

고지방식이와 STZ 유도 제2형 당뇨병 마우스에서 상업 추출물의 항당뇨 효과

권태오^{1#}, 최지원², 이현서³, 조병옥⁴, 윤홍화⁴, 장선일^{3*}

1 : 원광대학교 생명자원과학대학, 2 : 전주대학교 방사선학과, 3 : 전주대학교 보건관리학과, 4 : (주)아토큐엔에이

Anti-Diabetic Effects of Mori Folium Extract on High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Type II Diabetes Mellitus in Mice

Tae-Oh Kwon^{1#}, Ji-won Choi², Hyun-Seo Lee³, Byoung-Ok Cho⁴, Hong-Hua Yin⁴, Seon-II Jang^{3*}

1 : College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University

2 : Department of Radiological Sciences, Jeonju University

3 : Department of Health & Science, Jeonju University

4 : Ato Q&A Corporation, Cheonjam-ro, Wansan-gu, Jeonju 560-759, Korea

ABSTRACT

Objectives : The present study was designed to investigate the anti-diabetic effects of Mori Folium (*Morus alba* L. of Moraceae) extract (MFE) on high fat diet (HFD) and streptozotocin (STZ)-induced type II diabetes mellitus in mice.

Methods : The mice (C57BL/6J) were fed HFD for 8 weeks and then was induced with a single injection of STZ (75 mg/kg). The diabetic mice were divided into four groups [(STD, HFD, HFD + MFE and HFD + quercetin (QUR)] and administered with MFE or QUR for 4 weeks. Fasting blood glucose, lipid profile (triglycerides and cholesterol etc.), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), insulin and leptin were measured every 2 weeks.

Results : Body weight gain was lower in the MFE and QUR groups than HFD group. The fasting blood glucose was lower in the MFE and QUR groups. Oral glucose and insulin tolerance were decreased in the MFE and QUR groups. The levels of serum total cholesterol, triglycerides, and LDL cholesterol were reduced in the MFE and QUR groups. The HDL cholesterol was much higher in the MFE and QUR groups than HFD group. The levels of GOT, GPT and atherogenic index were decreased in the MFE and QUR groups. The serum insulin and leptin concentrations were reduced in the MFE and QUR groups.

Conclusions : These results showed that MFE could decrease blood glucose level and lead to an amelioration in dyslipidemia states on HFD/STZ-induced type II diabetes mellitus in mice.

Key words : Mori Folium extract, Quercetin, Anti-diabetic effects, Blood glucose level, Type II diabetes mellitus

서론

당뇨병 역학조사 결과에 따르면 국내 당뇨병 환자 수는 2020년에는 455만 명을 넘어서 2030년이면 545만 명에 이를 전망이다¹⁾. 기존 당뇨치료제들이 가지고 있는 불쾌감에 의한 구토 및 복부팽만 등 소화기 계통에 대한 부작용과 다양한

생리학적 대사과정에 미치는 문제점들이 보고되고 있어²⁾ 한국을 비롯한 많은 선진국들은 이러한 문제점들을 개선하기 위한 신약 개발에 집중하고 있다. 특히, 최근에는 신물질 개발 보다 부작용이 없고 체중 감소와 함께 혈당을 낮출 수 있는 천연물을 이용한 당뇨 치료제 개발에 집중적인 투자와 연구가 이루어지고 있어서 천연물 소재 개발에 대한 중요성이 매우

*Corresponding author : Seon II Jang, Department of Health & Science, Jeonju University

· Tel : +82-63-220-3124 · FAX : +82-63-220-2054 · E-mail : sonjjang@jj.ac.kr

#First author : Tae Oh Kwon, College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University

· Tel : +82-63-850-6681 · FAX : +82-63-850-7380 · E-mail : agrokto@wku.ac.kr

· Received : 28 December 2014 · Revised : 22 January 2015 · Accepted : 22 January 2015

절실하게 요구되고 있다.

당뇨병은 신체 내에서 혈당 조절에 필요한 인슐린의 절대적 또는 상대적 결핍에 의해 발생된 고혈당을 특징으로 탄수화물 대사이상, 단백질과 지질대사 및 전해질 대사에 이상을 초래하는 대사성 질환이다¹⁾. 발병 원인에 따라 제1형 당뇨와 제2형 당뇨로 구분되는데 췌장에서 인슐린을 생산하지 못하는 인슐린의 절대적 결핍에 의한 제1형 당뇨병과 인슐린 저항성 및 분비기능 이상에 의한 제2형 당뇨병으로 구분한다. 제2형 당뇨병은 상대적으로 고 연령층에서 발생하는 성인 당뇨병으로서 전체 당뇨병중 약 90%에 해당하며, 인슐린 저항성으로 인해 인슐린 작용이 충분하지 못하거나 췌장의 베타세포가 인슐린 분비 기능 저하로 혈중 포도당 농도가 높게 지속하여 다양한 합병증을 유발한다³⁾. 제2형 당뇨병은 고지혈증, 고혈압, 염증 및 심혈관계 질환을 높이는 위험인자로서 비만 중에서도 특히 복부 비만이 인슐린 저항성을 유발하는 가장 큰 요인이며 인슐린 저항성이 상당히 오랜 기간 동안 지속된 후 인슐린을 분비하는 췌장의 베타세포 파괴까지 일어나게 되므로, 인슐린 저항성 개선을 통한 혈당조절을 목표로 치료제 개발이 활발히 이루어지고 있다^{4,5)}.

상엽(Mori Folium)은 뽕나무(Moraceae)에 속한 낙엽교목인 뽕나무(*Morus alba* L.)잎을 건조한 것으로 고지혈(hyperlipidemia), 고콜레스테롤(hypercholesteremia)과 당뇨병(diabetes mellitus) 치료에 사용되어 왔다⁶⁻⁹⁾. 또한, 소산풍열(疏散風熱), 청폐윤조(淸肺潤燥), 청간명목(淸肝明目) 효능이 있으며 두통(頭痛), 목적(目赤), 구갈(口渴), 폐열(肺熱)로 인한 해수(咳嗽), 풍비(風痹), 두드러기를 치료하는 본초학적인 효능이 있다¹⁰⁾. 상엽은 단백질 함량이 18-40% 이상으로 플라보노이드(flavonoids) 계열 화합물인 퀘르세틴을 풍부하게 함유하고 있으며, 항산화 효소를 유도하여 염증을 경감시키는 생물학적 효과가 있다^{11,12)}. 또한, 알라닌과 아스파라긴산이 3% 정도 들어 있으며 뇌혈관의 혈액 순환을 좋게 하고 콜레스테롤 저하, 항당뇨, 혈당강화 및 체지방 축적 억제 등 생리활성을 증진시키며 상엽의 강력한 혈당 강하 기전은 장내 탄수화물분해 효소를 억제하는 것에 의해 나타난 결과라고 보고되고 있다^{13,14)}. 또한, 상엽에는 γ -aminobutyric acid 등의 기능성물질이 함유되어 있어 혈액 중 중성지방과 콜레스테롤 저하작용, 동맥경화증 및 고지혈증 등의 치료에 효과가 있는 것으로도 알려지고 있다^{15,16)}.

퀘르세틴(querletin : 3,3',4',5,7 pentahydroxy flavone)은 붉은 양파나 브로콜리 등과 같은 채소를 비롯하여 포도, 블루베리, 차 등과 같은 많은 식품의 잎과 열매에 존재하는 마이오플라보노이드계 저분자 물질로서 지질분해효소(lipoxygenase)의 억제제로 알려져 있으며 저밀도지질단백질(low density lipoprotein, LDL)의 산화를 방지해주는 효과를 비롯한 여러 가지 생리활성을 나타내는 것으로 알려졌다^{17,18)}. 또한 면역계를 자극하고 프리라디칼(free radical)을 제거하는 강력한 항산화제로서 세포 내 글루타치온(glutathione) 수준을 증가시켜 간 기능을 증가시킨다. 배양된 세포를 대상으로 한 연구와 일부 동물을 대상으로 한 연구결과에서 이 같은 성분이 항바이러스 및 항염증 프로스타글란딘 생성을 유도하여 알려지기로 유발된 만성비염과, 피부 알레르기에 도움을 주는 것으로 나타났다¹⁹⁾. 더불어 퀘르세틴은 최근에 당뇨모델 랫트와 토끼에서 불포화 지방산의 산화를 막는 항산화 기능과 혈액 점도

를 낮춰 피를 맑게 하고 혈중 콜레스테롤 양을 줄여주며 혈당을 낮추어주는 효과가 있는 것으로 알려졌다^{20,21)}.

상엽을 대상으로 한 당뇨연구는 streptozotocin으로 당뇨를 유도한 제1형에서 주로 연구되었으나, 비만 또는 대사성 질환으로 야기되는 제 2형에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 제2형 당뇨병 마우스에서 상업 추출물과 그 유래물질인 퀘르세틴이 항비만, 지질대사 정상화, 혈당 조절 및 인슐린 저항성 개선의 효과가 있는지 조사하여 제2형 당뇨병 치료를 위한 천연자원소재로서 가능성을 확인 하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Streptozotocin (STZ), insulin, quercetin (QUR) 및 기타 분석급 식약은 Sigma-Aldrich사(MO, USA)로부터 구입하였다. Ultra sensitive mouse insulin ELISA kit는 Crysral Chem사(Downers Grove, IL, USA)로부터 구입하였으며, mouse leptin Quantikine ELISA kit는 R&D systems사(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. Tryglyceride (TG), total cholesterol (TC) 그리고 혈액학적 진단 kit는 아산제약(경기도, 대한민국)으로부터 구입하였다.

2) 상엽의 준비

상엽(Mori Folium)은 전라북도 부안군에서 2013년 5월 20일에 채취하여 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실 김홍준 교수에게 동정하여 확인 하였고, 그 표본(#MF2013-05-20)은 전주대학교 보건관리학과 연구실에 보관하였다.

3) 실험동물

실험동물은 무균환경에서 사육된 8주령 수컷 C57BL/6J 마우스는 중앙실험동물(서울)로부터 구입하였다. 스트레스를 해소하기 위해서 1주일의 순화기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 사육환경 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 밤낮주기(12시간)가 조절되는 환경에서 사육하였으며 전주대학교 실험동물위원회의 실험 규정에 준하여 실행하였다.

2. 방법

1) 상업 추출물과 퀘르세틴의 분리

채취된 상엽은 즉시 신선한 물로 세척한 후 약 5분간 증기 찜을 한 후 건조하여 분말화 하였고 1,000 g을 정량하여 메탄올 8 L와 혼합하여 실온에서 5일간 방치하여 추출하였다. 그 후 추출액을 1,900 x g로 20분간 원심 침전시키고 상층액만 취하여 0.45 μm 필터를 사용하여 여과한 후 회전진공농축기(Eyela A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 감압농축 하였으며, 동결건조기(Eyela, FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co.)로 -70°C 에서 동결 건조하여 추출물을 약 190 g 얻은 후 -20°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 또한 메탄올 추출물을 대상으로 *n*-hexane에 7일 동안

분획 추출한 후 Choi 등²²⁾의 방법에 따라 high-performance liquid chromatography (HPLC Agilent 1200 series)을 활용하여 QUR (34 mg)을 분리하였으며(Fig. 1), Sigma-Aldrich 사로부터 구입한 표준 지표물질과 HPLC profiling을 비교한 후 표준물질을 사용하여 마우스에 4주간 투여하는데 사용하였다.

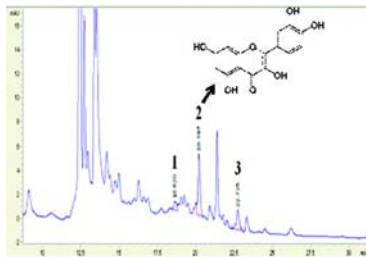


Fig. 1. HPLC chromatogram of Mori Folium extract

2) 제2형 당뇨 마우스 선별

고지방식이(HFD)와 표준식이(STD)군의 사료(Table 1)는 Research Diet Inc. (New brunswick, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. 표준식이(STD)군을 제외한 실험군들은 인슐린 저항성을 유도하기 위해 고지방식을 8주간 급여하였다. 고지방식이(HFD) 급여 8주 후 췌장세포의 부분적 손상에 의한 당뇨유발을 위해 STZ를 0.1 M citrate 용액(pH 4.5)에 녹여 체중 kg당 75 mg (75 mg/kg body weight)을 일회 복강주사 하였다. STZ 주사 1주일째 12 시간 이상 마우스를 금식 시킨 후 혈당 측정 결과 혈당이 200-250 mg/dl 인 마우스만을 비만형 제2형 당뇨병 유발 마우스로 간주 하여 추후 실험에 사용하였다. 모든 동물 실험과정은 전주대학교 동물실험윤리 위원회의 승인을 받았다(No. 2012-002).

Table 1. Ingredient and chemical composition of diets for feeding

Ingredient	Groups ¹⁾	
	STD (g)	HFD (g)
Casein	200	200
L-Cystine	3	3
Corn starch	315	0
Maltodextrin 10	35	125
Sucrose	350	68.8
Cellulose	50	50
Soybean oil	25	25
Lard	20	245
Mineral mix S10026	10	10
Dicalcium phosphate	13	13
Calcium carbonate	5.5	5.5
Potassium citrate	16.5	16.5
Vitamin mix V10001	10	10
Choline bitartrate	2	2
	Gm%	Gm%
Protein	19.2	26.2
Carbohydrate	67.3	26.3
Fat	4.3	34.9
kcal/gram	3.85	5.24

¹⁾ STD: standard diet with 10% fat calories, HFD: high fat diet with 60% fat calories.

3) 실험군 선정 및 추출물 투여

식이급여와 투여에 따른 실험분석 스케줄은 Fig. 2와 같

다. 표준식이군(STD, 10% fat calories)을 제외하고 비만형 제2형 당뇨병이 유발된 C57BL/6 마우스를 각 실험군 당 10 마리씩 나누고 고지방식이군(HFD, 60% fat calories), 고지방식이와 상업추출물 투여군(MUL) 그리고 고지방식이군과 퀘르세틴(QUR) 투여군 으로 나누어 4주간 사육하였다. 상업추출물과 퀘르세틴은 300 mg/kg body weight으로 100 μL 씩 매일 오전 9-10시 사이에 경구투여용 존데를 사용하여 4주 동안 투여 하였으며, 표준식이군과 고지방식이군은 동일한 양의 증류수를 경구 투여하였다.

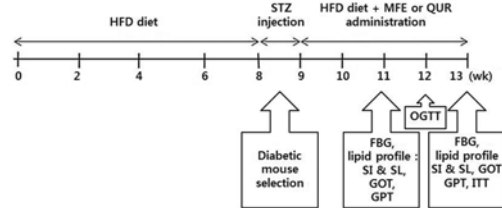


Fig. 2. Schedule for treatment of mice in the experiment. Type II diabetic mice were divided to 4 groups such as HFD, HFD + MFE and HFD + QUR except for STD. The serum collection was performed for various analyses every 2 weeks and at the last week before sacrificing mice. STD: standard diet (10% fat calories); HFD: high fat diet (60% fat calories); MFE: Mori Folium extract; QUR: quercetin OGTT: oral glucose tolerance test; FBG: fasting blood glucose; SI & SL: serum insulin & serum leptin; GOT, glutamate oxaloacetate transaminase; GPT: glutamate pyruvate transaminase; ITT: insulin tolerance test.

4) 체중과 식이 섭취량 측정

체중은 실험 시작 일에 최초 측정 한 다음 매주 1회 실험 종료일까지 4주에 걸쳐 측정하였고 식이 섭취량은 투여기간 동안 주당 2회 측정하였다. 식이 섭취량은 이전 사료 공급량에서 잔량을 감하여 계산 하였다.

5) 혈액 채취

실험동물은 MFE와 QUR를 4주간 투여한 다음 12시간 금식 시킨 후, 에테르 마취하에 모든 동물을 희생하여 심장채혈 하였다. 채취한 혈액은 3000 rpm(4°C)에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였으며 혈청의 생화학적 분석 전 까지 -70°C에 보관 하였다.

6) 공복혈당, 내당능 및 인슐린내성 측정

공복혈당(fasting blood glucose, FBG) 측정은 2주마다 한 번씩 꼬리정맥에서 채혈 하였으며, 채혈 전 12시간 동안 금식 시킨 후 혈당측정기(Acuu-Check, Roche Diagnostics Korea Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 각 그룹에 대한 혈당 변화를 관찰 하였다. 경구내당능(oral glucose tolerance test, OGTT) 검사는 실험 3주째 12시간 금식 시킨 후 포도당 용액을 체중 kg당 1g씩 경구투여 한 다음 0, 30, 60, 90, 120분 후 마우스 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 인슐린내성 검사(insulin tolerance test, ITT)는 실험 종료 마지막 주에 12시간 금식 시킨 후 인슐린용액을 체중 kg당 1 unit씩 복강투여 한 다음 0, 30, 60, 90, 120분 후 마우스 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다.

7) 혈중 지질 농도 분석

혈청 지질 농도(lipid profile) 분석을 위해 측정용 kit(AM 202-K, AM 203-KTC, AM 157S-K, Asan Pharm. Co., Seoul, Korea)으로 total cholesterol(TC), high density lipoprotein(HDL), low density lipoprotein(LDL) 및 triglyceride(TG)를 측정 하였다. LDL 함량은 Friedewald 등²³⁾의 공식에 의해 [총콜레스테롤 HDL-콜레스테롤-(중성 지방/5)]으로 계산하였다.

8) 동맥경화지수 판정

동맥경화지수(AI, Atherogenic Index)는 (TC-HDL-콜레스테롤)/HDL-콜레스테롤 공식을 이용하여 산출하였고, 기타 동맥경화의 정도를 예측 할 수 있는 지표로 사용되는 TG/HDL-콜레스테롤 ratio는 Tan 등²⁴⁾의 방법으로 그리고 TC/HDL-콜레스테롤 ratio는 Grover 등²⁵⁾의 방법에 따라 산출하였다.

9) 혈중 GOT 와 GPT 활성 측정

혈청 glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) 와 glutamate pyruvate transaminase (GTP)의 활성은 Reitman 과 Freankel²⁶⁾의 방법에 따라 측정용 키트(Asan Pharm, Co.)를 사용하여 측정하였다. 혈청중 GOT, GTP의 활성도는 표준검량곡선에서 산출하였으며 혈청 1 mL당 IU/L로 나타내었다.

10) 혈중 인슐린 과 렙틴 농도 측정

혈청 인슐린 농도와 렙틴 농도는 ultra sensitive mouse insulin ELISA kit (Crysral Chem Inc., Downers Grove, IL, USA)와 mouse leptin Quantikine ELISA kit (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 immunoassay로 측정하였다.

11) 통계처리

모든 실험값은 평균±표준편차(mean ± SD)로 표시하였고, 통계학적 비교분석은 IBM SPSS statistics 19 (IBM, New York, NY, USA)를 이용하였고 각 실험군간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)로 처리하였으며, 실험군들과의 유의차를 알아보기 위한 다중비교방법으로 Duncan's multiple range test 검정을 실시하였다. 검정 유의도는 *P* 값이 <0.05 수준일 때를 기준으로 하였다.

결 과

1. 체중과 식이 섭취량에 미치는 영향

8주간 고지방 식이로 인슐린저항성을 유발한 마우스에 저농도 STZ를 투여 하여 췌장 β세포의 선택적인 파괴를 유도함으로써 제 2형 당뇨병을 유발하였다. 이와 같은 방법으로 제 2형 당뇨병을 유발 시킨 후 4주 동안 상업 추출물을 투여하여 체중 및 식이 섭취량을 관찰 하였다. 제2형 당뇨병 유발 후 실험개시 전에 실험군의 평균체중(g)을 측정한 결과 표준식이군을 제외한 나머지 실험군들의 평균체중(33.06 ± 0.75

g)은 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 추출물 투여 마지막 4주째 실험종료일에 HFD군(36.56 ± 2.97 g)의 체중은 STD군(25.22 ± 1.40 g)보다 유의적으로 증가하였으며, MFE군(33.50 ± 1.95 g)과 QUR투여군(33.97 ± 2.30 g)은 HFD군보다 유의성 있는 감소를 보였다. 따라서 상업추출물 과 퀘르세틴 투여는 제2형 당뇨병 유발 마우스의 체중 감소에 영향을 주는 것으로 나타났다(Table 2).

Table 2. The body weight and food consumption in high-fat/STZ-induced diabetic mice

Body weight (g)	Groups ¹⁾			
	STD	HFD	MFE	QUR
Initial	$22.83 \pm 1.20^{a)}$	$33.63 \pm 2.16^{b)}$	$33.18 \pm 1.64^{b)}$	$32.80 \pm 2.22^{b)}$
Final	$25.22 \pm 1.40^{a)}$	$36.56 \pm 2.97^{d)}$	$33.50 \pm 1.95^{c)}$	$33.97 \pm 2.79^{b)}$
Food intake (g/week)	$17.87 \pm 3.55^{a)}$	$16.76 \pm 3.16^{a)}$	$16.38 \pm 2.72^{a)}$	$16.40 \pm 3.16^{a)}$

¹⁾STD, standard diet group; HFD, high fat diet group; MFE, MFE 300 mg-administrated group in HFD; QUR, QUR 300 mg-administrated group in HFD.

^{a-d)}Means in the same row not sharing common superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test (*P*<0.05).

2. 혈당, 경구 내당능 및 인슐린내성에 미치는 영향

상업추출물과 퀘르세틴을 4주 동안 투여한 제2형 당뇨병 마우스의 혈당을 측정하였다(Fig. 3). 실험개시 전 STD군(125.20 ± 5.88 mg/dL)을 제외한 실험군간의 혈당(226.55 ± 14.24 mg/dL)은 차이가 없었으며 STD군의 혈당은 실험기간동안 거의 일정하게 유지되었으나 HFD군의 경우 실험기간 동안 꾸준한 혈당 상승이 관찰 되었다. 실험 종료 4주째 MFE군(245.20 ± 27.79 mg/dL)과 QUR군(228 ± 30.61 mg/dL)은 HFD군(325.41 ± 23.23 mg/dL)에 비해 각각 -24.64%, -29.93%로 유의적인 혈당감소를 보였다.

경구내당능 측정 결과, 포도당 섭취 후 60분과 90분에서 MFE과 QUR군이 HFD군보다 유의성 있게 혈당이 감소하였음을 알 수 있으며 120분에서 MFE군(254.35 ± 15.86 mg/dL)과 QUR군(201.64 ± 14.03 mg/dL)은 HFD군(321.80 ± 9.8 mg/dL)에 비해 각각 -20.09%, -37.33% 유의적으로 혈당이 감소하였다. 또한 120분에서 MFE과 QUR군의 혈당은 포도당 투여 전 혈당과 비슷한 수준으로 떨어진 반면 HFD군은 포도당 투여 전 혈당보다 높았다(Fig. 4A). 인슐린 내성 결과는 인슐린 투여 120분에서 MFE군(186 ± 13.12 mg/dL)과 QUR군(160.87 ± 17.93 mg/dL)이 HFD군(236.83 ± 20.11 mg/dL)보다 유의성 있게 혈당이 감소하였음을 알 수 있다(Fig. 4B).

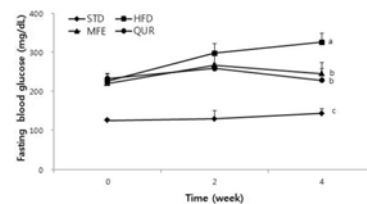


Fig. 3. Effect of MFE and QUR on fasting glucose level in HFD/STZ-induced type II diabetic mice. Values represent mean ± SD for 10 mice in each group. STD, standard diet group; HFD, high fat diet group; MFE, MFE 300 mg-administrated group in HFD; QUR, QUR 300 mg-administrated group in HFD. ^{a-c)}Means in the same row not sharing common superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test (*P*<0.05).

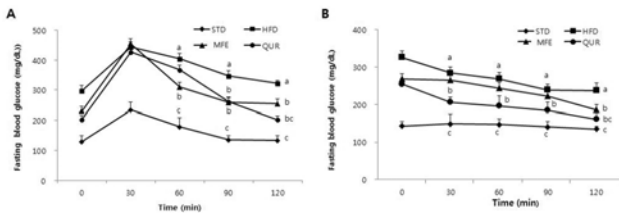


Fig. 4. Effect of MFE and QUR on oral glucose tolerance test (A) and insulin tolerance test (B) in HFD/STZ-induced type II diabetic mice. Values represent mean \pm SD for 10 mice in each group. ^{a-c}Means in the same row not sharing common superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

3. 혈중 지질 농도의 변화와 GOT 와 GPT 활성 측정

상업추출물의 혈중 지질조성에 대한 효과를 살펴본 결과 총콜레스테롤 농도는 HFD군(288.03 ± 17.89 mg/dL)이 MFE군(224.20 ± 17.85 mg/dL)과 QUR투여군(269.49 ± 17.32 mg/dL)에 비하여 유의적으로 증가하였다. 중성지방 농도는 MFE군(64.66 ± 10.22 mg/dL)과 QUR투여군(89.52 ± 11.51 mg/dL)이 HFD군(154.29 ± 20.70 mg/dL)보다 각각 -58%, -41% 유의성 있게 감소하였으며 특히, MFE군(64.66 ± 10.22 mg/dL)의 경우 STD군(106.67 ± 21.19 mg/dL)의 중성지방 농도 보다 -39.4% 유의적으로 감소하였다. MFE군(181.88 ± 11.08 mg/dL)과 QUR군(206.24 ± 11.08 mg/dL)의 HDL 콜레스테롤 농도는 HFD군(82.74 ± 5.80 mg/dL)보다 유의성 있게 높았으며, LDL 콜레스테롤 농도는 HFD군(174.25 ± 42.45 mg/dL)보다 MFE군(106.50 ± 14.99 mg/dL)과 QUR투여군(139.83 ± 38.37 mg/dL)에서 각각 -38%, -20% 유의적으로 감소하여 상업추출물이 지질대사 개선 활성이 있음을 알 수 있다(Table 3).

간 기능을 측정하는 검사에서 간세포 손상 정도를 예측하는 지표인 GOT 와 GPT를 측정하여 상업추출물이 간 기능 개선에 효과가 있는지 알아보았다. MFE군(20.42 ± 4.22 IU/L)과 QUR투여군(17.30 ± 10.72 IU/L)은 HFD군(25.77 ± 9.92 IU/L)보다 GOT 활성도가 각각 -20.7%, -32.86% 감소 하였으며, GPT 활성도는 각각 -56.7%, -57.8% 유의하게 감소함을 알 수 있다.

당뇨병은 이차성 고지혈증을 유발하는데 인슐린이 중성지방의 생성이나 제거에 관여하여 대사장애를 일으킨다. 당뇨병으로 인한 인슐린 저항성 및 고인슐린증 상태에서는 지방조직에 있는 유리 지방산의 분해가 증가되어 간에서 지방합성 및 VLDL(Very Low Density Lipoprotein)의 생성이 증가되고 혈중 중성 지방이 증가 될 수 있다²⁷⁻²⁹. 본 연구 결과 상업추출물이 혈중 HDL 콜레스테롤 농도를 증가시키고, 중성지방 과 LDL 콜레스테롤 농도를 유의적으로 감소시켰음을 알 수 있었으며, 이러한 효과는 상업추출물이 당질흡수를 느리게 하고 간과 근육에 지방 축적을 감소시킴으로서 혈중지질 대사 이상을 억제시켜, 인슐린 민감성을 개선하고 혈당을 정상화하는데 관여할 것으로 생각된다.

Table 3. Effect of MFE and QUR on serum lipid profile and transaminase in HFD/STZ-induced type II diabetic mice

Parameters ¹⁾	Experimental groups ²⁾			
	STD	HFD	MFE	QUR
TC	185.44 \pm 11.24 ^{a)}	286.83 \pm 17.89 ^{b)}	224.20 \pm 17.85 ^{ab)}	269.49 \pm 17.32 ^{b)}
TG	105.97 \pm 20.49 ^{a)}	153.59 \pm 20.01 ^{b)}	64.66 \pm 10.22 ^{c)}	89.52 \pm 11.51 ^{bc)}
HDL-C	96.68 \pm 16.96 ^{a)}	82.74 \pm 5.80 ^{b)}	181.88 \pm 11.08 ^{c)}	206.24 \pm 11.08 ^{c)}
LDL-C	68.29 \pm 37.02 ^{a)}	174.25 \pm 42.45 ^{b)}	106.50 \pm 14.99 ^{ab)}	139.83 \pm 38.37 ^{b)}
GOT	18.91 \pm 6.44 ^{a)}	25.77 \pm 9.92 ^{b)}	20.42 \pm 4.22 ^{a)}	17.30 \pm 10.72 ^{a)}
GPT	4.12 \pm 2.78 ^{a,b)}	7.43 \pm 5.33 ^{a)}	3.52 \pm 2.90 ^{b,c)}	3.43 \pm 2.32 ^{b,c)}

¹⁾LDL cholesterol=Total cholesterol-HDL cholesterol-(Triglyceride/5); GOT, Glutamate Oxaloacetate Transaminase; GPT, Glutamate Pyruvate Transaminase

²⁾Values represent mean \pm SD for 10 mice in each group.

^{a-c}Means in the same row not sharing common superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$)

4. 혈중 지질 성분 변화에 따른 동맥경화지수

혈중 지질성분을 분석하여 산출한 동맥경화지수와 TG/HDL-C ratio 및 TC/HDL-C ratio는 혈관의 경직도를 반영하는 중요한 지표로서 통계적으로 그 값이 작을수록 동맥의 경화 정도가 적어 혈관 탄성이 좋음을 의미한다. Table 2의 결과를 바탕으로 동맥경화지수와 TC/HDL-C 및 TG/HDL-C를 조사한 결과 Table 3에서 보여주는 바와 같이 STD군(0.92 ± 0.29)에 비해서 HFD군(2.47 ± 2.08)에서 동맥경화지수가 현저히 높아졌으며, MFE군(0.23 ± 0.61)과 QUR투여군(0.30 ± 0.56)은 HFD군(2.47 ± 2.08)보다 동맥경화지수가 각각 -91%, -88% 유의성 있게 감소하였다. 혈액학적 변화에 있어서 동맥경화지수와 TG/HDL-C는 관상동맥질환(coronary artery disease)의 위험인자를 나타내는 중요한 지표로 사용되고 있으며, TC/HDL-C는 고지혈증(hyperlipidemia)의 판정에 중요한 임상적 위험인자로 인식되고 있다³⁰. TC/HDL-C ratio와 TG/HDL-C ratio는 HFD군보다 MFE군과 QUR투여군에서 각각 -64.6%, -62.5% 그리고 -81.2%, -76.9% 유의성 있게 감소하는 경향을 보여줌으로써 전반적으로 혈관의 경직도가 개선 된 것을 알 수 있었다.

Table 4. Effect of MFE and QUR on atherogenic index at 4weeks after treatments in HFD/STZ-induced type II diabetic mice

Groups	STD	HFD	MFE	QUR
Atherogenic Index (AI)	0.92 \pm 0.29	2.47 \pm 2.08 [#]	0.23 \pm 0.61 [*]	0.30 \pm 0.56 [*]
TC/HDL-C	1.92 \pm 0.70	3.47 \pm 3.08 [#]	1.23 \pm 1.61 [*]	1.30 \pm 1.56 [*]
TG/HDL-C	1.10 \pm 1.24	1.86 \pm 3.56 [#]	0.35 \pm 0.92 [*]	0.43 \pm 1.03 [*]

Atherogenic index was calculates as (TC-HDL-C)/HDL-C

Values are means \pm SD (n=10)

^{*}p<0,05 versus STD group

[#]p<0,05 versus HFD group

5. 혈중 인슐린 및 렙틴 농도에 미치는 영향

비만형 제2형 당뇨병에 있어서 혈중 인슐린 농도 측정은 인슐린 민감성 및 저항성을 측정 할 수 있는 중요한 표지이다. 혈중 인슐린 농도는 STD군(0.1 ± 0.08 ng/mL)보다 고지방식이군(0.82 ± 0.21 ng/mL)에서 유의적으로 증가하였고, MFE투여군(0.44 ± 0.13 ng/mL)과 QUR투여군(0.5 ± 0.08 ng/mL)은 HFD군(0.82 ± 0.21 ng/mL)에 비해 각각 46%와 60% 유

의적으로 감소하였다(Fig. 5). HFD군에서 나타나는 현저하게 증가된 혈중 인슐린 농도는 인슐린 매개 포도당 흡수의 실패를 입증해준 반면, MFE군의 경우 유의적인 혈당 감소와 함께 인슐린 저항성을 개선할 수 있었다.

혈중 렙틴 농도는 정상군(0.27 ± 0.12 ng/mL)에 비해 HFD군(2.62 ± 1.69 ng/mL)에서 유의하게 증가 하였으며, MFE 투여군(1.41 ± 0.74 ng/mL)과 QUR투여군(1.88 ± 0.15 ng/mL)은 HFD군(2.62 ± 1.69 ng/mL)에 비해 각각 46%, 28% 유의하게 감소하였다.

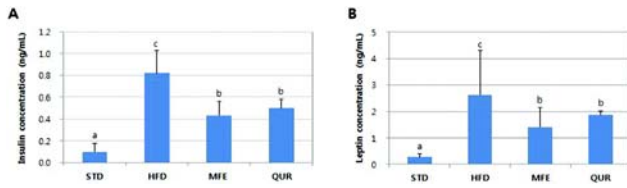


Fig. 5. Effect of MFE and QUR on serum insulin (A) and leptin (B) in HFD/STZ-induced type II diabetic mice. Values represent mean \pm SD for 10 mice in each group. ^{a-c}Means in the same row not sharing common superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

고찰

당뇨병은 체내의 인슐린 생성의 부족이나 그 작용이 불충분하여 대사조절 기능의 이상으로 발생하는 대사증후군의 하나이다. 최근 세계보건기구 발표에 따르면 2030년에는 전 세계적으로 3억 6천명 이상의 당뇨 환자가 발생 할 것으로 예측하고 있으며, 우리나라의 경우 운동부족, 과식, 스트레스증가 및 비만 인구의 증가로 인해 30세 이상의 성인 당뇨 유병률이 10%를 넘어가고 있어 사회적으로 중요한 문제로 우려되고 있다³¹⁾. 인슐린 저항성은 인슐린비의존형인 제2형 비만형 당뇨병의 중요한 병인으로 체중감소는 당뇨병 발생을 현저하게 감소 시켜 체중과 당뇨병이 밀접하게 관련 있음이 입증되었고, 비만 마우스에서 체중감소는 인슐린 저항성과 혈당조절 효과에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^{32,33)}.

현재 사용되고 있는 경구용 혈당강하제는 유산혈중, 위장 관련 불쾌감 그리고 저혈당이나 빈혈 등 다양한 부작용을 유발하므로 복용 시 상당한 주의가 필요하며 완치를 기대하기 어렵고 복잡한 기전을 가지고 있는 제2형 당뇨병의 경우 여러 조직에서 상호보완적인 효과를 기대하기가 쉽지 않다. 전체 당뇨병 90%를 차지하고 있는 성인 당뇨병인 제2형 당뇨병의 경우 대사 장애가 만성적 상태로 넘어가게 되면 신장합병증, 시력이상, 고혈압, 관상 또는 경동맥경화증과 같은 심혈관계 질환을 유발하여 사망률을 증가 시킨다. 따라서 제2형 당뇨병의 성공적인 치료를 위해서 합성의약품이 가지고 있는 부작용을 고려하여 이를 대체 할 수 있는 천연물유래 소재 개발 연구에 관심이 집중되고 있다.

상염은 한의학에서 소갈증에 사용되는 대표적인 약제로서 플라보노이드(flavonoids) 계열 화합물인 퀘르세틴을 풍부하게 함유하고 있으며, 항산화 효소를 유도하여 염증을 경감시키는 생물학적 효과가 있고^{11,12)} 소장에서 탄수화물소화에 관여하는 글루코시다아제 활성을 억제하여 혈당을 강하시키고 콜레스테롤 저하 및 체지방 축적 억제 등 생리활성을 증진시

킨다고 보고되고 있다^{8,13)}.

장기간 고지방식이를 할 경우 인슐린 저항성을 유발하지만 당뇨병을 동반하지 않으므로, 저농도 STZ를 투여 하여 췌장 β 세포의 선택적인 파괴를 유도한 당뇨동물들이 제2형 당뇨병 연구에 널리 이용되고 있다³⁴⁾. 따라서 본 연구에서는 고지방 식이와 STZ로 유도된 제2형 당뇨마우스 모델을 제작하여 상업추출물과 퀘르세틴을 투여한 후 혈당강하, 이상지질혈증 개선 및 이로 인한 혈관 기능 등을 개선 할 수 있는 항당뇨 효능이 있음을 확인하였다. 제2형 당뇨 유도 후 4주 동안의 체중 변화를 관찰 한 결과 상업추출물군과 퀘르세틴군에서 유의한 체중 감소 변화가 나타났으며 식이섭취량에 따른 변화는 모든 실험군 간의 차이가 없었다. 공복혈당은 고지방식이군의 경우 실험종료일 까지 지속적으로 상승 하였고, 이와 대조적으로 상업추출물군과 퀘르세틴군의 경우 실험 2주째부터 감소하여 실험 종료 4주째에서는 고지방식이군보다 유의적으로 감소하였다. 내당능 검사결과 포도당 섭취 후 60분, 90분, 120분에서 혈당은 상업추출물군과 퀘르세틴군에서 고지방식이군보다 유의적으로 감소하였으며 인슐린 내성 검사는 120분에서 상업추출물군과 퀘르세틴군이 고지방식이군보다 유의성 있게 감소하였다. 혈중 지질농도 변화에서 총콜레스테롤, 중성지방 그리고 LDL 콜레스테롤 농도는 고지방식이군에 비해 상업추출물군과 퀘르세틴군에서 유의적으로 감소하였고, HDL 콜레스테롤 농도는 고지방식이군에 비해 상업추출물군과 퀘르세틴군에서 증가하였다. 간독성의 지표인 GOT와 GPT효소 활성도는 고지방식이군에 비해 상업추출물군과 퀘르세틴군에서 유의하게 감소하여 상업 추출물과 퀘르세틴은 제2형 당뇨병 마우스의 간 기능을 개선시키는데 우수한 효과가 있음을 보여주었다. 당뇨로 인한 혈중 지질대사 이상은 당뇨병 치료의 주요 바이오마커이며, 당뇨병 치료에 있어서 이상지질혈증의 정상화는 매우 중요한 부분이라고 할 수 있다. 혈중 지질수준은 고혈압, 관상동맥 질환, 죽상동맥경화 같은 심혈관계 질환을 진단하거나 예측 할 수 있는 인자로 사용되고 있는데 HDL-C는 콜레스테롤을 간으로 운반하여 콜레스테롤 배설을 촉진 시키기 때문에 혈액내 HDL 농도가 증가하면 혈관 내부에 지질이 쌓이는 것을 억제한다. 그러나 LDL-C는 동맥 내벽에 플라그를 형성하여 동맥 경화를 일으키거나 혈전을 생성 시켜 심장질환 및 뇌졸중을 일으킨다³²⁾. 따라서 본 연구에서는 동맥경화지수 와 기타 동맥경화의 정도를 판단하는 지표인 TC/HDL-C 및 TG/HDL-C 측정하여 상업 추출물이 제2형 당뇨 마우스에 있어서 혈관의 경직도에 미치는 영향을 조사한 결과 상업 추출물군과 퀘르세틴군은 고지방식이군에 비해서 동맥경화지수와 TC/HDL 및 TG/HDL 지수가 모두 유의성 있게 감소하여 혈관 탄성 향상과 동맥경화의 개선 및 예방 효과로서의 가능성을 보여주었다. 렙틴은 지방세포에서 분비되며 에너지 균형과 글루코스 대사 조절에 관여하는 호르몬으로서 식욕 감소와 에너지 소비를 증가시키는 역할을 한다^{35,36)}. 렙틴을 비만 마우스에 투여했을 때 체지방 감소를 일으켜 비만치료제로서의 가능성을 기대 했으나, 여러 연구 결과에서 제2형 당뇨병과 비만 환자에서 렙틴이 혈중 내 상당히 높은 농도로 존재한다고 보고되었고, 렙틴 저항성이 발생되어 체중 감소효과를 기대하기가 어렵다. 렙틴 저항성이란 비만 마우스에서 체중 감소를 위한 증가된 렙틴 농도 조절의 실패를 의미하는데 렙틴 수용체의 감소는 불완전한 생리학적 반응을 유도

하기 때문에 렙틴 저항성 비만과 제2형 당뇨병 발병에 있어서 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{37,38)}. 혈중 인슐린과 렙틴 농도는 고지방식이군에 비해 상엽추출물군과 퀘르세틴군에서 유의적으로 감소하였다. 본 연구 결과는 혈중 렙틴과 인슐린 농도와의 연관성이 있음을 보여주며 렙틴이 고인슐린증과 인슐린 저항성에 있어서 중요한 역할을 한다는 이전 연구 결과를 뒷받침 하고 있다³⁹⁾. 따라서 상엽 추출물이 제2형 당뇨병에 있어서 혈중 인슐린과 렙틴 농도를 저하시킴으로써 인슐린 저항성과 렙틴 저항성을 감소시키고, 혈당조절과 비만개선에 효과가 있는 천연자원 식물 소재로서의 가능성이 있음을 보여준다.

이상의 결과를 바탕으로 상엽추출물은 제2형 당뇨병마우스에서 체중을 감소시키고 내당능 장애를 개선시키며 혈중 지질 성분 개선에 도움을 주고 혈당을 개선함으로써 항 당뇨효과를 나타낼 뿐 만 아니라 혈관 기능을 개선시킴으로써 당뇨병으로 인한 합병증 발생을 감소시킬 수 있는 우수한 천연자원 소재임을 보여준다.

결론

본 연구는 고지방 식이와 STZ 투여를 통해 당뇨병을 유발한 마우스에서의 상엽추출물과 퀘르세틴의 제2형 당뇨병 개선 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 상엽추출물과 퀘르세틴은 고지방식이/STZ 투여 당뇨병 마우스에서 혈당의 증가를 유의적으로 감소시켰다.
2. 상엽추출물과 퀘르세틴은 고지방식이/STZ 투여 당뇨병 마우스에서 혈청 인슐린의 증가를 유의적으로 감소시켰다.
3. 상엽추출물과 퀘르세틴은 고지방식이/STZ 투여 당뇨병 마우스에서 총콜레스테롤, LDL과 중성지방을 유의적으로 감소시키고 HDL을 증가시켰다.
4. 상엽추출물과 퀘르세틴은 고지방식이/STZ 투여 당뇨병 마우스에서 간 기능을 개선 시켰으며 동맥경화 지수 와 TC/HDL-C 및 TG/HDL-C를 감소시켜 혈관 경직도를 개선 시켰다.

이상의 결과로부터 상엽추출물과 퀘르세틴은 당뇨병에 있어서 항비만 및 항 당뇨 효과를 보여주고 이와 관련된 인슐린 저항성과 혈당조절에 긍정적인 영향을 줄 것으로 사료된다.

References

1. Lee SY, Park SL, Nam YD, Yi SH, Lim SI. Anti-diabetic Effects of Fermented Green Tea in KK-Ay Diabetic Mice. *Korean J Food Sci Technol*. 2013 ; 45(4) : 488-94.
2. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen

- KF, Landau BR, Shulman GI. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000 ; 49(12) : 2063-9.
3. Yoo SK, Kim MJ, Kim JW, Rhee SJ. Effects of YK-209 mulberry leaves on disaccharidase activities of small intestine and blood glucose-lowering in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2002 ; 31(6) : 1071-7.
4. Rondinone CM. Diabetes: the latest developments in inhibitors, insulin sensitizers. *Expert Opin Ther Target*. 2005 ; 9(2) : 415-8.
5. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006 ; 116(7) : 1784-92.
6. El-Sayyad HI, El-Sherbiny MA, Sobh MA, Abou-El-Naga AM, Ibrahim MA Mousa SA. Protective effects of *Morus alba* leaves extract on ocular functions of pups from diabetic and hypercholesterolemic mother rats. *Int J Biol Sci*. 2011 ; 7(6) : 715-28.
7. Kobayashi Y, Miyazawa M, Kamei A, Abe K, Kojima T. Ameliorative effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaves on hyperlipidemia in rats fed a high-fat diet: induction of fatty acid oxidation, inhibition of lipogenesis, and suppression of oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010 ; 74(12) : 2385-95.
8. Kim EJ, Kim GY, Kim YM, Choi KH, Jang SJ. Anti-obesity effect of mulberry leaves extraction in obese rats high-fat diet. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2009 ; 23(4) : 831-6.
9. Shim JU, Lim KT. Glycoprotein Isolated from *Morus indica* Linne Enhances Detoxicant Enzyme Activities and Lowers Plasma Cholesterol in ICR Mice. *Korean J Food Sci Technol*. 2008 ; 40(6) : 691-5.
10. Byun SH, Park SM, Kim SC, Cho IJ. Anti-fibrotic Effect of Mori Folium Extract in Hepatic Stellate Cells. *Kor J Herbology*. 2013 ; 28(4) : 49-55.
11. Chirumbolo S, Marzotto M, Conforti A, Vella A, Ortolani R, Bellavite P. Bimodal action of the flavonoid quercetin on basophil function: an investigation of the putative biochemical targets. *Clin Mol Allergy*. 2010 ; 8 : 13.
12. Shaik YB, Castellani ML, Perrella A, Conti F, Salini V, Tete S, Madhappan B, Vecchiet J, De Lutiis MA, Caraffa A, Cerulli G. Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2006 ; 20(3-4) : 47-52.
13. Kwon EH, Jung MA, Rhee SJ, Choi SW, Cho SH. Antioxidant Effect and Improvement of Lipid Metabolism of Mulberry fruit, Mulberry Leaves and Silkworm Power with Different Mixing Ratios in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Korean J Food Nutr*. 2006 ; 39(2) : 91-9.

14. Freidwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of concentration of the low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 1972 ; 18(6) : 499-502.
15. Kim SY, Lee WC, Kim HB, Kim SK. Antihyperlipidemic effects of methanol extracts from mulberry leaves in cholesterol induced hyperlipidemia in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 1998 ; 27(6) : 1217-22.
16. Andallu B, Varadacharyulu NCh. Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L, cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Chim Acta*, 2003 ; 338(1-2) : 3-10.
17. Kawakami Y, Hosokawa T, Morinaka T, Irino S, Hirano S. Antiatherogenic effect of guava leaf extracts inhibiting leucocyte-type 12-lipoxygenase activity. *Food Chem*, 2012 ; 131(4) : 1069-75.
18. Yang YR, Cho JY, Park YK. Isolation and Identification of Antioxidative Compounds 3,4-Dihydroxybenzoic acid from Black Onion. *Korean J Food Preserv*, 2012 ; 19(2) : 229-34.
19. Cirico TL, Omaye ST. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chem Toxicol*, 2006 ; 44(4) : 510-6.
20. Mahmoud MF, Hassan NA, El Bassossy HM, Fahmy A. Quercetin protects against diabetes-induced exaggerated vasoconstriction in rats: effect on low grade inflammation. *PLoS One*, 2013 ; 8(5) : e63784.
21. Kayo D, Takashi K, Masaoki H, Yosgiya H. Effect of mulberry leaves on lipid metabolism in rabbits fed a cholesterol diet. *Japanese J Nutr Food*, 1994 ; 47(1) : 15-22.
22. Choi J, Kang HJ, Kim SZ, Kwon TO, Jeong SI, Jang SI. Antioxidant effect of astragalol isolated from the leaves of *Morus alba* L, against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells. *Arch Pharm Res*, 2013 ; 36(7) : 912-7.
23. Friedewald WT, Levy RI, Fedreison DS. Estimation of concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 1972 ; 18(6) : 499-502.
24. Tan MH, Johns D, Glazer NB. Pioglitazone Reduces Atherogenic Index of Plasmain Patients with Type 2 Diabetes. *Clin Chem*, 2004 ; 50(7) : 1184-8.
25. Grover SA, Levinton C, Paquet S. Identifying Adults at Low Risk for Significant Hyperlipidemia: A Validated Clinical Index. *J Clin Epidemiol*, 1999 ; 52(1) : 49-55.
26. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*, 1957 ; 28(1) : 56-63.
27. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Conel RD, Horvath TL. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 2003 ; 37(4) : 649-61.
28. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev*, 2007 ; 8(1) : 21-34.
29. Al-Shoumer KA, Al-Asousi AA, Doi SA, Vasanthy BA. Serum leptin and its relationship with metabolic variables in Arabs with type 2 diabetes mellitus. *Ann Saudi Med*, 2008 ; 28(5) : 367-70.
30. Park CY, Hong KE. A Study on the Effect of Herbal-acupuncture with HK-1000 solution on hyperlipidemia and arteriosclerosis induced rats. *J Pharmacopuncture*, 2008 ; 11(3) : 55-66.
31. Kim SG, Choi DS. Epidemiology and Current Status of Diabetes in Korea. *Hanyang Med Rev*, 2009 ; 29(2) : 122-9.
32. Sunil C, Duraipandiyam V, Agastian P, Ignacimuthu S. Antidiabetic effect of plumbagin isolated from *Plum-bago zeylanica* L, root and its effect on GLUT4 translocation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*, 2012 ; 50(12) : 4356-63.
33. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*, 2003 ; 133(4) : 1081-7.
34. Kim IS, Lee J, Lee JS, Shin DY, Kim MJ, Lee MK. Effect of fermented yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves tea on blood glucose levels and glucose metabolism in high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. *Korean J Nutr*, 2010 ; 43(4) : 333-41.
35. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol*, 2008 ; 70 : 537-56.
36. Gilbert ER, Fu Z, Liu D. Development of a nongenetic mouse model of type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res*, 2011 ; 2011 : 416254.
37. Zhang S, Zhang Q, Zhang L, Li C, Jiang H. Expression of ghrelin and leptin during the development of type 2 diabetes mellitus in a rat model. *Mol Med Rep*, 2013 ; 7(1) : 223-8.
38. Sahu A, Nguyen L, O'Doherty RM. Nutritional regulation of hypothalamic leptin receptor gene expression is defective in diet-induced obesity. *J Neuroendocrinol*, 2002 ; 14(11) : 887-93.
39. Levin BE, Dunn-Meynell AA, Ricci MR, Cummings

DE. Abnormalities of leptin and ghrelin regulation in obesity-prone juvenile rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 ; 285(5) : E949-57.