 다만 인슐린 분비결함과 인슐린 저항성이 공존하는 제 2형 당뇨병 등의 질환 확진에는 OGTT가 더 정확하다²⁰.

공복 혈당과 혈청 인슐린 농도 그리고 HOMA-IR에 있어 대조군은 정상군에 비해 유의한 변화가 있었다. 공복 혈당에서 황백 투여군은 대조군에 비해 혈당 상승의 억제에 유의성이 있었다. 하지만 혈청 인슐린 농도와 HOMA-IR에서는 황백 투여군이 대조군에 비해 낮았으나 유의성은 없었다.

OGTT에서 대조군은 공복 시, 30분 후, 60분 후, 90분 후, 120분 후에서 정상군에 비해 혈당이 상승하였으며 유의성이 있었다. 황백 투여군은 대조군에 비해 모든 항목에서 혈당 강하 효과를 보였고, 식후 30분 후를 제외하고 유의성이 나타났다.

이는 황백이 인슐린 저항성에 유의성은 없었지만, 혈당 강하 작용에 유의성이 있었으며, 따라서 당뇨치료 중 혈당 강하에서의 적용 가능성을 보여준다고 할 수 있다.

내당능 이외의 다양한 대사작용 중 비만에 의해 비대해진 지방조직의 감소 및 장기에서의 염증작용 역시 대사성 질환의 이해에 있어 중요한 지표이다.

부고환 지방은 지방조직의 변화를 평가하기 위

한 지표로 사용된다. 간의 무게는 고지방 식이 섭취에 의해 간 조직에서 지질대사의 이상이 초래되면 지질의 침착에 의해 증가하며, 간 내 염증으로 인하여 IL-6와 TNF- α 발현에 따라 그 무게가 증가한다는 박 등의 연구²²에 비추어 볼 때, 간의 무게 증가는 식이로 인한 비만과 염증으로 인한 상태를 알 수 있는 간접적인 지표가 된다.

부고환 지방조직의 무게는 대조군에서 정상군에 비해 유의성 있는 상승이 있었으며, 황백 투여군은 대조군에 비해 무게는 감소하였으나 유의성은 없었다.

간의 무게는 대조군에서 정상군에 비해 유의성 있는 무게 상승이 있었으나, 황백 투여군은 대조군에 비해 무게는 감소하였으나 유의성은 없었다.

비만은 지방세포 내부로의 대식세포의 유입을 도와 낮은 수준의 만성적인 염증 상태를 유발하며, 이러한 대식세포를 Adipose tissue macrophage (ATM)이라 한다. 또한 ATM은 TNF- α , IL-6, MCP-1와 같은 전염증성 사이토카인을 생성하며, 이러한 사이토카인과 케모카인은 인슐린 신호 전달 단백질의 활성을 감소시켜, 인슐린 작동을 차단하고 인슐린 저항상태가 된다²³. 따라서 인슐린 저항성을 평가하기 위한 방법으로 ATM의 숫자와 그 중 CD45와 반응한 macrophage를 측정하여 그 percentage를 분석하였다.

ATM의 숫자는 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 상승하였으며, 황백 투여군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.

CD45+ cell은 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 상승하였으며, 황백 투여군은 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다.

ATM과 CD45+ cells의 비율은 대조군의 비율이 정상군에 비해 유의하게 상승하였고, 황백 투여군의 비율은 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다.

이는 황백 투여군이 지방조직 내의 macrophage의 침착은 억제하지만, 염증 상태의 개선 및 인슐

린 저항상태의 개선에 유의하다는 결론은 얻을 수 없었다.

마지막으로 지방조직에서 macrophage 활성화 및 침윤으로 인하여 상승하는 인슐린 저항성과 대사성 질환과의 연관성을 파악하고자 cytokine 및 macrophage 활성화를 판단하기 위한 표지자를 검출, 분석하였다.

TNF- α 는 지방조직에서 증가하며, TNF- α 의 중립화는 인슐린을 향상시키며, 인슐린 활동을 증가시킨다²⁴. 황백 투여군은, 정상군에 비해 유의하게 TNF- α 가 증가한 대조군에 비해 유의하게 억제하였다.

IL-10은 항염증성 사이토카인으로 동맥경화성 질환에 의한 과도한 세포손상에 유의한 것으로 알려져 있다²⁵. IL-10은 대조군에서 정상군에 비해 생성량이 적었고, 유의성이 있었다. 황백 투여군은 대조군에 비해 IL-10 생성량이 많았으며 유의성이 있었다.

이는 황백이 항염증성 cytokine인 IL-10의 발현을 증가시키며, 인슐린 저항성을 높이는 cytokine인 TNF- α 가 대식세포에서 분비되는 것을 억제함으로써, 대식세포의 활동 및 염증 반응의 억제에 유의하다는 결론을 얻을 수 있었다.

이번 연구를 종합하면, 비만이 유발된 동물모델에서 황백은 체중감소 및 비만 자체를 개선시키지는 못하였으나, 혈당 상승을 억제하였고, 항염증 작용이 있음이 나타났다.

항산화 작용과 혈당 감소라는 기존 연구들¹⁵⁻¹⁸의 연장선상에서, 황백의 혈당 감소 효과 역시 본 실험에서도 입증되었다. 염증 상태의 관리는 지방 세포에서의 염증 매개 인자 정상화를 통한 인슐린 저항성의 개선을 가져올 수 있으며, 이는 비만의 원인인 혈당 대사기능의 저하를 막는 치료법인 동시에, 만성 염증상태의 비만 양상의 개선에 영향을 준다는 점에 비추어 볼 때, 황백의 항염증 작용과 인슐린 저항성 개선 효과가 비만의 생성 억제 뿐 아니라 비만 상태의 개선에 유의하다는 본 연구의

결과는 향후 대사 질환의 예방 및 치료에 중요하게 활용될 수 있을 것으로 생각한다. 다만 대사성 질환의 치료 및 비만 개선에 있어 황백의 장기적인 투여와 황백이 포함된 처방 등을 통한 다양한 임상연구는 추가적으로 필요하리라 생각한다.

V. 결 론

黃柏이 비만이 유발된 mouse의 생화학 지표, 비만 관련 지표에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 黃柏은 공복 시 혈당을 유의하게 감소시켰다.
2. 黃柏은 경구 당부하 혈당 수치를 투하 직후, 60분 후, 90분 후, 120분 후 유의하게 감소시켰다.
3. 黃柏은 Adipose tissue macrophage(ATM)의 숫자를 유의하게 감소시켰다.
4. 黃柏은 지방세포의 TNF- α 유전자 발현을 유의하게 감소시켰다.
5. 黃柏은 지방세포의 IL-10 유전자 발현을 유의하게 증가시켰다.

참고문헌

1. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999;282(22):2131-5.
2. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115(5):1111-9.
3. 강지혜, 유리나. 비만성 염증/대사질환 제어를 위한 기능성 식품성분의 활용 가능성. *대한비만학회지* 2012;21(3):132-9.
4. 박철영, 유형준. 염증과 비만. *대한내분비학회지* 2004;19(2):97-108.
5. 양유걸. 黃帝內經靈樞解釋. 서울: 성보사; 1980,

- p. 304, 416.
6. 편집부 저. *완역중약대사전*. 서울: 도서출판 정담; 2006, p. 5052-5.
7. 박철원, 김갑성. Lipopoly saccharide 유발 토끼 관절염에서 黃柏藥鍼이 관절염증의 억제에 미치는 영향. *대한침구학회지* 1998;15(1):229-48.
8. 김경희, 안순철, 이명선, 권오송, 오원근, 김민수, 등. 황백(Phellodendri Cortex)으로부터 분리된 지방세포 분화 저해물질. *한국식품과학회지* 2003; 35(3):503-9.
9. 김소희, 신은정, 현창기. 3T3-L1 지방세포에서 황백 추출물의 Glucose Uptake 촉진 및 인슐린 저항성 개선 활성. *생약학회지* 2005;36(4):291-8.
10. 김대영, 이수진, 안의수, 강현식. 유산소 운동이 아디포넥틴 유전자 다형성에 따른 비만관련 대사증후군 위험인자의 반응에 미치는 영향. *운동영양학회지* 2008;12(3):169-76.
11. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *JCI* 2003;112(12):1796-808.
12. 구승희. 대사질환-비만과 대사증후군 및 당뇨병에 관한 최신 연구를 중심으로 한 고찰. *생화학 분자생물학뉴스* 2010;30(4):29-36.
13. 한의과대학 본초학 편찬위원회. *本草學*. 서울: 영림사; 2000, p. 223-4.
14. 윤석희, 김형준 외 옮김. 동의보감. 경상남도 하동군: 동의보감 출판사; 2005, p. 1457, 2218.
15. 이문조, 박진우, 김동수, 김준기, 최달영, 김철호. 황백 열수추출물의 항산화활성과 아질산염 소거작용에 관한 연구. *대한동의병리학회지* 1999; 13(1):112-8.
16. 이종구, 최지영, 오준석, 정희욱, 최은향, 이희상, 등. 황백(黃柏)으로부터 멜라닌 생합성 억제 물질의 분리. *생약학회지* 2007;38(4):477-83.
17. 광동주. 황백(Phellodendri Cortex) 추출물이 구강균 *Streptococcus mutans*의 증식에 미치는 영

- 향. 한국위생과학회지 2004;10(2):99-107.
18. 김재영, 이현. 황백약침이 콜라겐 유도 관절염 생쥐에 미치는 영향. 대한경락경혈학회지 2007; 24(2):163-84.
 19. DCW Lau. Diabetes and weight management. *PCD* 2010;4(1):24-30.
 20. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000;23(1):57-63.
 21. 김정환. 당뇨병의 진단과 경구 당부하검사. 한국당뇨협회지 2005;5(1):34-6.
 22. Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* 2010;140(2):197-208.
 23. Oliver E, McGillicuddy F, Phillips C, Toomey S, Roche HM. The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA. *PNS* 2010;69(2):232-43.
 24. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994;43(1):1271-8.
 25. Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggin E, Lesèche G, Tedgui A. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *ATVB* 1999;19(1):611-6.