

## 당뇨병 동물모델에서 女貞葉 추출물의 항당뇨 및 항염증 효과

이윤정<sup>1,2#</sup>, 이윤재<sup>3</sup>, 윤정주<sup>1,2</sup>, 이소민<sup>1,2</sup>, 김혜음<sup>1,2</sup>, 신선호<sup>3</sup>, 강대길<sup>1,2</sup>, 이호섭<sup>1,2\*</sup>

1 : 원광대학교 한의과대학 생리학교실, 2 : 한방체액조절연구센터, 3 : 원광대학교 한의과대학 전주한방병원

### Anti-diabetic and Anti-Inflammatory Effects of Water Extract of *Ligustrum japonicum* Leaves in db/db Mouse

Yun Jung Lee<sup>1,2#</sup>, Yun Jae Lee<sup>3</sup>, Jung Joo Yoon<sup>1,2</sup>, So Min Lee<sup>1,2</sup>, Hye Yoom Kim<sup>1,2</sup>,  
Sun Ho Shin<sup>3</sup>, Dae Gill Kang<sup>1,2</sup>, Ho Sub Lee<sup>1,2\*</sup>

1 : College of Oriental Medicine

2 : Hanbang Body-fluid research center, Wonkwang University

3 : Wonkwang University Oriental Jeonju Medicine Hospital

#### ABSTRACT

**Objectives** : In this study, we investigated the anti-diabetic and anti-inflammatory effects of water extract from leaves of *Ligustrum japonicum* (WLJ) in db/db mouse.

**Methods** : The db/db mice were treated orally with WLJ (300 mg/kg/day) for 10 weeks to examine the long-term effects on hyperglycemia and glomerular tissue as well as biochemical and functional abnormalities in the kidney.

**Results** : WLJ treatment markedly reduced plasma levels of glucose, triglyceride, creatinine, and systolic blood pressure in diabetic db/db mouse. Treatment of WLJ significantly increased plasma level of high density lipoprotein (HDL)-cholesterol. We also found that overexpressions of vascular cellular adhesion molecule (VCAM)-1 and endothelin (ET)-1 were observed in aortic tissue of db/db mouse, whereas, WLJ suppressed both expression of VCAM-1 and ET-1 in aorta. In renal tissue, overexpressions of ICAM-1 and TGF- $\beta$  1 were found in untreated db/db mouse, however, significantly decreased those levels by WLJ treatment. The insulin immunoreactivity of the pancreatic islets remarkably increased in WLJ treated db/db mouse compared with untreated db/db mouse. Taken together, WLJ treatment ameliorated hyperglycemia and hyperlipidemia via improvement of insulin secretion and lipid metabolism, respectively. Furthermore, WLJ treatment also ameliorated hypertension via inhibition of inflammatory process in vascular and renal tissues.

**Conclusions** : *Ligustrum japonicum* has an anti-diabetic and anti-inflammatory effects in db/db mouse. Thus, these results suggested a beneficial effect of *Ligustrum japonicum* in treatment with diabetes and diabetic vasculopathy.

**Key words** : *Ligustrum japonicum*; Diabetes mellitus; renal fibrosis; atherosclerosis; hyperlipidemia

#### 서론

죽상경화증은 최근 선진국에서 사망 및 조기 신체장애의 가장 중요한 원인이 되고 있으며, 위험인자로는 고지혈증, 고

혈압, 흡연, 당뇨 및 비만 등이 있다. 당뇨병은 크게 인슐린 의존성이 있는 제 1형 당뇨병과 인슐린 비의존성 또는 성인 당뇨병이라고도 불리는 제 2형 당뇨병으로 구분할 수 있는데, 제 2형 당뇨병은 전체 당뇨병의 90% 이상을 차지하고 주로

\*교신저자 : 이호섭, 원광대학교 한의과대학 생리학교실

· Tel : 063-850-6841 · Fax : 063-850-7260 · E-mail : host@wku.ac.kr

#제1저자 : 이윤정, 원광대학교 한의학전문대학원

· Tel : 063-850-6447 · E-mail : shrons@wku.ac.kr

· 접수 : 2012년 9월 3일 · 수정 : 2012년 11월 3일 · 채택 : 2012년 11월 7일

비만 환자에게 나타나는 인슐린 저항성과 상대적 인슐린 결핍이 복합적으로 작용하여 포도당의 대사 장애를 초래하는 만성적인 질병이다<sup>1)</sup>. 고혈당은 혈관 손상을 유발하는데 있어 중요한 역할을 하고 있으며, 고혈당에 의한 내피세포의 기능 장애는 과응고 상태와 함께 죽종성 혈전증 등의 합병증을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 죽상경화증에 의한 손상에 있어 혈관 내피세포는 ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), 그리고 E-selectin과 같은 세포유착분자 (cell adhesion molecules, CAMs)의 발현 증가를 유도한다<sup>3)</sup>. 이러한 상황에서 수많은 백혈구가 혈관 내벽에 붙게 되며, 혈관 내벽을 통과하여 내피세포 기능 저하 및 조직 손상을 유발하게 된다.

광나무 (*Ligustrum lucidum* Ait)는 몰푸레나무과 (Oleaceae)에 속하는 상록관목으로 일반적으로는 그 과실인 女貞子를 다용하며, 女貞子에는 肝, 腎을 補하고 腰膝을 強化하는 효능이 있다<sup>4)</sup>. 한편 광나무의 잎인 女貞葉은 그 味는 微苦하며 性은 平하고 無毒하며, 祛風, 消腫, 止痛, 明目的 효능이 있다<sup>4)</sup>. 또한 女貞葉에는 syringin, amygdalase, invertase, mannitol, ursolic acid, oleanolic acid, p-hydroxy phenyl ethanol, cosmosiin, luteolin-7-glucoside 가 함유되어 있으며 소염 작용이 있는 것으로 알려져 있어<sup>5)</sup> 당뇨병성 혈관 합병증의 염증기전에도 효과가 있을 것으로 착안하여 본 연구를 수행하게 되었다. 한편 광나무 잎에 대한 연구로는 생리활성 성분에 관한 연구만 있고 당뇨 또는 대사성 질환에 대한 병태생리학적 효능 연구는 미미한 실정이다<sup>6,7)</sup>.

그러므로 본 연구는 db/db 마우스 모델에 女貞葉 추출물을 투여하여 혈당 및 혈압의 변화, 혈장 내 신장 기능 및 지질의 변화, 혈관세포 부착인자 및 인슐린의 발현 등을 조사하고 결과를 보고하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료의 제조

女貞葉 (원산지: 국산)은 원광대학교 한방병원 (익산, 전북)에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 냉각기가 설치된 삼각 플라스크에 증류수 1,500 mL와 女貞葉 100 g을 넣고 냉각기를 설치한 후 120분간 가열하였다. 추출된 전탕액을 3,000 rpm으로 30 분간 원심분리하여 거즈로 여과하고, 얻은 상등액을 회전식 증발기로 감압 농축한 후 동결 건조하여 추출물 6.8 g (수득율 6.8%)의 분말을 얻었다 (Voucher specimen HBA021).

### 2. 실험동물 및 식이

실험동물은 7주령의 수컷 db/db마우스 (C57BL/KSJ, n=10)와 Wild type 마우스 (C57BL/KSJ-m+/m+, n=10)를 Central Lab. (Seoul, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 대조군과 실험군에게 제공된 식이는 정상식이 AIN-76A rodent diet (Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA)로 총 10주간 섭취하게 하였다. 양성대조군에게 투여한 rosiglitazone (RG)은 PPAR (proliferator-activated receptor)- $\gamma$  길항제로, Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 사육환경은 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  습도 50~60%로

유지하였으며, 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다. 실험실 환경에 적응시킨 후 8주령이 되었을 때 다음과 같이 10 마리씩 4개 그룹으로 무작위로 구분하여 각각 10주간 경구투여하였다. 1군: 대조군 (wild type), 2군: 당뇨유발군 (db/db), 3군: 양성대조군 (RG 10 mg/kg/day), 4군: 女貞葉 추출물 투여군 (WLJ 300 mg/kg/day). 실험기간 동안 식이와 식수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

### 3. 혈액 생화학적 분석

혈당은 2주에 한번 마우스의 꼬리 정맥의 전혈에서 Onetouch<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> Blood glucose Meter 및 Test Strip (Life Scan Inc., CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 측정값은 Onetouch<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> Blood glucose Meter의 수치를 mg/dL로 나타내었다. 혈장은 투여기간이 끝난 후 희석시켜 3,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하고, Hitachi 7080 (Hitachi, Tokyo, Japan)을 사용하여 triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL)의 혈액생화학적 수치를 측정하였다. 혈장의 creatinine은 분광광도계 (Milton Roy, Rochester, NY, USA)를 이용하여 측정하였다. BUN (blood urea nitrogen)은 kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 시약을 이용하여 측정하였다.

### 4. 혈압의 측정

혈압은 혈압측정기 (MK2000; Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)를 이용하여 2주에 한번 측정하였다. 정확한 혈압을 얻기 위하여 실험동물은 보정틀에 고정시키고 마사지 후 tail-cuff법으로 수축기 및 이완기 혈압을 측정하였다.

### 5. 혈관 및 신장 조직의 조직면역염색

적출된 흉부대동맥과 신장의 피질 조직을 4% paraformaldehyde 용액에 담가  $4^\circ\text{C}$ 에서 5시간 고정하고, 30% sucrose 용액에 조직을 침적시켰다. 조직을 optimal cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA)에 넣고 영하  $20^\circ\text{C}$ 에서 동결한 다음, cryotome SME (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, USA)를 이용하여  $4 \mu\text{m}$ 의 두께로 평행하게 횡단절편을 만든 후 poly-L-lysine 용액으로 코팅한 슬라이드글라스 위에 각각 부착시켰다. 실온에서 하룻밤 충분히 건조시킨 다음, 영하  $70^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. Histostain<sup>®</sup>-SP kit (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 통상적인 peroxidase labeled-[strept] avidin-biotin (LAB-SA) 방법을 이용하여 염색을 진행하였다<sup>8)</sup>. 절편이 붙어 있는 슬라이드를 실온에 1시간 정도 건조시킨 후 PBS (phosphate-buffered saline)로 3번 세척한 다음, 내인성 과산화효소 (endogenous peroxidase)의 활성을 방지하기 위해 3% hydrogen peroxide 용액에 넣어 1분 간 실온에 방치하였다. 이후 조직을 PBS로 3번 세척한 다음, 10% non-immune goat serum을 사용하여 20분 동안 반응시켜 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. Blocking antibody를 제거한 후 ICAM-1, VCAM-1, TGF- $\beta$  1 및 ET-1 각각

에 결합하는 mouse monoclonal IgG 및 Goat polyclonal anti-mouse IgG (1 : 200, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA)를 습윤 상자에 넣고 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였다. 이후 슬라이드를 세척한 다음, 이차항체인 biotinylated secondary antibody에 20분 동안 실온에서 반응시킨 후, PBS로 5분 씩 3번 세척하였다. Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin에 30분 동안 반응시킨 후 PBS로 3번 세척하였다. 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) chromogen과 hematoxylin (Zymed, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 일정시간 동안 발색시킨 다음, 슬라이드를 흐르는 물에 씻어 반응을 중지시킨 후 봉입제로 봉입하였다. 각각의 발현 정도는 광학현미경으로 1,000배 시야에서 관찰한 후 사진을 촬영하였다 (BX41, Olympus, Tokyo, Japan).

**6. 췌장 조직에서 면역조직화학염색**

4 μm 두께의 췌장 조직을 조직면역염색법과 동일한 방법으로 100% xylene으로 파라핀을 제거한 후 수화시킨 다음, 조직 내의 과산화효소를 제거하였다. 이어서 PBS로 세척 후, 정상 당나귀 혈청으로 실온에서 15분 동안 반응시킴으로써 비특이적 항원-항체 결합을 제거하였다. 각 조직의 염색은 인슐린 항체(Invitrogen)를 1차 항체로 하였고, 2차 항체로는 Rhodamine (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA)으로 염색한 뒤 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)로 핵염색을 하였다. 염색한 각 조직은 형광현미경 (Axiovision 4, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

**7. 통계 처리**

실험군 간의 유의성은 Systat사의 SigmaPlot (Version 10.0)을 이용하여 Student's t-test나 one-way ANOVA test를 통하여 p값이 0.05 미만인 경우를 유의한 결과로 판정하였고, 실험 결과의 표현은 mean ± S.E.로 하였다.

**결 과**

**1. 女貞葉 추출물이 db/db 마우스의 혈당 및 혈압 변화에 미치는 영향**

女貞葉 추출물이 혈당 및 혈압의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 제 2형 당뇨 모델인 db/db 마우스에 女貞葉 추출물 및 rosiglitazone을 각각 투여하면서, 약물 처리 8주부터 18주차 까지 2주에 한 번씩 공복 혈당을 측정하였다. 그 결과, wild type 마우스 군은 특이할 만한 혈당 변화는 보이지 않았으나, db/db 마우스 군은 혈당을 측정하는 기간 동안 500 mg/dl 이상을 유지하였다. 그러나 女貞葉 추출물 및 rosiglitazone을 각각 투여한 군에서는 유의한 혈당 감소 효과를 보였다 (Fig. 1). 또한 혈압을 측정한 결과에서도 rosiglitazone과 女貞葉 추출물을 각각 투여한 군의 수축기 혈압이 db/db 마우스 군에 비해 유의한 혈압 강하효과를 나타내었다 (Fig. 2).

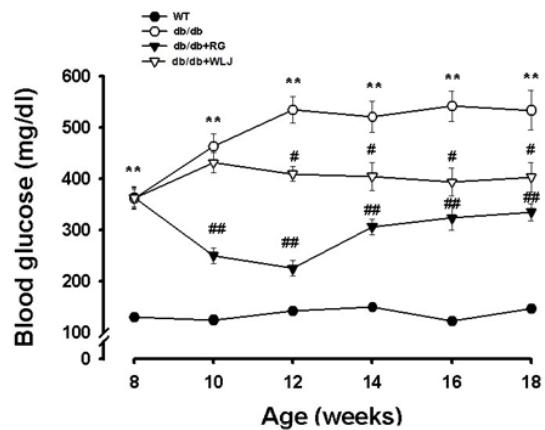


Fig. 1. Effect of the WLJ on levels of blood glucose of db/db mouse.

After removing the chow overnight, blood glucose was measured using glucose assay kit. Changes of blood glucose were measured every 2 weeks, represented on indicated weeks. Values were expressed as mean ± S.E. (n=10). \*\*p < 0.01 vs. W.T.; #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. db/db.

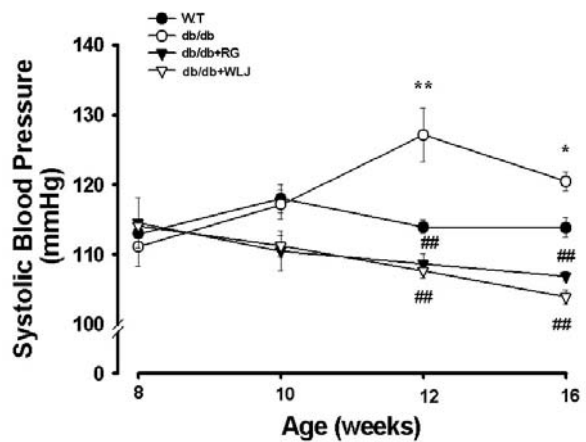


Fig. 2. Effect of the WLJ on systolic blood pressure (SBP) of db/db mouse.

SBP was determined using a non-invasive tail-cuff monitor. Changes of SBP were measured every 2 weeks, represented on indicated weeks. Values were expressed as mean ± S.E. (n=10). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. W.T.; ##p < 0.01 vs. db/db.

**2. 女貞葉 추출물이 db/db 마우스의 혈장 내 BUN 및 creatinine 농도에 미치는 영향**

10주 투여기간 동안의 신독성과의 관련성을 알아보기 위하여 혈중 요소화합물의 함유정도를 나타내는 BUN의 농도를 측정된 결과, rosiglitazone 투여 군에서 유의성 있게 감소되는 것을 나타냈으나 다른 군에서는 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 3A). 혈장 내 creatinine 농도는 db/db 마우스에서 정상군에 비해 유의한 증가를 보였으며, rosiglitazone을 투여한 군과 女貞葉 추출물을 투여한 군에서는 db/db 마우스 군에 비해 유의하게 감소되었다 (Fig. 3B).

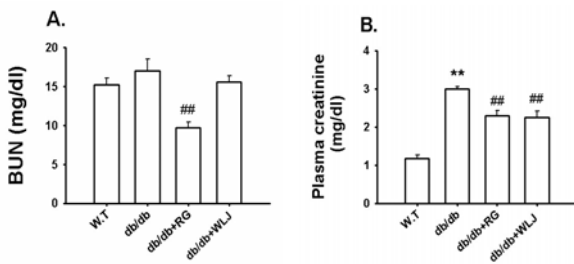


Fig. 3. Effect of WLJ on BUN (A) and creatinine (B) levels of plasma in db/db mouse. (A) Blood BUN level was measured by BUN assay kit, (B) Blood creatinine was measured in mice sera using creatinine assay kit. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n=5); \*\*p<0.01 vs. WT; ##p<0.01 vs. db/db control.

### 3. 女貞葉 추출물이 db/db 마우스의 혈장 내 지질 대사에 미치는 영향

일반적으로 고지혈증 환자군에서 혈중 유리지방산의 증가는 간에서 VLDL의 생합성을 증가시키고, 증가된 VLDL은 LDL의 증가를 유발한다<sup>9,10</sup>. 또한 유리지방산의 증가는 Randle 등에 의해 제시된 바와 같이 말초조직에서 인슐린에 대한 저항성을 증가시켜 혈중 포도당 농도를 상승시키는 것으로 알려져 있다<sup>11</sup>. 이에 본 연구에서 혈중 중성지방 농도와 HDL의 농도를 측정해 본 결과, db/db 마우스 군에서 증가된 중성지방의 함량이 rosiglitazone을 투여한 군과 女貞葉 추출물을 투여한 군 모두에서 감소함을 나타내었다 (Fig. 4A). HDL의 함량은 db/db 마우스 군에서는 유의성 있게 감소하였으나, rosiglitazone 투여군, 그리고 女貞葉 추출물 투여군 모두에서 db/db 마우스 군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다 (Fig. 4B).

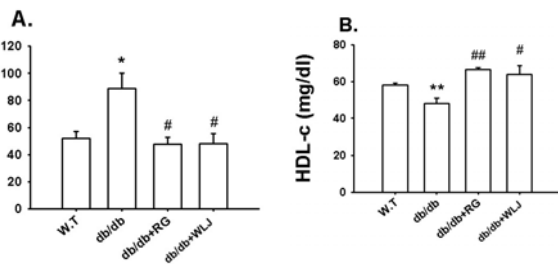


Fig. 4. Effects of WLJ on triglyceride (A) and HDL-cholesterol (B) levels of plasma in db/db mouse. Triglyceride and HDL-cholesterol in plasma were enzymatically measured using a commercially available kits. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n=5); \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. WT; #p<0.05, ##p<0.01 vs. db/db control.

### 4. 女貞葉 추출물이 db/db 마우스의 VCAM-1 및 ICAM-1 발현 변화에 미치는 영향

제 2형 당뇨 모델인 db/db 마우스에서 女貞葉 추출물 투여에 의한 신장 및 혈관에서의 혈관 염증 marker의 발현 변화를 확인하기 위하여 조직면역염색법을 수행하였다. 흉부대 동맥 내 혈관염증 발현 억제 효과를 알아보기 위하여 혈관 유착분자인 VCAM-1 발현 변화를 조직면역염색법을 이용하여 확인하였다. 그 결과, db/db 마우스군은 대조군에 비해 혈관

유착분자 VCAM-1의 단백발현이 현저하게 증가하였으나, 女貞葉 추출물을 투여한 군에서는 그 발현 정도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 rosiglitazone을 투여했을 때와 유사하였다 (Fig. 5). 또한 혈관염증 인자인 ICAM-1은 renal cortex 부분에서의 발현 변화를 측정하였다. db/db 마우스군은 대조군에 비해 혈관 유착분자 ICAM-1의 단백발현이 현저하게 증가하였으나, 女貞葉 추출물을 투여한 군에서는 그 발현 정도가 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

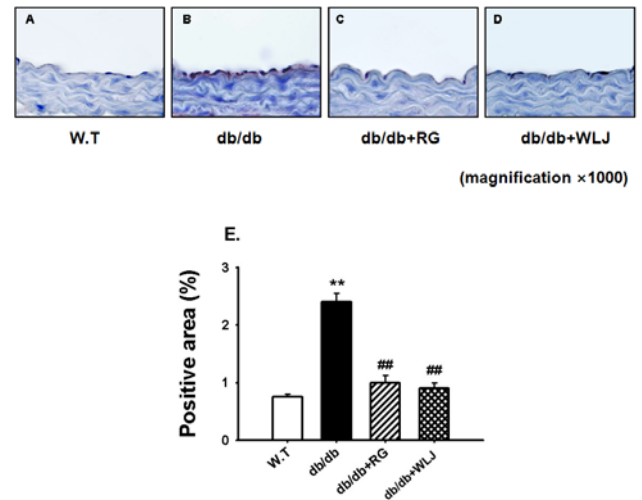


Fig. 5. Effect of WLJ on VCAM-1 immunoreactivity in the aorta of db/db mouse. Immunohistochemical staining of VCAM-1 in aorta from (A) WT, (B) untreated db/db mouse, (C) db/db mouse treated with rosiglitazone (10 mg/kg/day) and (D) db/db mouse treated with WLJ (300 mg/kg/day). (E) Quantitative analysis of VCAM-1 positive area. The average score of 5-10 randomly selected sites per section of aorta was calculated. Data expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*p<0.01 vs. WT; ##p<0.01 vs. db/db control. Original magnification, 1000x.

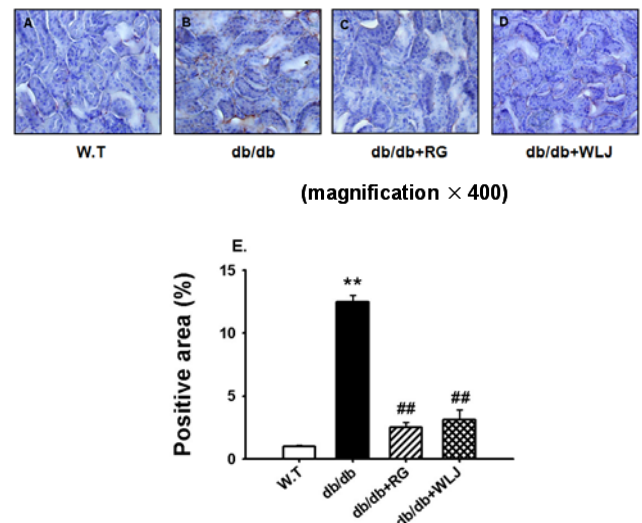


Fig. 6. Effect of WLJ on ICAM-1 immunoreactivity in renal cortex of db/db mouse. Immunohistochemical staining of ICAM-1 in renal cortex from (A) WT, (B) untreated db/db mouse, (C) db/db mouse treated with

rosiglitazone (10 mg/kg/day) and (D) db/db mouse treated with WLJ (300 mg/kg/day). (E) Quantitative analysis of ICAM-1 positive area. The average score of 5-10 randomly selected sites per section of renal cortex was calculated. Data expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*p<0.01 vs. WT; ##p<0.01 vs. db/db control. Original magnification, 400x.

### 5. 女貞葉 추출물이 db/db 마우스의 혈관 조직 내 ET-1 발현 변화에 미치는 영향

女貞葉 추출물 투여에 의한 혈관 수축인자 ET-1의 변화를 알아보고자, 흉부대동맥에서 조직면역염색법을 실시하였다. 그 결과, 제 2형 당뇨 모델인 db/db 마우스에는 대조군에 비해 ET-1 단백질 발현이 현저하게 증가하였으나, 女貞葉 추출물 및 rosiglitazone을 투여한 군에서는 ET-1의 발현이 유의하게 감소됨을 확인하였다 (Fig. 7).

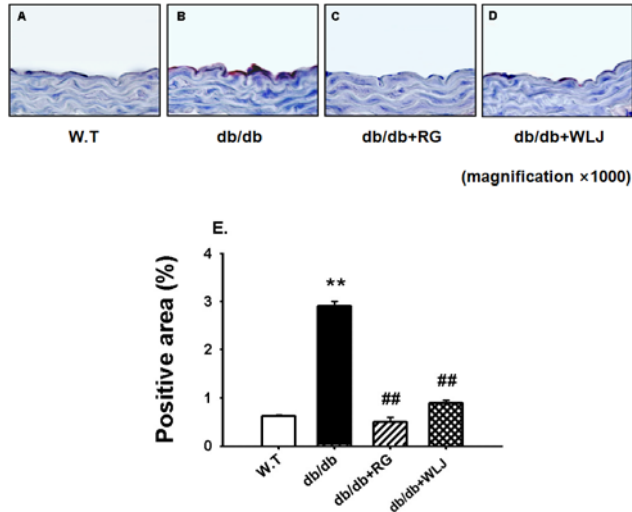


Fig. 7. Effect of WLJ on ET-1 immunoreactivity in the aorta of db/db mouse. Immunohistochemical staining of ET-1 in aorta from (A) WT, (B) untreated db/db mouse, (C) db/db mouse treated with rosiglitazone (10 mg/kg/day) and (D) db/db mouse treated with WLJ (300 mg/kg/day). (E) Quantitative analysis of ET-1 positive area. The average score of 5-10 randomly selected sites per section of aorta was calculated. Data expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*p<0.01 vs. WT; ##p<0.01 vs. db/db control. Original magnification, 1000x.

### 6. 女貞葉 추출물이 db/db 마우스의 TGF-β 1 및 인슐린 발현에 미치는 영향

女貞葉 추출물 투여에 의한 신장 사구체 조직에서의 신장 염증인자 TGF-β 1 발현 변화를 알아보고자 조직면역염색법을 실시하였다. 그 결과, 제 2형 당뇨 모델인 db/db 마우스에 비해 女貞葉 추출물 및 rosiglitazone을 투여한 군에서 사구체 내 TGF-β 1의 발현이 감소함을 확인 하였다 (Fig. 8). 또한 췌장조직에서 인슐린의 발현 변화를 알아보기 위하여 마우스의 췌장에서 면역형광염색을 수행한 결과, db/db 마우스의 췌장에서 대조군에 비해 췌도가 파괴되어 인슐린 발현이 현저하게 감소되었다. 그러나 女貞葉 추출물 및 rosiglitazone을 투여한 군의 췌장에서는 db/db 마우스에 비해 인슐린의 감소가 유의하게 억제됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 9).

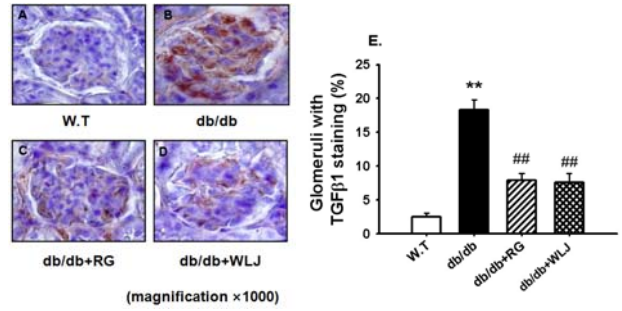


Fig. 8. Effect of WLJ on TGF-β 1 immunoreactivity in the kidney glomeruli of db/db mouse. (A) WT, (B) untreated db/db mice, (C) db/db mice treated with rosiglitazone and (D) db/db mice treated with WLJ. (E) Quantitative analysis of TGF-β 1 in glomeruli. p<0.01 vs. WT; p<0.01 vs. db/db control. Original magnification, 1000x.

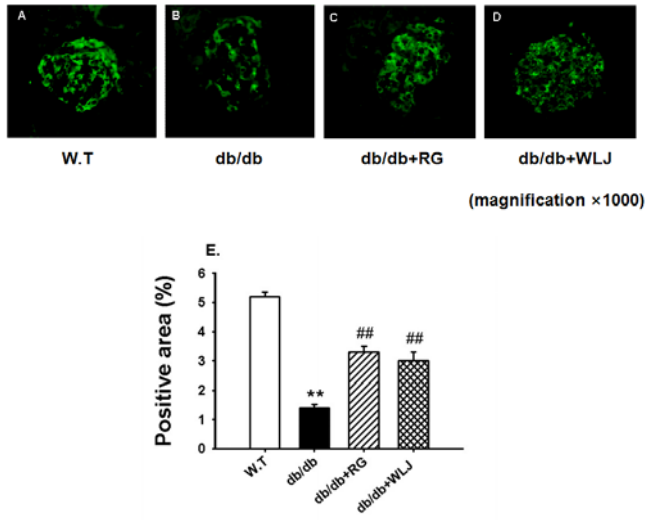


Fig. 9. Immunofluorescence staining of insulin in the pancreas of db/db mouse. Immunofluorescence staining of insulin in pancreas from (A) WT, (B) untreated db/db mouse, (C) db/db mouse treated with rosiglitazone (10 mg/kg/day) and (D) db/db mouse treated with WLJ (300 mg/kg/day). (E) Quantitative analysis of insulin positive area. The average score of 5-10 randomly selected sites per section of pancreas was calculated. Data expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*p<0.01 vs. WT; ##p<0.01 vs. db/db control. Original magnification, 1000x.

## 고찰

女貞葉은 물푸레나무과 (Oleaceae)에 속하는 상록관목 광나무 (Ligustrum japonicum)의 잎으로, 광나무는 일본, 대만 및 우리나라 제주도, 남부 지방의 산야지 해발 150 ~ 1,100 m 지역 해변산록 저지대에 자생하며, 높이는 3-5 m이고 가지는 회색이며 피목이 뚜렷한 특징을 갖고 있다<sup>12)</sup>. 女貞葉은 그味が 微苦하며 性は 平하고 無毒하며, 시력을 좋게 하고 통증완화, 구내염, 치주염, 급성세균성 이질, 약성종양, 화상 등에 효과가 있다고 밝혀져 있다<sup>5)</sup>. 본 연구에서는 女貞葉 추출물의 제 2형 당뇨동물 모델에서의 혈당 강하, 혈관 이완 및 염증 발현의 변화에 미치는 영향을 구명하고, 당뇨병 합병증 예방에도 효과가 있음을 확인하고자 실험을 수행하였다.

제 1형 당뇨병에 대한 치료는 인슐린 투여가 아직은 가장

주된 치료법이며, 그밖에 채식이식 및 채식소도이식이 시도되고 있다<sup>13)</sup>. 제 2형 당뇨병에 대한 기존의 치료법은 식사 및 운동요법을 통하여 인슐린 저항성을 줄이고, 인슐린 요구량을 줄이고자 하는 데에 중점을 두고 있다. 즉, 제 2형 당뇨병의 치료방법은 꾸준한 혈당 관리와 함께 다양한 합병증에 대한 예방과 관리라고 볼 수 있다<sup>14)</sup>. 그러나 당뇨병 환자의 90%가 제 2형 당뇨병임에도 불구하고, 한의학을 이용한 당뇨병 치료 기전은 아직 밝혀지지 않고 있다.

Db/db 마우스 (C57BL/KsJ)는 시상하부에 위치하는 비만 호르몬 (leptin)의 수용체인 Ob-Ra가 돌연변이되어 시상하부에서 leptin의 신호전달과정에 결함이 생겨 과도한 먹이 섭취, 지방 축적이 일어나 제 2형 당뇨와 유사한 형태의 비만증, 고인슐린혈증, 고혈당 등을 특징적으로 나타내는 동물이다<sup>15)</sup>. 본 연구결과에서도 혈당의 변화를 10주간 관찰한 결과, 높은 수준의 혈당 증가를 확인할 수 있었다. 그러나 女貞葉 추출물을 투여한 군에서는 db/db 마우스의 혈당 증가를 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다. 이에 女貞葉 추출물이 db/db 마우스에서 포도당을 조절하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 신장 기능을 검사한 결과, 女貞葉 추출물을 처리한 군에서는 db/db 마우스 군에 비해 혈장 내 BUN 농도에는 영향을 미치지 않았으나, creatinine 농도를 유의하게 감소시키는 것으로 보아 당뇨에 따른 신장 기능 부전을 女貞葉 추출물 투여가 개선시키는 것으로 보인다. 그러나 전반적인 신기능의 회복에 대한 여부는 추가로 연구가 필요할 것으로 판단된다.

혈장 내 지질검사에서 나타난 女貞葉 추출물에 의한 HDL 증가 및 중성지방의 감소는 total cholesterol이나 LDL의 유의성 있는 변화 없이 나타난 것으로, 이는 total cholesterol과 LDL의 변화와는 독립적으로 나타났거나 콜레스테롤 조절 기전에 있어 밝혀내지 못한 기전이 존재할 수 있다는 것을 의미한다고 판단되며, 추후 이에 대한 기전 연구가 추가로 연구가 필요하다고 사료된다.

당뇨환자는 인슐린의 부족 또는 인슐린의 기능 저하로 인해 탄수화물, 단백질, 지질 대사가 비정상적으로 진행되어 고혈당과 이상지질혈증을 나타내게 된다. 이러한 만성적인 고혈당 상태는 다양한 합병증을 유발하는데, 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 신부전증, 동맥경화증과 더불어 고혈압, 신장병, 뇌졸중 및 심장병 등 만성 합병증으로 이행한다<sup>16)</sup>. 제 2형 당뇨병 환자에서 가장 흔히 나타나는 지질대사 이상은 고지혈증, 특히 고중성지방 혈증으로 20-60%의 빈도로 나타나며<sup>17,18)</sup>, 이러한 고지혈증은 죽상경화증의 주요 위험인자의 하나로 작용하여 결과적으로 허혈성 심질환을 비롯한 당뇨병의 심혈관계 합병증의 발생에 영향을 미친다<sup>19)</sup>. 특히, 죽상경화증 같은 대혈관 관련 질환은 높은 사망률을 유발하는 질환이기 때문에 당뇨병을 가진 환자에게 중요한 합병증이라고 할 수 있다<sup>20,21)</sup>. 죽상경화증의 초기 병변은 혈중의 단구세포 및 T-세포가 혈관벽으로 유입되면서 시작된다. 여기에서 단구세포는 대식세포로 분화하고 더 나아가서 지질을 탐색하여 거품세포 (foam cell)가 되며, 이들이 축적되어 혈관벽에 fatty streak를 형성하게 된다. 활성화된 T-세포 및 거품세포는 사이토카인, 키모카인 및 성장인자를 비롯한 여러 가지 염증 매개물질들을 발현하여 염증반응을 지속시키며, 평활근세포의 증식을 유도하게 되는데 이로 인해 혈

관 내벽이 두꺼워지면서 해당부위가 용기하게 된다<sup>22)</sup>. 혈관 내벽의 두께 증가로 인해 혈관 내벽이 좁아지면서 혈류의 흐름을 방해하게 되며, 이러한 현상이 심장 혈관에서 일어난다면 협심증과 같은 심혈관질환의 원인이 된다<sup>23,24)</sup>.

죽상경화증의 초기단계 혈관손상에 있어 내피세포는 VCAM-1, ICAM-1같은 세포유착분자의 발현이 증가하게 되는데, 그 결과로 단핵구 및 백혈구의 염증부위로의 침투가 증가하고 이들에 의한 염증성 사이토카인의 분비는 혈관염증을 더욱 진행시킨다<sup>25,26)</sup>. 이러한 상황에서 수많은 백혈구가 혈관 내벽에 붙게 되며, 혈관 내벽을 통과하여 내피세포 기능 저하 및 조직 손상을 유발하게 된다. 그러므로 이러한 세포 유착인자의 발현 억제에 위해서, 장기간 투여해도 부작용 유발이 적은 천연약재를 이용하는 것이, 이들 분자들을 선택적으로 차단하고 죽상경화증을 예방 및 치료할 수 있는 좋은 치료목표가 될 수 있다고 생각된다.

따라서 女貞葉 추출물이 db/db 마우스 모델의 혈관염증 발현 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 흉부대동맥 조직을 조직면역염색법으로 확인해 본 결과, db/db 마우스에서 증가된 세포 유착분자인 VCAM-1의 발현을 유의하게 감소시킴을 확인할 수 있었다. 또한, db/db 마우스에서 신장 피질 내 ICAM-1 및 사구체 내 TGF- $\beta$  1의 발현을 조직면역염색법으로 확인해 본 결과, 지속적인 혈당증가로 인해 ICAM-1 및 TGF- $\beta$  1이 발현되었으나 女貞葉 추출물을 투여한 후 이들의 발현이 감소되어 흉부대동맥 뿐만 아니라 신혈관 조직 내에서 女貞葉 추출물이 혈관보호효과가 있는 것으로 판단된다. 실제로 실험연구나 임상연구에서도 당뇨에 의한 직접적인 죽상경화 병변이 나타난다는 보고는 거의 없다. 그러나 당뇨가 괴사성 지방핵 (necrotic lipid core) 형성을 유발한다는 것은 예상할 수 있다. 이는 제 1형 당뇨병환자에서 fatty streak나 intima-media thickness와 같은 lesion initiation이 이상지질혈증과는 상관없이 활발히 나타난다는 사실에 기인한다<sup>27,28)</sup>. 괴사성 지방핵은 염증반응의 지속으로 인해 거품세포의 숫자가 증가하면서 일부가 괴사하게 되고 죽은 세포들이 머금고 있던 지질이 배출되면서 형성된다. 이러한 괴사성 지방핵은 평활근세포의 증식으로 생겨나는 fibrous cap과 함께 죽상경화반 (atherosclerotic plaque)을 형성하게 된다<sup>29)</sup>. 이때 염증반응이 지속된다면 대식세포들이 발현하는 기질급속단백질 분해효소를 포함한 각종 세포의 기질분해효소에 의해 죽상경화반이 파열되면서 혈관 내에 혈전 (thrombus)이 형성되어 급성 심근경색증의 발병으로 이어질 수 있다<sup>30,31)</sup>. 그러므로 당뇨병에 기인한 죽상경화 병변은 장기간 당뇨에 의한 혈관 기능 장애가 지속되어 죽상경화반 형성에 영향을 줄 것이라고 추측하고 있다. 본 실험에서도 장기적인 고혈당으로 인해 초기 죽상경화증으로 대표될 수 있는 혈관기능 장애가 나타났으나 중증 죽상경화증을 나타내지는 못하였으며, 이는 혈관 장력의 감소, 대식세포의 증가, 그리고 VCAM-1, ICAM-1과 같은 혈관 내피세포 내 세포 유착분자의 발현 증가 등으로 설명할 수 있다.

한편, db/db 마우스를 이용한 동물실험과 그 외의 비만과 연관된 여타의 동물실험에서 모두 혈압상승이 관찰되는 것은 아니지만, 본 실험결과에서는 비록 강하지는 않았으나 혈압을 상승시켰다. 또한 흉부대동맥에서 조직면역염색법으로 확인해

본 결과, ET-1의 발현 역시 증가하였다. 혈압의 상승은 식이의 종류와 기간, 동물의 종에 따라, 혹은 같은 종의 동물일지라도 계통에 따라서 다양한 결과를 유도할 수 있지만<sup>32,33)</sup>, 본 연구에서 女貞葉 추출물 투여군은 db/db 마우스에서 상승된 수축기 혈압을 강하시켰으며, ET-1의 발현 역시 유의하게 강하되었다. 이러한 혈압 강하는 HDL 콜레스테롤의 증가로 인해 혈관의 염증을 유발하는 중요 인자를 감소시킨 결과로 판단되며, 이러한 결과는 혈관 유착분자와 같은 염증 marker의 감소와 혈관기능의 개선으로 이어진 결과로 사료된다.

Db/db 마우스에서 보이는 과도한 먹이섭취 및 지방의 축적으로 인하여 인슐린을 생성하는 췌장 베타세포는 서서히 그 기능을 상실하여 인슐린 저항성이 증가되고 혈당 수치가 증가하게 된다<sup>34)</sup>. 그러나 췌장조직을 조직면역염색법으로 검사한 결과, 女貞葉 추출물을 투여한 군의 췌장에서 인슐린의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었는데, 女貞葉 추출물 투여군에서 췌장의 insulin 발현이 증가되어 당뇨에 의한 베타세포의 기능부전을 회복시킬 수 있는 것으로 생각된다. 女貞葉 추출물의 투여가 혈당 강하효과를 나타내고 췌장 내 insulin 분비를 증가시키며, 더 나아가 항염증 효과를 나타내는 것으로 보아 초기 죽상경화증의 치료효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해 보면 女貞葉 추출물은 제 2형 당뇨 모델인 db/db 마우스에서 혈당을 감소시키고 혈압을 감소시켜 세포 유착분자의 발현 감소 및 혈관 내피세포의 기능 개선을 통해 혈관염증을 개선시키거나 초기 죽상경화증에 효과를 나타내고 인슐린 발현을 증가시켜 췌장 기능부전을 개선시키는 것으로 나타났다. 따라서 女貞葉 추출물은 당뇨병성 혈관 합병증과 같은 혈관 질환에 대한 새로운 치료 방향을 제시하는데 유용하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구는 광나무 잎 추출물 女貞葉의 당뇨병성 혈관 합병증에 대한 억제 효과를 관찰하고자 수행하였다.

1. 女貞葉 투여군은 db/db 마우스의 혈당을 감소시켰으며, 흉부대동맥 ET-1 발현을 감소시킴으로써 수축기 혈압을 유의성있게 감소시켰다.
2. 女貞葉 투여군은 중성지방의 수치를 유의성있게 감소시켰으며, 고밀도 콜레스테롤은 증가시키는 것으로 나타났다.
3. 女貞葉 투여군은 db/db 마우스의 흉부대동맥에서 세포유착 분자인 VCAM-1 발현을 감소시키고 신장에서 염증관련 지표인 ICAM-1과 TGF-β 1의 발현을 감소시켰다.
4. 女貞葉 투여군은 db/db 마우스의 췌장 조직에서 인슐린 발현을 증가시켰다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 유전적 당뇨모델에서 인슐린 발현을 증가시킴으로써 女貞葉 투여군의 혈당강하효과를 확인할 수 있었으며, 혈관에서 수축인자 발현 억제를 통해 혈압

강하효과를 나타내었다. 뿐만 아니라 지질대사를 개선시키고, 혈관 및 신장 조직에서 염증관련 세포유착 분자의 발현을 감소시키는 것으로 보아 女貞葉 투여군은 당뇨병 뿐만 아니라 광범위한 당뇨병성 혈관 합병증의 치료 및 예방에도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 원광대학교 연구비지원(2012)에 의해 수행되었음.

## 참고문헌

1. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthew DR, Neil HA. 10 year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008 ; 359(15) : 1557-89.
2. Lopes-Virella MF, Virella G. Immune mechanisms of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Diabetes.* 1992 ; 41(2) : 86-91.
3. Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: The distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis.* 2005 ; 183 : 259-67.
4. Jeong BS, Shin MK. Dohaehyangyak(crude drug) an unabridged dictionary. Seoul : Youngrimsa. 1990 : 977-8.
5. Kim CM. Kangsoshinuihakwon pyun. Dictionary of Traditional Chinese Materia Medics. Seoul : A book concern jeongdam. 1998 : 3782-3.
6. Hea ZD, Donga H, Xua HX, Yea WC, Sunb HD, and Paul PH. Secoiridoid constituents from the fruits of Ligustrum lucidum. *phytochemistry.* 2001 ; 56(4) : 327.
7. Kim YJ, Lee YR, Cheon JW, Lee HS. Anti-Aging Effect of Ligustrum japonicum Extract in the Human Fibroblast Cells. *J Soc Cosmet Sci Korea.* 2010 ; 36(4) : 295-301
8. Lee YJ, Choi DH, Kim EJ, Kim HY, Kwon TO, Kang DG, Lee HS. Hypotensive, hypolipidemic, and vascular protective effects of Morus alba L. in rats fed an atherogenic diet. *Am J Chin Med.* 2011 ; 39(1) : 39-52.
9. Reaven GM. Non-insulin-dependent diabetes mellitus, abnormal lipoprotein metabolism, and atherosclerosis. *Metabolism.* 1987 ; 36 : 1-8.
10. Kissebah AH, Alfarsi S, Evans DJ, Adams PW. Integrated regulation of very low density lipoprotein, triglyceride and apolipoprotein-B kinetics in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes.*

- 1982 ; 31 : 217–25.
11. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev*. 1998 ; 14(4) : 263–83.
  12. Kim CH, Youk SU. Coloured resources woody plants. Seoul : AcademyBook, 1993 : 438–40.
  13. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus: A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986 ; 314(21) : 1360–8.
  14. Baek SH. Prevention of type 2 diabetes. *Medical Postgraduates*. 2007 ; 3 : 128–31.
  15. Weigle DS, Kuijper JL. Obesity genes and the regulation of body fat content. *Bioessays*. 1996 ; 18(11) : 867–74.
  16. Mandrup-Poulsen T. Diabetes. *Brit Med J*. 1998 ; 316(7139) : 1221–5.
  17. Son HY. Lipid metabolism in diabetes mellitus. *J Korean Diabetes Assoc*. 1985 ; 9 : 159–64.
  18. Fredric LD. Hyperlipidemia in diabetes mellitus. *Diab Metab Rev*. 1990 ; 6 : 47–61.
  19. Ganda OP. Pathogenesis of macrovascular disease in the human diabetic. *Diabetes*. 1980 ; 29 : 931–42.
  20. Ceriello A. Coagulation activation in diabetes mellitus: The role of hyperglycaemia and therapeutic prospects. *Diabetologia*. 1993 ; 36 : 1119–25.
  21. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000 ; 49 : 1939–45.
  22. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. 2005 ; 109 : 143–59.
  23. Singh NP, Puqazhendhi V, Das AK, Prakash A, Aqarwal SK. Clinical and laboratory profile of diabetes in elderly. *J Indian Med Assoc*. 1999 ; 97(4) : 124–8.
  24. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002 ; 105 : 1135–43.
  25. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 ; 340(2) : 115–26.
  26. Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today*. 1992 ; 13(3) : 106–12.
  27. Järvisalo MJ, Putto-Laurila A, Jartti L, Lehtimäki T, Solakivi T, Rönnemaa T, Raitakari OT. Carotid artery intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2002 ; 51(2) : 493–8.
  28. McGill HC Jr, McMahan CA, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile. *Circulation*. 2001 ; 103(11) : 1546–50.
  29. Kolodgie FD, Virmani R, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Finn AV, Gold K. Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque. *Heart*. 2004 ; 90(12) : 1385–91.
  30. Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007 ; 5(2) : 265–82.
  31. Li G, Sanders JM, Phan ET, Ley K, Sarembock IJ. Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express P-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*. 2005 ; 167(6) : 1511–8.
  32. Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest*. 1999 ; 104(4) : 447–57.
  33. Saad MJ, Velloso LA, Carvalho CR. Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. *Biochem J*. 1995 ; 310 : 741–4.
  34. Haffner SM, Mykkanen L, Festa A, Burke JP, Stern MP. Insulin-resistant pre-diabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive pre-diabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the pre-diabetic state. *Circulation*. 2000 ; 101(9) : 975–80.