

고지방식이 유도 비만 마우스에서 황련, 단삼, 육계 복합추출물의 비만 개선 및 당뇨 예방 효과

정수민^{1†} · 권세은^{1†} · 강석용² · 김수진³ · 정효원^{1,2} · 박용기^{1,2}

¹동국대학교 한의과대학 본초학교실, ²동국대학교 한방신약개발센터, ³동국대학교 의과대학 경주병원 마취통증의학교실

Anti-Obesity and Anti-Diabetic Effects of a Polyherbal Extract Consisting of *Coptidis Rhizoma*, *Salviae Miltiorrhizae Radix*, and *Cinnamomi Cortex* in High Fat Diet-Induced Obesity Mice

Su Min Jung^{1†}, Se Eun Kwon^{1†}, Seok Yong Kang², Su Jin Kim³, Hyo Won Jung^{1,2}, Yong-Ki Park^{1,2}

¹Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, ²Korean Medicine R&D Institute, Dongguk University, ³Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Dongguk University Gyeongju Hospital, College of Medicine, Dongguk University

Received: October 22, 2021
Revised: November 8, 2021
Accepted: November 20, 2021

[†]These authors contributed equally to this work as co-first authors.

Correspondence to: Yong-Ki Park
Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, 123 Dongdaero, Gyeongju 38066, Korea
Tel: +82-54-770-2661
Fax: +82-54-770-2647
E-mail: yongki@dongguk.ac.kr

Correspondence to: Hyo Won Jung
Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, 123 Dongdaero, Gyeongju 38066, Korea
Tel: +82-54-770-2367
Fax: +82-54-770-2647
E-mail: tenzing2@hanmail.net

Copyright © 2021 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: We investigated the effects of Clean-DM4 (C-DM4), a polyherbal extract consisting of *Coptidis Rhizoma*, *Salviae Miltiorrhiza Radix*, and *Cinnamomi Cortex* on high fat diet (HFD)-induced obesity and diabetes in mice.

Methods: The C57BL/6 mice (6 weeks) were fed a HFD for 8 weeks and then administered with C-DM4 extract at 500 mg/kg (p.o.) once daily for 4 weeks. The changes of body weights, calorie intakes, and fasting blood glucose (FBG) levels were measured in mice. The serum levels of glucose, insulin, total cholesterol, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) were measured in mice by enzyme-based assay. It was also observed the histological changes of pancreas, liver, and fat tissues with hematoxylin and eosin (H&E) staining.

Results: The increase of calorie intakes and FBG levels in HFD-induced obesity mice was significantly decreased by oral administration of C-DM4 extract. C-DM4 extract administration was significantly reduced the increased levels of glucose, insulin, total cholesterol, AST, and ALT in obesity mice. In addition, C-DM4 extract inhibited lipid droplet accumulation in liver tissues of obesity mice, hyperplasia of pancreatic islets, and enlargement of adipocytes in adipose tissues.

Conclusions: Our study indicates that C-DM4 extract could help improve obesity and to prevent diabetes progression.

Key Words: Obesity, Type 2 diabetes mellitus, High-fat diet, *Coptidis rhizoma extract*, *Salvia Miltiorrhiza*, *Cinnamomi Cortex*

서론

비만(obesity)은 식습관, 생활습관, 연령, 사회경제적 요소, 유전 등 다양한 위험요인이 복합적으로 작용하여 체내에 지방이 과다하게 쌓이는 질병으로 체질량 지수(body mass index, BMI)가 25 kg/m² 이상을 의미한다¹⁾. 이러한 기준에 따라 우리나라 성인 비만 유병률은 2018년 35.7%

로 최근 10년 간 복부비만 유병률과 함께 크게 증가하고 있다. 비만은 에너지 소모량에 비해 섭취량이 많은 상태에서 체지방 증가로 인해 발생하며 비만 환자의 90%가 과도한 음식 섭취에 따른 칼로리 과잉과 상대적인 활동량 감소로 인한 1차성 비만에 해당한다¹⁾. 따라서 비만의 치료도 식사조절이나 운동, 행동조절 등이 활용되며, 보조적으로 식욕 억제제나 지방흡수 차단제 등을 통한 약물요

법과 수술치료 등이 시행되고 있다. 그러나 여전히 약물 치료의 각종 부작용 문제가 쟁점이 되고 있어 비만 치료 및 예방을 위한 보다 안전하고 효과적인 약물소재 발굴과 치료제 개발이 필요하다.

비만은 비만으로 그치는 것이 아니라 각종 질병의 원인이 될 수 있는데¹⁾, 특히 인슐린 저항성(insulin resistance) 발생과 제2형 당뇨병으로의 진행에 근본적인 위험 인자로 알려져 있다²⁾. 실제 인슐린 저항성이 있는 경우 대부분 비만이거나 과체중인 경우로 보고되고 있으며³⁾, 지방 조직의 기능 이상 및 지방대사과정의 변화, 비지방조직에서의 만성 염증반응 유발, 항산화 방어의 불균형으로 인한 산화 스트레스(oxidative stress) 발생 등이 인체 각 조직의 인슐린 감수성에 영향을 주게 되어 당뇨병 발생과 진행에 기여하게 된다²⁾.

한의학에서는 비만한 사람을 肥膏肉人이라 하며, 주로 濕, 痰, 氣虛 등에서 기인하고, 脾, 肺, 腎의 기능과 밀접하게 관련되어 氣虛, 활동 감소, 스트레스, 영양과잉 등에 의한 肺의 宣發肅降, 脾의 運化輸布, 腎의 蒸騰氣化 기능 저하로 수액대사(濕, 痰) 이상이 유발되면서 비생리적 체액저류 상태가 된다고 보고 있다^{4,5)}. 따라서 비만 치료를 위하여 補氣建脾, 化濕利水去痰, 通腑消導, 活血通絡 등의 방법과⁵⁾ 肥感丸, 體減行血薏苡仁湯, 體減補血安神湯, 體減防風通聖散, 麻黃, 山查, 大黃 등 다양한 약물을 사용하고 있다^{6,7)}.

黃連(*Coptidis Rhizoma*)은 미나리아재비과(Ranunculacea)에 속하는 日黃連(*Coptis japonica* Makino) 또는 味連(*C. chinensis* Franch.)의 뿌리줄기로 苦寒한 性味로 心火를 瀉하고, 腸胃의 濕熱을 淸하여 淸熱燥濕 작용으로 亢盛으로 인한 煩熱神昏, 心煩不眠 및 腸胃에 濕熱이 鬱結되어 생긴 濕熱痞滿, 嘔吐吞酸, 瀉痢, 黃疸 등을 치료하는 효능이 있다⁸⁾. 또한 황련은 실험연구에서 포도당 및 지질 대사 개선⁹⁾, 항산화¹⁰⁾, 혈당 강하¹¹⁻¹³⁾, 항염증^{10,14)} 효과가 보고되었고, 인슐린 저항성 개선¹⁴⁾, 제2형 당뇨병 개선¹⁵⁻¹⁸⁾, 이상 지질혈증 개선¹⁹⁾, 지방축적 감소를 통한 비알콜성 지방간

개선 효과²⁰⁾ 등이 알려져 있다.

丹參(*Salvia Miltiorrhiza Radix*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)의 뿌리로 苦微寒하여 心, 肝의 血分에 들어가 血行을 通暢, 瘀滯를 疏散시켜 通經, 止痛, 散瘀, 消腫의 효과가 있으며, 活血祛瘀 효과로 散瘀, 止痛하여 血瘀氣滯로 의한 心腹疼痛, 癥瘕積聚, 跌打損傷을 개선시킬 수 있다⁸⁾. 단삼의 실험연구로 항비만²¹⁾, 항염증^{21,22)}, 항산화²³⁾ 효능을 통한 제2형 당뇨병 개선²⁴⁾ 및 산화 손상에 따른 당뇨병성 혈관 손상²⁵⁾에 대한 개선 효과가 보고된 바 있다.

肉桂(*Cinnamomi Cortex*)는 녹나무과(Lauraceae)에 속하는 肉桂(*Cinnamomum cassia* Prexel)의 나무껍질(樹皮)이며 甘熱하여 腎陽의 氣化를 통해 수액대사를 조절하는 補元陽의 효능으로 亡陽虛脫, 虛陽浮越을 치료하며, 益火消陰하여 脾의 運化작용을 회복시키는 暖脾胃 효능으로 腹痛泄瀉, 寒疝奔豚을 치료한다. 또한 辛熱하여 血中の 滯氣를 소통시켜 除積冷, 通血脈 효과로 腰膝冷痛 經閉癥瘕를 개선시킬 수 있다⁸⁾. 육계의 실험연구로 고혈당증 개선을 통한 항당뇨 효과²⁶⁾, 당뇨병성 심혈관 질환에 대한 항염증 효과²⁷⁾ 및 지방 산화 억제와 백색지방의 갈색지방 유도를 통한 항비만 효과²⁸⁾가 보고되었다.

본 연구에서는 황련, 단삼, 육계의 본초학적 특성 및 현대 약리연구 결과들을 바탕으로 세 가지 약물이 혼합된 복합추출물인 C-DM4를 제작하고, 장기간 고지방식이로 비만이 유발된 마우스 모델에서의 비만 개선 및 제2형 당뇨병 예방 효과를 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 약물 제조

실험에 사용한 황련, 단삼, 육계는 광명당제약(Ulsan, Korea)에서 각 규격약재를 구입한 후 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선한 뒤 추출물 제조에 사용하였으며, 복합 추출물(C-DM4)의 구성은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of C-DM4

English name	Scientific name	Latin name	Weight (g)	Yield (%)
Coptis Rhizoma	<i>Coptis japonica</i> Makino, <i>C. chinensis</i> Franch, <i>C. deltoidea</i> C.Y. Cheng et Hsiao, <i>C. teeta</i> Wall.	Coptidis Rhizoma	40	41.38
Salvia Miltiorrhiza Root	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	Salviae Miltiorrhiza Radix	120	
Cinnamon Bark	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl	Cinnamomi Cortex	40	

먼저 각 약재를 일정 구성으로 혼합하여 정수된 물 2 L와 함께 용기에 넣고 95°C에서 3시간 동안 1차 추출한 다음 동일한 비율로 2차 추출을 실시하였다. 추출물은 1호 와트만 거름종이(Whatman paper filter No. 1; Whatman, Maidstone, England)로 여과하였으며, 회전식 감압농축기를 이용하여 농축한 다음 동결건조기를 이용하여 건조시켰다. 수율은 41.56%였다. C-DM4 열수추출물은 냉장보관하면서 실험 직전에 생리식염수에 적정 농도로 완전 용해시킨 후 동물실험을 위한 시험약물로 사용하였다.

2. 당뇨병 동물모델 제작

당뇨병 동물모델 제작을 위하여 수컷 6주령 C57BL/6 마우스(18-19 g)를 (주)코아텍(Pyeongtaek, Korea)에서 구입한 후 1주일 순화시켜 사용하였다. 실험기간 동안 사육 환경은 일광주기 12시간, 온도 23±2°C, 습도 50±10%로 일정하게 유지하였으며 정수 물을 공급하였다. 당뇨병 유발 기간에는 정상군은 일반 고형사료(3.1 kcal, 14% protein; Teklad, Envigo, WI, USA)를 공급하고, 당뇨병을 유발할 대조군은 12주 동안 고지방 사료(5.24 kcal, 60% fat, 30% carbohydrate; Teklad)를 급여하였다. 실험동물 관리 및 처치는 식약처 동물보호법 13조 규정을 준수하고 동국대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인을 받아 수행하였다(IACUC-2021-05).

정상군(control, Cont)을 제외한 모든 실험군은 고지방식이(high fat diet, HFD)를 급여한 뒤 몸무게 증가가 10% 이상 일어난 개체들을 선별하여 당뇨유발 대조군(HFD)으로 설정하였다. 실험군은 대조군에 C-DM4 추출물을 500 mg/kg/body weight (b.w.) 투여한 약물군(C-DM4), 대조군에 항당뇨약인 메트포르민(metformin, Met)을 500 mg/kg/b.w. 투여한 양성 대조군(Met)으로 구분하였으며 각 군에는 5 마리씩 배치하였다. 또한 정상군을 제외한 모든 실험군은 약물을 투여하는 4주 간 고지방식이를 유지하였으며 약물은 매일 정해진 시간에 존데를 사용하여 1회 경구 투여하였다.

모든 실험 종료 후 실험동물을 12시간 금식시킨 뒤 의료용 산소 30%, 아산화질소 70% 혼합 이소플루란(isoflurane)을 흡입시켜 마취를 실시하였으며, 복대 정맥 채혈을 통해 혈액을 얻었다. 또한 간과 췌장 조직을 분리하여 조직 관찰표본 제작에 사용하였다.

3. 생리적 변화 측정

비만과 당뇨병 발생에 의한 생리현상 변화를 확인하기 위하여 약물을 투여하는 동안 매주 1회 체중 변화(body weight, BW)를 측정하였다. 또한 모든 실험동물에게 매주 일정한 양의 사료를 급여하고 남은 양을 측정하여 섭취량(food intake)의 변화를 측정하였으며, 섭취량은 경구투여 기간인 9~12주간 섭취한 총열량(total calorie intake, kcal)으로 계산하였다.

4. 혈액조성 변화 측정

비만과 당뇨병 발생에 의한 혈액성분 변화를 확인하기 위하여 약물 투여기간에 매주 1회 저녁 8시부터 12시간 이상 금식시킨 뒤 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취하고 혈당측정기(Accu-Check; Roche Diabetes Care GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 공복혈당(fasting blood glucose, FBG)을 측정하였다.

또한 실험 종료 후 혈액을 수집하고 혈청을 분리한 후 자동혈액분석기(automatic clinical biochemistry analyser) (FDC7000i; Fujifilm Co., Tokyo, Japan) 및 효소면역화학반응법(ELISA) 등을 이용하여 포도당(glucose)(1050; Fujifilm Co.), 인슐린(insulin)(90080; Crystal Chem Inc., Elk Grove Village, IL, USA), 총콜레스테롤(total cholesterol, T-CHO) (1450; Fujifilm Co.) 및 aspartate aminotransferase (AST)(3150; Fujifilm Co.), alanine aminotransferase (ALT)(3250; Fujifilm Co.)의 농도를 측정하였다. 각 지표별 농도는 측정 키트 내 표준용액을 기준으로 정량하였다.

5. 조직병리 변화 관찰

실험 종료 후 간과 췌장, 그리고 부고환 지방 조직을 분리하고 4% paraformaldehyde 용액에서 24시간 이상 고정시킨 후 10~30% sucrose 용액으로 가라앉히고 자동조직과정 처리기를 통해 탈수, 투명, 침투화 과정을 거쳐 표본을 제작하였다. 이를 파라핀으로 포매한 뒤 조직절편기(microtome)를 이용하여 4~6 um 두께의 절편을 제작하였으며 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 조직 절편을 xylene으로 탈파라핀화하고, hematoxylin 용액으로 6분간 염색을 실시하였다. 이를 다시 0.1~1% HCl이 각각 포함된 75% alcohol로 세척한 후 eosin 용액을 떨어뜨려 3분간 대조 염색을 실시하고 95~100% 알코올로 탈수, 투명과정을 거친 후 permount로 봉입하여 구조적 변

화를 현미경으로 관찰하였다.

6. 통계분석

모든 실험결과는 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램(GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 군 당 마우스의 평균(mean)±표준편차(standard deviation) 값으로 계산하였으며, 정상군과 당뇨병 유발 대조군 또는 대조군과 약물 투여군 간 유의성을 one-way analysis of variance 및 Turkey's test를 통해 검정하였으며, 신뢰구간이 95% 이상인 경우에만 유의성(P<0.05)이 있는 것으로 판정하였다.

결과

1. 체중 및 칼로리 섭취량 증가에 대한 효과

비만 마우스에서 생리현상 변화에 대한 C-DM4 추출물의 효과를 확인하기 위해 체중(BW) 및 칼로리 섭취량(calorie intake) 변화를 측정하였다.

먼저 체중 변화에서는 정상군(Cont, 26.00±0.89 g)에 비해 비만 유발 대조군(HFD)에서 유의한 체중 증가(40.20±2.78 g, P<0.001)가 나타났으며, C-DM4 추출물 투여 후 대조군(36.20±0.84 g)에 비하여 감소하였다. 또한 메트포민 투여군(Met)에서 대조군에 비해 유의한 감소(33.67±2.16 g, P<0.001)가 관찰되었다(Fig. 1A).

칼로리 섭취량에서는 정상군(380.3±35.98 kcal)에 비해 대조군(447.1±16.01 kcal)에서 증가하였고, 이는 C-DM4 추출물 투여로 유의하게 감소하였으며(385.1±30.40 kcal, P<0.05) 메트포민 투여로 유의한 감소를 나타내었다(373.4±22.79 kcal, P<0.05)(Fig. 1B).

2. 공복 혈당 증가에 대한 효과

비만 마우스에서 C-DM4의 당뇨 예방 효과를 확인하기 위하여 공복혈당(FBG) 변화를 측정하였다.

그 결과 12주에 비만 유발 대조군의 혈당 수치는 정상군(105.60±8.20 mg/dL)에 비해 유의하게 증가(171.20±12.91 mg/dL, P<0.001)하였으며, 이는 C-DM4 추출물 투여(162.60±6.19 mg/dL) 및 메트포민(162.20±10.55 mg/dL) 투여로 감소하였다(Fig. 2).

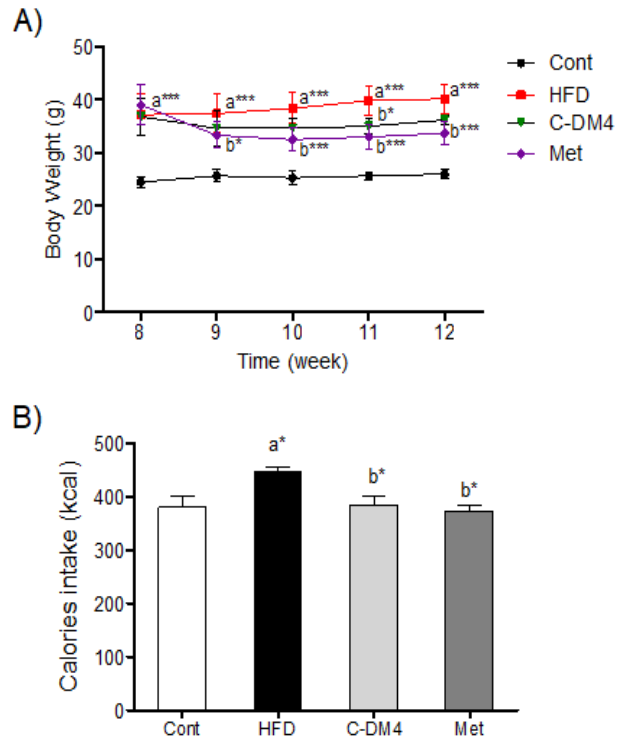


Fig. 1. Effects of C-DM4 extract on the increases of body weights and food intakes in high fat diet-induced obesity mice. (A) Body weights were measured in mice once a week during drug administration. (B) Calorie intake was calculated using food intakes at 9~12 week. Data were presented as mean±standard deviation (n=5 per a group). *P<0.05, and ***P<0.001 vs. control (a) or HFD group (b). Cont: normal group, HFD: high fat diet-induced diabetic control group, C-DM4: C-DM4 at 500 mg/kg-administrated group, Met: metformin-administrated group.

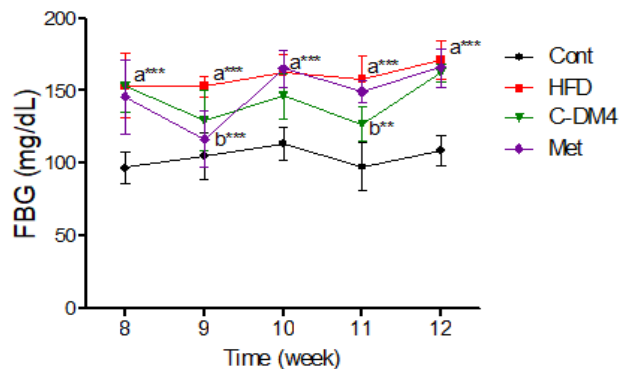


Fig. 2. Effects of C-DM4 extract on the levels of fasting blood glucose in high fat diet-induced obesity mice. The levels of FBG were measured in whole blood of mice once a week for 4 weeks. Data were presented as mean±standard deviation (n=5 per a group). **P<0.01, and ***P<0.001 vs. control (a) or HFD group (b). Cont: normal group, HFD: high fat diet-induced diabetic control group, C-DM4: C-DM4 at 500 mg/kg-administrated group, Met: metformin-administrated group, FBG: fasting blood glucose.

3. 혈액 조성 변화에 대한 효과

비만 마우스에서 C-DM4 추출물 투여에 의한 혈액 성분 변화에 대한 개선 효과를 확인하기 위해 혈액으로부터 혈청을 분리하여 포도당(glucose), 인슐린(insulin), 총콜레스테롤(T-CHO) 및 AST와 ALT의 농도를 측정하였다.

먼저 포도당 수치는 정상군(Cont, 181.8±11.50 mg/dL)에 비해 비만 유발 대조군(HFD)에서 유의하게(241.40±12.82 mg/dL, $P<0.001$) 증가하였고, 이는 C-DM4 (219.00±18.36 mg/dL, $P<0.05$) 및 메트포민 투여(190.60±22.087 mg/dL, $P<0.01$)에 의해 유의하게 감소하였다(Fig. 3A). 인슐린 수치에서도 정상군(0.31±0.07 ng/mL)보다 대조군에서 유의하게(0.72±0.25 ng/dL, $P<0.01$) 증가하였고, C-DM4 추출물(0.41±0.14 ng/dL, $P<0.05$) 및 메트포민(0.33±0.09 ng/dL, $P<0.01$) 투여로 유의하게 감소하였다(Fig. 3B). 또한 총콜레스테롤(T-CHO) 수치에서는 정상군(88.80±3.66 mg/dL)에 비해 대조군에서 유의하게(127.40±14.04 mg/dL, $P<0.001$) 증가하였고, C-DM4 (130.60±7.63 mg/dL, $P<0.05$) 및 메트포민 투여(110.40±5.54 mg/dL, $P<0.001$)에 의해 유의하게 감소를 나타내었다(Fig. 3C).

한편, 간 손상지표 중 하나인 AST 수치는 정상군(48.80±1.94 U/L) 대비 대조군에서 유의한(92.20±27.57

U/L, $P<0.001$) 증가를 나타내었고, C-DM4 추출물 투여에 의해 유의하게(68.40±10.13 U/L, $P<0.05$) 감소하였다(Fig. 3D). 또한 ALT 수치도 대조군에서 유의한(63.50±21.52 U/L, $P<0.001$) 증가를 나타내었으며, C-DM4 (46.80±11.91 U/L, $P<0.01$) 및 메트포민(42.40±4.88 U/L, $P<0.01$) 투여로 감소하였다(Fig. 3E).

4. 간, 췌장, 지방 조직의 구조적 변화에 대한 효과

12주의 고지방식이에 따른 간, 췌장, 지방조직의 구조적 손상에 대한 C-DM4 추출물의 개선 효과를 확인하기 위하여 각 조직을 H&E 염색한 후 현미경으로 관찰하였다.

먼저 간 조직에서는 정상군(Cont)에 비해 비만 유발 대조군(HFD)에서 다량의 지방 방울(lipid droplets) 축적이 관찰되었으며(Fig. 4A), 이는 C-DM4 추출물 및 메트포민 투여로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4A). 이와 함께 간 조직의 무게를 측정한 결과 정상군(0.97±0.05 g)에 비해 대조군에서 유의한(1.24±0.21 g, $P<0.05$) 증가를 나타내었고, 이는 C-DM4 (0.90±0.05 g, $P<0.01$) 및 메트포민(0.99±0.05 g, $P<0.05$) 투여로 감소하였다(Fig. 4B).

췌장 조직에서는 정상군에 비해 대조군에서 췌장섬(islet of Langerhans)의 크기가 증가하는 것을 관찰하였으

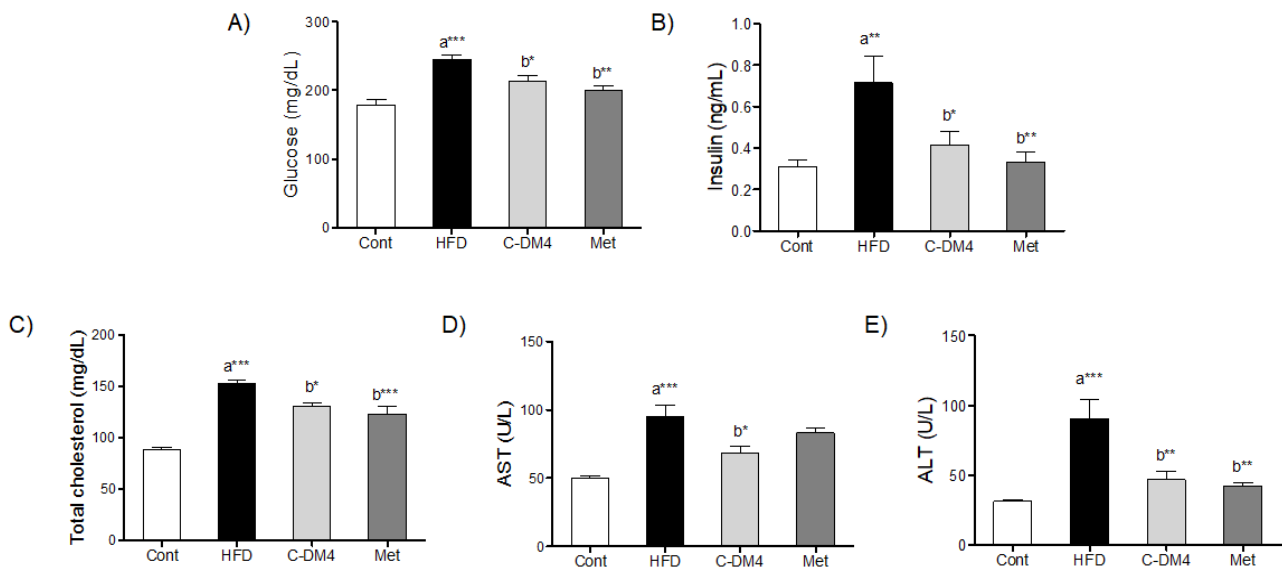


Fig. 3. Effects of C-DM4 extract on the serum levels of serological markers in high fat diet-induced obesity mice. The levels of glucose (A), insulin (B), total cholesterol (C), AST (D), and ALT (E) were measured in the sera of mice after administration of drugs. Data were presented as mean±standard deviation (n=5 per a group). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, and *** $P<0.001$ vs. control (a) or HFD group (b). Cont: normal group, HFD: high fat diet-induced diabetic control group, C-DM4: C-DM4 at 500 mg/kg-administrated group, Met: metformin-administrated group, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase.

며, 이는 C-DM4 추출물 투여로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4C). 또한 췌장 조직의 무게 변화에서도 정상군 (0.21 ± 0.02 g)에 비해 대조군에서 유의한(0.28 ± 0.03 g, $P < 0.001$) 증가를 나타내었고, 이는 C-DM4 (0.22 ± 0.01 g, $P < 0.01$) 및 메트포민(0.21 ± 0.01 g, $P < 0.001$) 투여로 감소하

였다(Fig. 4D).

지방 조직에서는 정상군에 비해 대조군에서 지방세포의 크기가 증가하는 것을 관찰하였으며, 이는 C-DM4 추출물 및 메트포민 투여로 감소하는 것을 관찰하였다(Fig. 5).

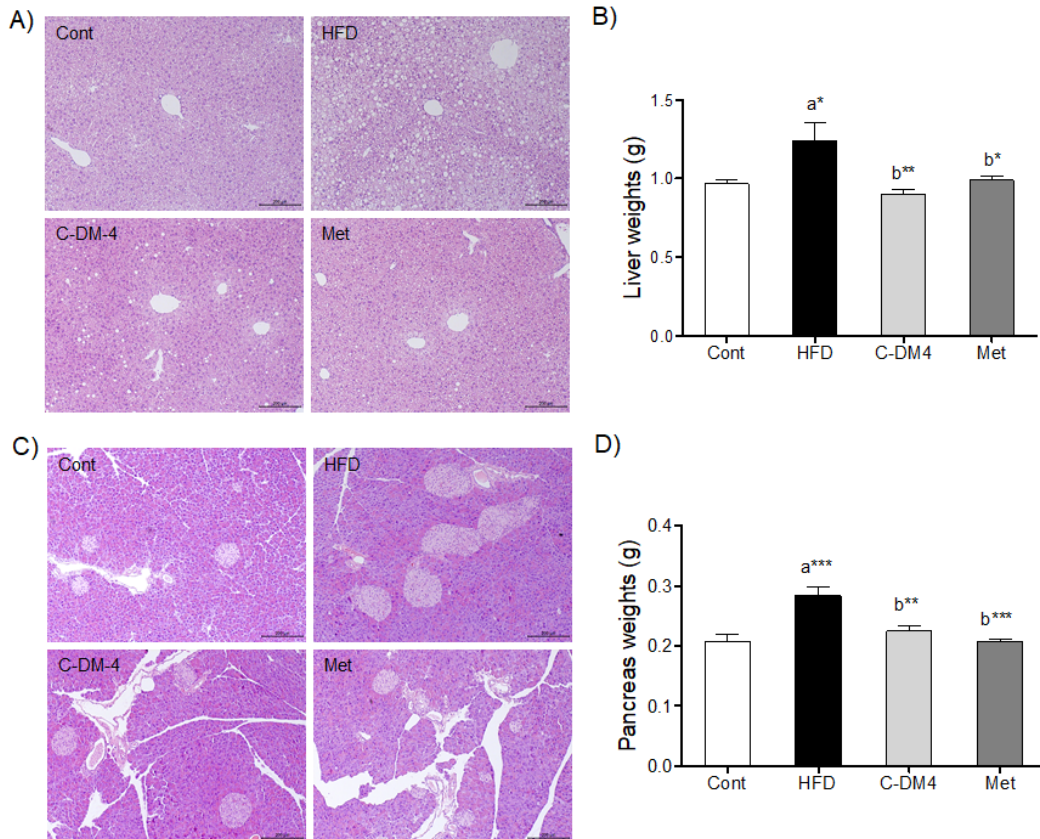


Fig. 4. Effects of C-DM4 extract on the histological changes of liver and pancreas tissues in high fat diet-induced obesity mice. The liver (A) and pancreas (C) tissues were stained with hematoxylin and eosin and observed under microscope ($\times 200$). The weights of liver (B) and pancreas (D) were measured in mice at 12 week. Data were presented as mean \pm standard deviation ($n=5$ per a group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. control (a) or HFD group (b). Cont: normal group, HFD: high fat diet-induced diabetic control group, C-DM4: C-DM4 at 500 mg/kg-administrated group, Met: metformin-administrated group.

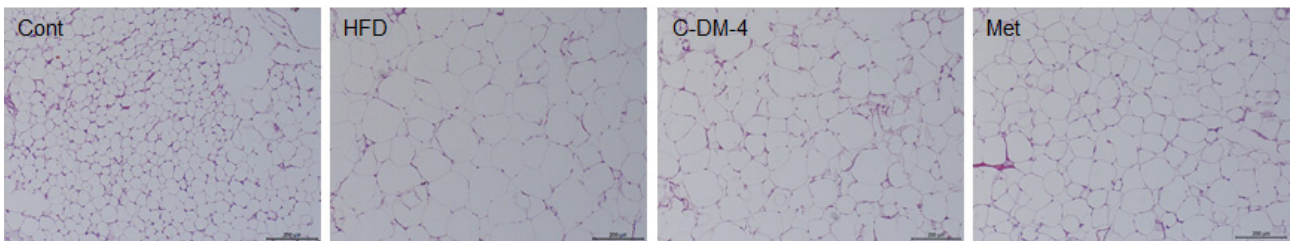


Fig. 5. Effects of C-DM4 extract on the histological changes of epididymal fat tissues in high fat diet-induced obesity mice. The fat tissues were stained with hematoxylin and eosin and observed under microscope ($\times 200$). The weights of fat were measured in mice at 12 week. Cont: normal group, HFD: high fat diet-induced diabetic control group, C-DM4: C-DM4 at 500 mg/kg-administrated group, Met: metformin-administrated group.

고찰

우리나라는 비만 환자의 진료비가 2019년 212억 6,000 만원으로 2015년에 비해 약 21배 이상 증가하였고, 여성 비만이 남성보다 2.8배 높으며, 특히 20대 미만 아동 및 청소년의 비만 인구 증가가 높아지고 있어서 사회적 문제 질환으로 대두되고 있다²⁹⁾. 그러나 아직은 비만이 질병이라는 인식이 부족하고, 운동이나 식이요법으로 해결하는 것이 어렵기 때문에 비만 예방과 치료제 개발이 매우 필요한 실정이다.

비만은 고혈압, 동맥경화, 심근경색, 고지혈증 등과 관련되고, 특히 인슐린 작용에 대한 저항성을 유발하고 인슐린을 분비하는 췌장 베타세포의 기능을 떨어뜨림으로써 혈당조절 실패에 따른 제2형 당뇨병 발생과 매우 밀접하게 연관되어 있다. 실제 당뇨병 환자의 74.9%가 과체중이거나 비만인 것으로 보고되고 있어³⁰⁾, 비만 개선을 통한 당뇨병 예방은 현대사회에 중요한 건강 이슈이기도 하다.

한의학에서 비만은 肥, 肥人, 肥貴人에서 肥胖, 肥胖症, 肥胖病이 발생한 것으로 보며, 한의임상치료는 氣虛, 肝氣鬱結, 膏粱厚味 등에 의해 濕痰, 瘀血이 축적된 것을 耳鍼, 體鍼, 전기지방분해침 등을 활용한 鍼刺 방법³¹⁾과 사상체질에 따라 적절히 섭생을 조절하는 치료 및 麻黃, 薏苡仁, 當歸, 甘草, 蘿菔子, 川芎, 山查, 大黃, 白朮, 葛根, 桂枝 등 다양한 약제와 太陰調胃湯, 體減薏苡仁湯, 調胃升清湯, 防風通聖散, 肥感丸, 體減補血安神湯, 體減防風通聖散 등의 처방을 활용한 약물요법을 활용하고 있다³¹⁻³³⁾.

본 연구의 C-DM4는 황련, 단삼, 육계로 구성된 복합추출물로 각 구성약물의 항비만 및 항당뇨 효과와 관련하여 많은 실험연구가 보고된 바 있다. 황련은 포도당 및 지질 대사 개선^{9,19)}, 항산화¹⁰⁾, 혈당 강하¹¹⁻¹³⁾, 항염증^{10,14)}, 인슐린 저항성 개선¹⁴⁾, 비알콜성 지방간 개선 효과²⁰⁾ 등에 의한 제2형 당뇨병 개선¹⁵⁻¹⁸⁾ 효과가 보고되었고, 단삼은 항비만²¹⁾, 항염증^{21,22)}, 항산화²³⁾ 효능을 통한 당뇨병 개선²⁴⁾과 산화적 스트레스에 따른 당뇨병성 혈관 이상²⁵⁾ 개선 효능이 보고되었다. 또한 육계도 혈당 강하²⁶⁾, 당뇨병성 심혈관 질환에서의 항염증 효과²⁷⁾, 지방산화 억제 및 백색지방의 갈색지방화 유도²⁸⁾ 등이 보고되었다. 따라서 이러한 구성약물의 항비만, 항당뇨 효과연구들로부터 C-DM4 복합약물의 효능을 예측해볼 수 있다. 또한 황련의 淸熱燥濕 작용에 의한 濕熱痞滿을 치료하는 효능과 단삼의 活

血祛瘀 작용으로 인한 血瘀氣滯 개선 및 육계의 通血脈하는 작용을 개선시킬 수 있으며, 이는 각 약물이 비만에서 濕熱과 瘀血이 축적된 상태를 개선시키는 효과와 연관시켜 볼 수 있다.

본 연구에서는 비만한 병증을 만들기 위해 C57BL/6 마우스에 12주간 매일 1회 고지방식을 실시하여 체중 증가, 칼로리 섭취 증가, 공복혈당 증가, 혈액 내 인슐린 및 총콜레스테롤 증가를 확인하였다. 칼로리 섭취 변화는 정상군과 비만 유발 대조군간 식이 유형이 다르기 때문에 섭취량을 측정하여 비교하는 대신 총 섭취량에 정상식이 또는 고지방식이의 그램(g)당 열량으로 계산하여 칼로리 섭취량으로 산출하였다. 또한 4주 동안의 C-DM4 추출물 투여가 칼로리 섭취, 공복혈당, 인슐린 및 총콜레스테롤 증가의 감소 효과를 나타냄을 확인하였다. 비만에 따른 체 내 지방 축적은 인슐린 활동을 방해하여 각 조직에서의 인슐린 저항성 발생을 유발하고, 췌장 과부하에 의한 베타세포에서의 인슐린 분비를 오히려 자극하게 됨으로써 당뇨병으로의 이행에 기여하게 된다. 비만은 과도한 체중이 특징이며 BMI는 체중(kg)을 신장의 제곱(m²)으로 나눈 값으로 체중 감소의 유도는 비만 치료에 중요한 목표이기도 하다. 따라서 C-DM4 추출물 투여에 따른 섭취량의 감소는 비만 환자에서의 다양한 합병증 발생과 당뇨병과 같은 만성 질환으로의 이환율을 감소시키는데 도움이 될 수 있음을 의미한다. 또한 C-DM4 추출물 투여에 의한 섭취량 감소 효과는 식욕억제와 연관될 것으로 보이며 이에 대해서는 식욕억제 관련 호르몬 측정 등 추가연구를 통해 검증해 볼 필요가 있다. 더욱이 C-DM4 추출물은 인슐린 분비 증가를 유의하게 감소시켰으며 췌장조직에서도 췌장섬(pancreatic islet, islet of Langerhans) 과증식(hyperplastic pancreatic islet)의 억제가 관찰되었다. 비만으로 인한 인슐린 분비 증가는 혈당 증가에 대한 보상적 반응으로 볼 수 있는데 혈당이 증가하게 되면 췌장섬 베타세포에서 인슐린 분비 요구에 대한 자극을 받게 되고³⁴⁾, 이는 췌장섬 과증식으로 인한 비대화로 이어질 수 있다. 본 연구에서도 비만 마우스의 췌장조직에서는 췌장섬의 과증식과 더불어 췌장 무게 증가 및 인슐린 분비 증가가 함께 관찰되었으며, 이는 C-DM4 추출물 투여로 모두 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 C-DM4 추출물이 비만에 따른 인슐린 저항성 발생과 이어지는 혈당 증가로 인한 췌장섬 인슐린 분비 자극과 이에 따른 과증식

손상을 막아줌으로써 당뇨병 발생 억제에 도움을 줄 수 있음을 의미한다.

한편 비만과 인슐린 저항성은 비알코올성 지방간 등의 지방변성에 가장 흔한 위험인자이며, 인슐린 저항성으로 인하여 발생하는 고인슐린혈증은 간에서의 지방 축적을 더욱 증가시키고, 지방산 산화를 억제하는 것으로 알려져 있다³⁵⁾. 한편, 비만 마우스의 혈액 내 총콜레스테롤 수치 증가와 간 조직에서의 다량의 지방방울(lipid droplets) 형성이 C-DM4 추출물 투여로 감소하는 것을 확인하였다. 총콜레스테롤, 중성지방, high-density lipoprotein (HDL)-콜레스테롤, AST, ALT 등의 수치 변화로 이상지질혈증을 평가할 수 있는데³⁶⁾, 특히 유리지방산(free fatty acids)이 중성지방 형태로 간에 저장되기 때문에 중성지방 수치가 높으면 비알코올성 지방간의 위험이 증가한다고 알려져 있다^{37,38)}. 본 연구에서도 고지방식이 유도 비만 마우스의 혈청 내 총콜레스테롤 수치의 유의한 증가가 관찰되었으며, C-DM4 추출물 투여는 총콜레스테롤 수치를 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다. 이러한 변화는 지방조직 관찰 결과에서 C-DM4 추출물 투여에 의한 지방세포 크기 증가의 감소 및 지방 간 무게 증가 억제 결과와 일치함을 확인하였다. 그러나 본 비만 마우스모델에서는 정상군과 비교하여 중성지방 수치의 유의한 변화가 관찰되지 않았고 HDL-콜레스테롤 수치는 오히려 대조군에서 유의하게 증가하였으며, 이는 C-DM4 추출물 투여로 조절되지 않는 것으로 나타났다. 따라서 고지방식이 기간에 따른 지방대사 변화와 C-DM4의 이상지질혈증에 미치는 영향 등에 대해서는 좀 더 연구가 필요할 것으로 생각된다.

한편, 아미노 전달효소인 AST와 ALT는 세포성 간염과 같은 간 질환 유무를 추측할 수 있는 지표로서 특히 간세포에 주로 존재하는 AST가 간 손상의 특이적 지표로 많이 활용되고 있다. 본 연구에서 C-DM4 추출물 투여는 장기간 고지방식이에 따른 지방간 형성을 막아줌으로써 간 손상 억제에 따른 AST와 ALT 수치의 감소가 나타남을 알 수 있었다.

본 연구에서 대조약물로 현재 당뇨병 치료제로 널리 사용되고 있는 바이구아니드계(biguanides) 경구용 당뇨병 약인 메트포민을 사용하였으며, 메트포민 투여군에서도 C-DM4 추출물 투여군과 유사하게 고지방식이에 따른 칼로리 섭취량 증가, 혈청 내 포도당, 인슐린, 총콜레스테롤 및 ALT 수치의 증가를 유의하게 감소시키는 것으로 나타

났다. 따라서 추가연구로 C-DM4 추출물의 메트포민과의 병용투여를 통한 항비만, 항당뇨 효과를 비교해본다면 약의 부작용 감소 및 치료 효과 증진을 기대해 볼 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구결과로부터 황련, 단삼, 육계로 구성된 복합추출물인 C-DM4는 12주의 장기간 고지방식이로 비만이 유발된 마우스에서 체중 증가, 섭식량 증가와 공복혈당, 포도당, 인슐린, 총콜레스테롤 증가를 유의하게 감소시켰으며 지방간 형성과 췌장섬 비대에 따른 췌장 과부하 및 지방세포 증식을 효과적으로 억제시켜 줌으로써 항비만, 인슐린 저항성 개선을 통한 당뇨병 발생 예방에도 효과가 있는 것으로 나타났다. 이를 통해 C-DM4 추출물이 비만과 비만으로 인한 당뇨병 발생을 예방하는데 효과적인 약물로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

결론

본 연구에서는 12주간 고지방식이로 비만이 유발된 마우스에 4주간 황련, 단삼, 육계로 구성된 C-DM4 추출물을 투여한 후 비만 개선 및 당뇨병 예방 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. C-DM4 추출물은 비만으로 인한 칼로리 섭취 증가를 유의하게 감소시켰다.
2. C-DM4 추출물은 비만으로 인한 공복혈당 증가와 혈청 내 포도당 및 총콜레스테롤 수치 증가를 유의하게 감소시켰다.
3. C-DM4 추출물은 간 조직에서 지방방울 축적에 따른 지방간 형성을 억제하고, 혈청 내 AST와 ALT 수치 증가를 유의하게 감소시켰다.
4. C-DM4 추출물은 췌장조직의 구조변화에서 췌장섬과 증식을 억제하였으며, 혈청 내 인슐린 분비 증가를 유의하게 감소시켰다.
5. C-DM4 추출물은 지방조직의 구조변화에서 지방세포 크기 증가를 감소시켰다.

본 결과로부터 C-DM4 추출물은 칼로리 섭취 증가와 인슐린 저항성, 지방간 형성, 췌장섬 비대 등의 증상을 개선시킴으로써 비만과 비만에 따른 당뇨병 발생을 예방하는데 효과가 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2020년도 한국보건산업진흥원 ‘한의약혁신기술개발사업’의 연구비 지원으로 수행되었음(HF20C0121).

References

1. Korean Society for the Study of Obesity. Treatment guidelines for obesity. Seoul : Korean Society for the Study of Obesity. 2018.
2. Barazzoni R, Cappellari GG, Ragni M, Nisoli E. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eat Weight Disord.* 2018 ; 23(2) : 149-57.
3. Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev.* 2012 ; 70(1) : 3-21.
4. The Association of Korean Medicine. Obesity [Internet]. Seoul: 2009 [cited 2021 Aug 2]. Available from: <https://www.akom.org/Home/AkomArticleHealth/105320?HealthType=3>.
5. Jung SM, Seol YH, Chun KY, Park MH, Liu Y, Kang SY, et al. Antiobesity and antidiabetic effects of polyherbal extract with *Atractylodis Rhizoma*, *Anemarrhenae Rhizoma*, *Cinnamomi Cortex*, and *Moutan Radicles Cortex* in high fat diet-induced obesity mice. *J Korean Med Obes Res.* 2020 ; 20(2) : 69-77.
6. Byun SH, Seo BI. Oriental medicines effects on cure and prevention of an obesity (I). *J Korean Med.* 2000 ; 21(1) : 3-10.
7. Kim JK, Oh MS, Song TW. Oriental and western study on medication treatment of obesity. *Daejeon Univ J Orient Med.* 2002 ; 11(1) : 193-9.
8. Textbook Compilation Committee of National University of Korean Medicine, Korea. *Herbology*. Seoul : Younglimsa. 2018 : 218-9, 377-8, 458-9.
9. Cui X, Qian DW, Jiang S, Shang EX, Zhu ZH, Duan JA. *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma* improve glucose and lipid metabolism in T2DM rats via regulation of the metabolic profiling and MAPK/PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 2018 ; 19(11) : 3634.
10. Jeong HJ. The effect of Galkun-Whanglyeon-Whanggum-Tang and Sopunghwalhyeol-tang in HUVEC on anti-inflammatory, anti-oxidant activity. Master's thesis. Naju: Dongshin University. 2020 : 1-67.
11. Wang WB, Zhao LL, He ZY, Wu N, Li QX, Qiu XJ, et al. Metabolomics-based evidence of the hypoglycemic effect of Ge-Gen-Jiao-Tai-Wan in type 2 diabetic rats via UHPLC-QTOF/MS analysis. *J Ethnopharmacol.* 2018 ; 219 : 299-318.
12. Lyu Y, Lin L, Xie Y, Li D, Xiao M, Zhang Y, et al. Blood-glucose-lowering effect of *Coptidis Rhizoma* Extracts from different origins via gut microbiota modulation in db/db mice. *Front Pharmacol.* 2021 ; 12 : 684358.
13. Ma H, He K, Zhu J, Li X, Ye X. The anti-hyperglycemia effects of *Rhizoma Coptidis* alkaloids: a systematic review of modern pharmacological studies of the traditional herbal medicine. *Fitoterapia.* 2019 ; 134 : 210-20.
14. Zou X, Huang W, Lu F, Fang K, Wang D, Zhao S, et al. The effects of Jiao-Tai-Wan on sleep, inflammation and insulin resistance in obesity-resistant rats with chronic partial sleep deprivation. *BMC Complement Altern Med.* 2017 ; 17(1) : 165.
15. Di S, Han L, An X, Kong R, Gao Z, Yang Y, et al. In silico network pharmacology and in vivo analysis of berberine-related mechanisms against type 2 diabetes mellitus and its complications. *J Ethnopharmacol.* 2021 ; 276 : 114180.
16. Chen G, Yang X, Yang X, Li L, Luo J, Dong H, et al. Jia-Wei-Jiao-Tai-Wan ameliorates type 2 diabetes by improving β cell function and reducing insulin resistance in diabetic rats. *BMC Complement Altern Med.* 2017 ; 17(1) : 507.
17. Zhou J, Pan J, Xiang Z, Wang Q, Tong Q, Fang J, et al. Xiaokeyinshui extract combination, a berberine-containing agent, exerts anti-diabetic and renal protective effects on rats in multi-target mechanisms. *J Ethnopharmacol.* 2020 ; 262 : 113098.
18. Ran Q, Wang J, Wang L, Zeng HR, Yang XB, Huang QW. *Rhizoma coptidis* as a potential treatment agent for type 2 diabetes mellitus and the underlying mechanisms: a review. *Front Pharmacol.* 2019 ; 10 : 805.
19. Xiao S, Zhang Z, Chen M, Zou J, Jiang S, Qian D, et al. Xiexin Tang ameliorates dyslipidemia in high-fat di-

- et-induced obese rats via elevating gut microbiota-derived short chain fatty acids production and adjusting energy metabolism. *J Ethnopharmacol.* 2019 ; 241 : 112032.
20. Ahn SH, Kim KB. The effect of *Coptidis Rhizoma* and *Glycyrrhiza Uralensis* on lipid deposition with non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD). *J Pediatr Korean Med.* 2019 ; 33(2) : 12-21.
 21. Lee SE. Anti-obesity effect and action mechanism of Dansam-Samultang in C57BL/6 obese mice fed high fat diet. *J Korea Soc Beauty Art.* 2018 ; 19(2) : 113-25.
 22. Kim GH, Hong KK, Cho HB, Choi CM, Kim SB. Anti-inflammatory effects of *Salvia Miltiorrhizae Radix* water extract in RAW 264.7 cells and mouse induced by lipopolysaccharide. *J Korean Obstet Gynecol.* 2019 ; 32(2) : 1-17.
 23. Kim YJ, Kim JH, Noh YJ, Kim SJ, Hwang IH, Kim DK. Anti-oxidative effect of *Salvia miltiorrhiza Bunge* in *Caenorhabditis elegans*. *Kor J Pharmacogn.* 2018 ; 49(4) : 322-7.
 24. Liu W, Chen X, Ge Y, Wang H, Phosat C, Li J, et al. Network pharmacology strategy for revealing the pharmacological mechanism of pharmacokinetic target components of San-Ye-Tang-Zhi-Qing formula for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol.* 2020 ; 260 : 113044.
 25. Zhao W, Yuan Y, Zhao H, Han Y, Chen X. Aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza Bunge-Radix Puerariae* herb pair ameliorates diabetic vascular injury by inhibiting oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol.* 2019 ; 129 : 97-107.
 26. Kouame K, Peter AI, Akang EN, Moodley R, Naidu EC, Azu OO. Histological and biochemical effects of *Cinnamomum cassia* nanoparticles in kidneys of diabetic Sprague-Dawley rats. *Bosn J Basic Med Sci.* 2019 ; 19(2) : 138-45.
 27. Uslu GA, Gelen V, Uslu H, Özen H. Effects of *Cinnamomum cassia* extract on oxidative stress, immunoreactivity of iNOS and impaired thoracic aortic reactivity induced by type II diabetes in rats. *Braz J Pharm Sci.* 2018 ; 54(3) : e17785.
 28. Kang NH, Mukherjee S, Yun JW. Trans-cinnamic acid stimulates white fat browning and activates brown adipocytes. *Nutrients.* 2019 ; 11(3) : 577.
 29. National Health Insurance Service. Health insurance obesity(E66) medical expenses [Internet]. Seoul: 2020 [cited 2021 Aug 4]. Available from: <https://www.docdoc.doc.co.kr/news/articleView.html?idxno=2003363>.
 30. Korean Diabetes Association. Diabetes fact sheet in Korea 2018. Seoul : Korean Diabetes Association. 2018 : 19-20.
 31. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean rehabilitation medicine. Seoul : Koonja publisher. 2005 : 349-59.
 32. Heber D. Herbal preparations for obesity, are they useful? In: Bray GA, editor. Risks of obesity. Office management of obesity. Philadelphia : Elsevier Inc. 2004 : 107-26, 222-43.
 33. Hwang MJ, Shin HD, Song MY. Literature review of herbal medicines on treatment of obesity since 2000 - mainly about Ephedra Herba. *J Korean Med Obes Res.* 2007 ; 7(1) : 39-54.
 34. Mahler RJ. The relationship between the hyperplastic pancreatic islet and insulin insensitivity in obesity. *Acta Diabetol Lat.* 1981 ; 18(1) : 1-17.
 35. Yoon HJ, Lee YH, Cha BS. Causal relationship of non-alcoholic fatty liver disease with obesity and insulin resistance. *J Korean Diabetes.* 2014 ; 15(2) : 76-81.
 36. Willams CL, Campanaro LA, Squillace M, Bollella M. Management of childhood obesity pediatric practice. *Ann N Y Acad Sci.* 1997 ; 817 : 225-40.
 37. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005 ; 115(5) : 1343-51.
 38. Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol.* 2013 ; 19(3) : 210-5.