

## 동의보감 당뇨 처방에 사용되는 한약재에서 인슐린성 물질 (Insulin-like substances)의 탐색

주영승 · 고병섭\*

우석대학교 한의과대학 본초학교실, <sup>1</sup>한국한의학연구원 검사사업부

(2002년 1월 4일 접수, 2002년 2월 18일 수리)

동의보감의 소갈 처방에서 사용하고 있는 한약재 중에서 인슐린성 물질을 탐색하기 위해 3T3-L1 지방세포 모델을 이용하여 3T3-L1 섬유아세포의 증식 및 3T3-L1 지방세포의 분화에 미치는 영향을 살펴보았다. 3T3-L1 섬유아세포의 증식율은 반하, 후박, 대황, 오가피, 창출과 보두의 열수추출물을 첨가하였을 때 세포의 분화작용에는 영향을 미치지 않았다. 마황, 과루인, 현삼과 고삼의 추출물은 3T3-L1 섬유아세포의 분화를 촉진시켰으며, 이는 인슐린성 물질이 함유되어 있을 가능성이 높음을 시사하고 있다.

**Key words:** 동의보감, 소갈 처방, 3T3-L1, 인슐린성 물질

### 서 론

오늘날 우리의 신체는 전반적인 환경위해물질에의 노출위험과 식생활양식의 인스턴트 경향으로 인체면역기능이 과거에 비해 상당히 약화되어 있는 현실에서 만성대사성 질환에 어떻게 대처해야 하는가는 중대한 관심이 되고 있다. 만성대사성 질환의 하나인 당뇨병은 장기간의 투병을 요하며 이와함께 발생하는 합병증으로 환자의 삶의 질을 떨어뜨리고 또한 수명을 단축시키기 때문에 사회적으로 큰 문제가 되고 있다. 국내의 당뇨병 환자들은 현재 2백만명으로 추산되고 있으며 점점 증가하는 추세에 있고, 이들 환자의 삶의 질을 높이기 위해서는 조기 발견과 보다 부작용이 적고 안전한 당뇨병 치료제의 개발이 한층 요구된다. 최근 한약재 및 처방들이 당뇨병 치료에 효과가 있다는 발표로 관심이 고조되고 있다.

한약을 구성하는 한약재들의 주성분은 주로 2차대사물로서 생산하는 생리활성 물질이다. 최근 인슐린성 물질(Insulin like substances)이 한약재에서 2차대사물로서 분리되어 주목을 받고 있다. Kameda 등<sup>1)</sup>은 royal jelly에 함유하고 있는 불포화지방산 *trans*-10-hydroxy-2-decanoic acid가 인슐린성 물질임을 확인하여 royal jelly가 당뇨병 예방 및 치료에 효과가 있음을 보고하였다. 또한, Krenisky 등<sup>2)</sup>은 페루 전통의약식물 *Otholobium pubescens*에서 bakuchiol을 분리하여 인슐린성 물질에 관여하고 있는 물질이라고 보고하였다.

3T3-L1 지방세포(adipocytes)는 *in vivo*에 존재하는 대사성 피아이드백 루프에 관련되어 있는 복잡한 문제와 연루되어 있지 않은 지방세포로, 3T3-L1 전지방세포(preadipocytes)는 인슐린이나 그와 유사한 유도물질의 존재 하에서 지방세포로, 분화하는 특성이 있어 인슐린성 물질을 탐색하고 인슐린 신호전달체계를 연구하는 모델로 많이 이용하고 있다.<sup>3)</sup>

한방에서 당뇨를 소갈(消渴), 소중(消中), 소신(消腎)으로 그 증(證)을 크게 나누고 있는데, “동의보감(東醫寶鑑)”의 소갈문(消渴門)은 서양의학의 당뇨병에 관한 거의 모든 내용과 동일한 증상을 놀라울 정도로 상세하게 기술하고 있다.<sup>4)</sup>

본 연구에서는 동의보감의 소갈 처방에서 사용하고 있는 한약재 중에서 인슐린성 물질을 탐색하기 위해 3T3-L1 지방세포 모델을 이용하여 3T3-L1 섬유아세포(fibroblast)의 증식 및 3T3-L1 지방세포로 분화할 때 미치는 영향을 살펴보았다.

### 재료 및 방법

**한약재료.** 본 실험에 사용한 한약재는 서울 경동시장에서 구입하여 한국한의학연구원에서 보관하고 있는 표본과 비교하여 선정한 후, 본 연구의 저자인 우석대학교 본초학교실의 주영승교수가 감정한 것을 사용하였고, 일련 번호를 붙이고 한국한의학연구원 표본실에 보관하고 있다.

**시료의 조제.** 한약재 1kg에 증류수 10 l를 넣고 2시간 열수로 2회 반복 추출한 후 거즈로 여과하고 2000 rpm으로 원심분리하여 상정액을 회전진공 농축기에서 감압농축한 후 동결건조하여 분말 엑스시료를 만들어 냉장보관하면서 시료로 사용하였다. 건조된 시료는 10% Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 0.45 μm membran 필터로 여과하여 검액으로 사용하였다.

**세포배양 및 배지.** 실험에 사용한 3T3-L1 세포는 한국세포주은행에서 구입하였고 1% fetal bovine serum(FBS), gentamycin(100 units/ml), streptomycin(100 μg/ml) 등을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 배양하였다. 3T3-L1 섬유아세포는 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(PBS, Sigma) 용액으로 씻어준 후 50 ml flask당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대배양하였다. 탈착된 세포는 1% FBS가 첨가된 DMEM배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양

\*연락처

Phone: 82-2-3447-7985; Fax: 82-2-3442-0220

E-mail: bsko@kiom.re.kr

용기(50 ml culture flask)에 옮겨 1:20의 split ratio로 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

**SRB법에 의한 세포증식율 측정.** SRB법에 의한 세포증식율 측정은 Alley 등<sup>5)</sup>과 Skehan 등<sup>6)</sup>의 방법을 응용하여 사용하였다. 10% FBS가 첨가된 DMEM배지에서 3일간 배양하고 배양 배지를 제거한 후, PBS로 세포표면을 세척하고 0.25% trypsin-EDTA 1 ml를 첨가하여 1분간 반응 후, 0.25% trypsin-EDTA를 제거, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 5 ml를 첨가하여 피펫팅하고 세포부유와 1% trypan blue를 1:1로 혼합하여 Haemacytometer로 세포수를 계산하여 5P104 cells/ml로 부유시켰다. 세포부유액 100 µl씩을 96 well plate의 각 well에 분주하여 well당 5×10<sup>3</sup> cells/ml의 세포가 접종되게한 다음 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 다시 각 well에 추출한 한약재 시료를 각각 250, 100, 10 그리고 1 µg/ml로 희석하여 첨가하였다. CO<sub>2</sub> incubator에서 2일간 배양하여 배양이 끝난 세포에 TCA(Trichloroacetic acid, Aldrich)를 최종 농도가 10%로 되게 첨가하고 4°C에서 1시간 배양하여 세포를 고정시켰다. 증류수로 5회 반복하여 세포를 세척하였다. 건조된 plate의 각 well에 1% acetic acid로 용해시킨 0.1% SRB(Sulforhodamin B, Sigma)용액 100 µl씩 가하여 상온에서 30분동안 충분히 염색시킨 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 공기중에서 건조시켰다. 완전히 건조되면 10 mM unbuffered Tris(pH 10.5) 용액을 각 well에 첨가하여 세포단백질에 부착된 SRB 염료를 10분간 잘 용출시키고 균일하게 만든 후 ELISA reader(Spectra340, Molecular Devices) 564 nm에서 흡광도(OD)를 측정하여 세포의 증식 정도를 측정하였다.

**인슐린성 물질 탐색.** Haemacytometer로 계산된 5×10<sup>3</sup> cells/ml의 세포를 24 well plate의 각 well에 넣고 PBS로 세척한 후 10% FBS를 함유하고 있는 DMEM 배지에서 완전히 confluent 상태가 될 때까지 배양하고, 새로운 DMEM/FBS 배지로 갈아주고 추출한 시료를 각각 100, 10 그리고 1 µg/ml로 첨가하여 2일동안 배양한 후(전기배양), 새로운 DMEM/FBS 배지로 갈아주고 시료를 각각 100, 10 그리고 1 µg/ml로 재첨가하여 5일간 배양하였다(후기배양). 인슐린과의 관계를 알아보기 위해, 분화유도물질인 dexamethasone 0.25 µM(DEX, Aldrich), 1-methyl-3-isobutyl-xanthine 0.5 mM(MIX, Aldrich)과 insulin(10 µg/ml, Sigma)이 함유된 DMEM/FBS 배지에 증류수로 녹인 시료를 각각 100, 10 그리고 1 µg/ml로 첨가하여 전기배양과 후기배양을 하였다. 대조군은 분화유도물질이 함유된 DMEM/FBS 배지를 사용하였다. 분화정도의 측정은 Oil-Red-O로 염색하여 측정하였는데,<sup>7)</sup> PBS로 2회 세척 후, 10% formalin을 50 µl씩 첨가(최종농도 3% formalin)으로 30분간 세포를 고정시키고, 증류수로 3회 반복하여 세척하고, 공기 중에서 건조한 다음 Oil-Red-O로 2시간 동안 염색하였다. 염색후 증류수로 3회 세척하고, 공기 중에서 건조시키고 isopropyl alcohol 100 µl씩 분주하여 1시간 동안 용출시켜 ELISA reader Spectra Max 340(Molecular Devices, USA)로 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**통계적 처리.** SRB assay와 세포의 분화능에 미치는 검액의 효과는 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 이항검정 *p*-value로 처리하였다. 대조군에 대한 *p*-value는 0.05(\*)와 0.01(\*\*)로 유의성을 판정하였다.

Table 1. The effect of traditional herbs on the proliferation of 3T3-L1 cells

Traditional herb	Rate of proliferation (%)			
	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
Control	100.0±1.6	100.1±1.6	100.0±7.6	100.0±4.2
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	99.9±0.2	100.1±1.0	98.6±4.3	77.0±5.1**
<i>Aloe ferox</i>	100.4±0.1	100.4±0.0	104.3±0.1	104.9±0.7
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	99.5±0.1	99.6±0.1	102.6±0.1	105.0±1.3
<i>Areca catechu</i>	101.2±0.3	101.2±1.3	100.2±1.3	98.8±4.1
<i>Atractylodes japonica</i>	100.2±0.5	102.2±2.3	100.5±0.4	92.3±2.5*
<i>Ephedra sinica</i>	98.1±2.9	98.4±3.3	98.1±4.0	109.0±0.8**
<i>Holotrichia diomorphalia</i>	99.9±0.2	99.8±0.4	100.1±1.2	102.1±2.9
<i>Imperata cylindrica</i>	97.8±3.0	98.2±2.9	100.1±1.2	100.4±0.9
<i>Magnolia obovata</i>	100.4±0.2	101.3±0.1	71.7±2.4**	36.3±5.6**
<i>Morus alba</i>	97.1±3.1	97.8±2.8	97.2±3.4	97.7±5.9
<i>Phragmites communis</i>	99.1±0.3	99.8±0.4	100.1±1.2	100.1±4.6
<i>Pinellia ternata</i>	69.2±2.8**	65.3±2.6**	30.2±0.7**	29.9±3.8**
<i>Polyporus umbellatus</i>	100.2±0.3	100.0±0.1	101.7±0.1	101.4±4.6
<i>Rheum palmatum</i>	98.1±2.8	98.4±2.9	94.5±2.1*	75.7±8.0**
<i>Scrophularia buergeriana</i>	100.3±0.3	100.7±0.3	100.2±0.3	100.2±2.2
<i>Sophora flavescens</i>	100.2±0.3	100.5±0.3	101.2±0.3	98.9±2.3
<i>Strychnos ignatii</i>	103.2±4.3	100.2±0.6	102.2±3.3	93.9±1.6*
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	100.3±0.1	100.5±0.1	103.8±0.1	99.6±1.0
<i>Ulmus macrocarpa</i>	98.2±2.9	98.4±3.3	99.1±1.9	99.0±1.3

<sup>a)</sup>Each value represents mean ± standard error of 5 determinations, respectively.

<sup>b)</sup>Significantly different from control group at \*\*: *p*<0.01

<sup>c)</sup>Significantly different from control group at \*: *p*<0.05

**Table 2.** Effect of traditional herbs on the adipocyte differentiation of 3T3-L1. At the confluent stage of 3T3-L1, the medium was changed by DMEM/FBS medium contained extracts and then culture plate was incubated for 48 hours. After 48 hours, the medium was changed by DMEM/FBS contained extracts, and then culture plate was incubated for further 5 days

Traditional herb	Rate of the adipocyte differentiation (%)		
	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
Control	100.0±3.7	100.0±6.4	100.0±9.1
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	100.3±1.2	99.9±4.7	101.1±7.7
<i>Aloe ferox</i>	101.8±1.9	108.6±6.3	101.3±9.7
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	97.2±8.8	109.4±4.6	99.9±7.7
<i>Areca catechu</i>	108.4±5.3	103.0±4.0	103.8±4.9
<i>Atractylodes japonica</i>	115.5±6.8*	105.7±6.1	85.5±6.8*
<i>Ephedra sinica</i>	121.9±0.2**	112.8±2.2*	87.8±2.3*
<i>Holotrichia diomorphalia</i>	100.1±4.4	107.0±4.0	106.8±4.3
<i>Imperata cylindrica</i>	101.4±7.0	103.4±3.4	107.6±0.8
<i>Magnolia obovata</i>	118.5±8.7*	107.1±2.2	99.2±6.7
<i>Morus alba</i>	105.5±6.6	102.0±5.6	106.3±6.5
<i>Phragmites communis</i>	96.6±4.2	101.4±2.1	101.2±9.0
<i>Pinellia ternata</i>	105.9±3.4	102.8±6.7	109.2±8.5
<i>Polyporus umbellatus</i>	107.3±6.4	101.3±9.8	106.6±4.3
<i>Rheum palmatum</i>	118.4±8.0*	114.0±1.3*	121.4±6.4*
<i>Scrophularia buergeriana</i>	97.1±5.9	104.0±2.2	118.8±3.0*
<i>Sophora flavescens</i>	105.4±5.0	105.7±7.3	116.2±1.2*
<i>Strychnos ignatii</i>	102.4±5.9	115.4±3.3*	64.6±3.0**
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	163.5±9.6**	165.4±0.9**	140.1±1.9**
<i>Ulmus macrocarpa</i>	106.5±5.1	106.9±2.0	63.8±8.7**

<sup>a)</sup>Each value represents mean ± standard error of 5 determinations, respectively.

<sup>b)</sup>Significantly different from control group at \*\*: p<0.01

<sup>c)</sup>Significantly different from control group at \*: p<0.05

## 결 과

**계대배양.** 3T3-L1은 DMEM/FBS 배지로 통상적인 조건인 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양되면 doubling time이 20~30 시간 걸린다고 알려지고 있으며, 본 실험에 사용한 3T3-L1 섬유아세포의 표준증식을 조사한 결과 doubling time은 16.7시간이었으며 포화밀도(saturation density)는 5×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>로 측정되어, 3T3-L1 섬유아세포의 일반적인 증식특성을 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 섬유아세포(preadipocyte)인 3T3-L1 세포는 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있고, 적절한 조건하에서 배양하면 지방세포로 분화하는 성질을 갖고 있어 지방세포의 대사와정에 있어 지방분해 억제 혹은 합성 연구에 사용하고 있다. 섬유아세포는 인슐린과 같은 유도물질의 존재 하에서는 효소활성을 급격히 증가시켜 분화를 촉진하는 특성을 가지고 있어 동·식물 중의 인슐린성 물질의 존재 여부를 탐색하는데 용이하다.<sup>9)</sup> 3T3-L1세포는 계대배양 횟수에 따라 변화가 있을 수 있는 것으로 알려져 있는데, 계대배양이 10회 이상이 되면 다소 활성이 떨어지는 경향이 있었다.

**SRB법에 의한 세포증식을 측정.** 3T3-L1세포가 지방세포로 분화되기 전단계인 전지방세포의 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과(Table 1), 3T3-L1세포의 생존율은 반하는 250, 100, 10 그리고 1 µg/ml에서 p<0.01로 억제하였고, 후박은 250과 100 µg/ml에서 p<0.01로 생존율을 억제하였다. 대황은 100와 250 µg/ml에서 각각 p<0.05와 p<0.01로 생존율을 억제하였다. 한약재 추출 시료의 농도가 250 µg/ml에서 오가피는 p<0.01,

창출과 모두는 p<0.05로 생존율을 억제 하였다. 그러나, 마황은 250 µg/ml에서 p<0.05로 생존율의 증가를 촉진하였다.

**인슐린성 물질 탐색.** 한약재를 열수 또는 메탄올추출하고 동결건조하여 만든 분말 엑스시료를 증류수에 녹여 각각 1, 10 그리고 100 µg/ml로 처리하였다. 대조군은 분화유도물질(DEX 0.25 µM, MIX 0.5 mM, 인슐린 10 µg/ml)만을 첨가한 것을 100%로 하였다. 추출 시료들은 분화유도물질들을 첨가하거나 첨가하지 않고 분화정도를 백분율로 환산하여 측정하여, 대조군에 비해 유의성 있게 분화를 촉진시키는 지를 확인하였다.

3T3-L1 섬유아세포를 계대배양과 동일한 방법으로 완전히 채워질(confluent 상태) 때까지 배양하여 DMEM/FBS배지로 새로 바꾸고 한약재 추출 시료를 넣어 2일 동안 전기배양한 후, 다시 한약재 추출 시료가 함유되어 있는 새로운 DMEM/FBS배지로 교체하여 후기배양한 결과, 과루인과 대황은 100, 10 그리고 1 µg/ml에서 각각 p<0.01과 p<0.05로 분화를 촉진하였다(Table 2). 현삼과 고삼은 100 µg/ml에서 각각 118.8±3.0%(p<0.05)와 116.2±1.2%(p<0.05)로 분화를 촉진하였다. 후박은 100과 10 µg/ml에서 분화에 영향을 미치지 않았지만 저농도인 1 µg/ml에서 p<0.05로 분화를 촉진하였다. 마황, 창출 그리고 모두는 10 또는 1 µg/ml의 저농도에서는 분화를 촉진하였거나 영향을 미치지 않았지만 100 µg/ml에서는 분화를 억제하였다. 유백피는 100 µg/ml에서 63.8±8.7%(p<0.01)로 분화를 억제하였다.

3T3-L1 섬유아세포를 동일한 방법으로 배양하여 한약재 추출 시료와 분화유도물질들을 넣고 전기배양 후, 다시 한약재

**Table 3.** Effect of traditional herbs on the adipocyte differentiation of 3T3-L1. At the confluent stage of 3T3-L1, the medium was changed by DMEM/FBS medium contained inducers (dexamethasone and 1-methyl-3-isobutylxanthine and insulin) and extracts and then culture plate was incubated for 48 hours. After 48 hours, the medium was changed by DMEM/FBS contained inducers and extracts, and then culture plate was incubated for further 5 days

Traditional herb	Rate of the adipocyte differentiation(%)		
	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
Control	100.0±5.8	100.0±8.8	100.0±6.6
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	98.7±6.7	106.9±4.7	42.6±5.4**
<i>Aloe ferox</i>	97.0±5.4	112.3±9.6	54.0±10.1**
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	105.5±1.8	119.1±11.6	92.3±12.2
<i>Areca catechu</i>	107.2±8.0	103.4±5.4	105.6±1.7
<i>Atractylodes japonica</i>	109.3±7.7	114.4±7.2	96.3±6.6
<i>Ephedra sinica</i>	98.5±2.4	99.1±3.2	86.8±5.7*
<i>Holotrichia diomorphalia</i>	105.5±0.9	110.6±6.7	105.3±8.2
<i>Imperata cylindrica</i>	105.1±2.9	104.5±5.1	64.9±6.2**
<i>Magnolia obovata</i>	110.9±5.2	95.2±4.7	96.8±5.4
<i>Morus alba</i>	100.2±5.3	108.8±4.6	103.4±2.2
<i>Phragmites communis</i>	94.6±0.8	110.9±4.2	28.4±3.5**
<i>Pinellia ternata</i>	102.9±2.3	111.6±5.7	101.3±3.4
<i>Polyporus umbellatus</i>	101.1±4.0	105.4±3.2	64.6±3.8**
<i>Rheum palmatum</i>	92.7±5.4	109.3±4.8	102.3±0.5
<i>Scrophularia buergeriana</i>	118.2±8.9*	97.0±8.3	89.3±11.4
<i>Sophora flavescens</i>	115.7±4.8*	124.1±7.1*	101.7±6.7
<i>Strychnos ignatii</i>	105.0±3.0	108.6±6.0	97.1±4.2
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	140.5±8.5**	138.6±3.9**	105.2±3.1
<i>Ulmus macrocarpa</i>	105.2±3.1	106.0±1.3	98.1±4.6

<sup>a)</sup>Each value represents mean ± standard error of 5 determinations, respectively.

<sup>b)</sup>Significantly different from control group at \*\*: p<0.01

<sup>c)</sup>Significantly different from control group at \*: p<0.05

추출 시료와 분화유도물질들이 함유되어 있는 새로운 DMEM/FBS배지로 교체하여 후기배양한 결과, 과루인은 1과 10 µg/ml에서 p<0.01로 분화를 촉진하였지만 100 µg/ml에서는 분화에 영향을 미치지 않았다(Table 3). 현삼은 1 µg/ml의 저농도에서 118.2±8.9%(p<0.05)와 고삼은 10 또는 1 µg/ml에서 각각 p<0.05로 분화를 촉진하였다. 오가피, 노회, 백모근, 노근 그리고 저령은 100 µg/ml에서 p<0.01로 분화를 억제하였다. 또한, 마황은 100 µg/ml에서 86.8±5.7%(p<0.05)로 분화를 억제하였다.

## 고 찰

동·식물에서 생산하는 이차대사물이 체내에서 인슐린과 같은 작용을 하는 것이 있음을 확인되어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Sekiya와 Zheng<sup>8)</sup>는 약용 인삼 추출물이 3T3-L1 전지방세포의 분화를 촉진시켜 항당뇨병 작용에 관여하고 있음을 보고하였고, Broadhurst 등<sup>9)</sup>은 허브 및 약용식물에서 3T3-L1 섬유아세포를 모델로 인슐린성 물질의 존재를 보고하고 있다.

인슐린성 물질은 인슐린의 화학적 구조는 아니지만 체내에서 인슐린처럼 행동하는 물질로서 지방합성을 촉진시키든지 지방 분해를 억제하는 역할에 깊게 관여하고 있는 특성을 가지고 있는데, 3T3-L1 섬유아세포는 인슐린과 같은 유도물질의 존재하에서는 효소활성을 급격히 증가시켜 3T3-L1 섬유아세포를 분화시킨다.<sup>10)</sup> 본 연구에서는 이러한 3T3-L1 세포의 특성을 이용

하여 인슐린성 물질의 존재 가능성을 탐색하였다.

한약재 추출물들이 3T3-L1 섬유아세포의 증식율에 미치는 영향을 보면 반하, 후박, 대황, 오가피, 창출과 보두에서는 억제되었는데, 마황은 250 µg/ml에서 증가를 촉진하였다. 특히, 반하는 250, 100, 10 그리고 1 µg/ml에서 p<0.01로 강하게 세포의 생존을 억제 하고 있는데, 250과 100 µg/ml에서 30.2±0.7%와 29.9±3.8%로 강하게 생존율을 억제하고 있어 세포독성이 발현되고 있는 것으로 보여진다. 3T3-L1 섬유아세포의 생존율을 억제하고 있는 한약재 추출물들은 3T3-L1 섬유아세포를 지방세포로 분화하는 과정에서 Table 2의 결과를 보면 3T3-L1 섬유아세포가 증식하여 confluent 상태가 되어 다음 단계인 전기배양과 후기 배양을 거치면서 세포의 분화작용에는 영향을 미치지 않고 있다고 생각된다.

3T3-L1 섬유아세포를 지방세포로 분화유도물질이 없이 추출물만 첨가하여 분화시킨 경우, 오가피, 노회, 백모근, 노근 그리고 저령은 각 농도에서 세포의 분화에 아무런 영향을 주지 않았는데, 분화유도물질이 첨가된 경우에는 100 µg/ml에서 3T3-L1 세포의 분화를 억제하였다. 대황과 후박은 분화유도물질이 없이 추출물만 첨가한 농도에 따라 세포의 분화를 촉진시켰고, 분화유도물질을 첨가하면 추출물의 각 농도에서 세포의 분화에 아무런 영향을 주지 않았다. 창출, 마황과 보두는 분화유도물질이 없는 경우 고농도인 100 µg/ml에서 3T3-L1 세포 분화를 억제하고 있지만 저농도인 10 혹은 1 µg/ml에서는 세포의 분화를 촉진하였고, 분화유도 물질을 첨가하면 창출과 보두는 세포

분화에 아무런 영향을 주지 않지만 마황의 경우는 100 µg/ml에서 세포 분화를 억제하는 흥미로운 결과를 얻을 수 있었다. 마황 중에 함유되어 있는 ephedrine은 catecholamine의 분비를 촉진하여 지방분해를 일으킨다고 알려지고 있는데, Takaku 등<sup>11)</sup>은 마황 중에 함유되어 있는 norpseudoephedrine이 지방합성을 촉진하며 norephedrine은 저농도에서는 지방분해를 촉진하고 고농도에서는 지방분해를 억제하는 작용이 있음을 확인하였고, Konno 등<sup>12)</sup>은 마황 열수 추출물에 혈당저하작용이 있음을 보고하였다. 이 결과들에서 3T3-L1 섬유아세포의 분화과정은 검액과 유도물질 사이의 상호작용으로 일정 농도이상에서는 세포 분화를 억제하고 있고 세포막의 인슐린 수용체가 증가되는 과정에서 검액과 유도물질 사이에 농도 의존적으로 영향을 주고 있다고 추측되며 추후 더 연구 검토되어야 할 것이다.

과루인은 분화유도물질이 없이 추출물만 첨가하여 3T3-L1 섬유아세포를 지방세포로 분화시킨 경우 100, 10 그리고 1 µg/ml에서 p<0.01로 강하게 세포의 분화를 촉진시켰는데, 분화유도물질이 첨가된 경우에는 10과 1 µg/ml에서 강하게 세포의 분화를 촉진하였지만 100 µg/ml에서는 세포의 분화에 영향을 미치지 않았다. 과루근에서 Hikino 등<sup>13)</sup>은 trichosans A, B, C, D 그리고 E를 분리하여 이 물질들이 고혈당 활성이 있음을 보고하였고, 임 등<sup>14)</sup>은 과루근 분획물이 혈당을 감소시킨다고 발표하였으며, Yeung 등<sup>15)</sup>은 insulin-like peptide의 존재 가능성을 시사하였다. 현삼과 고삼은 분화유도물질이 없이 추출물만 첨가한 경우 100 µg/ml에서 세포의 분화를 촉진시켰고, 분화유도물질을 첨가하면 10 µg/ml 혹은 1 µg/ml에서 세포의 분화를 촉진시켰다.

본 연구 결과를 종합해보면, 마황, 과루인, 현삼과 고삼은 유도물질이 첨가되지 않았을 때 혹은 첨가되어 있더라도 검액이 3T3-L1 전지방세포의 분화를 촉진시켰으며, 이는 인슐린성 물질이 함유되어 있을 가능성이 높음을 시사하고 있다.

## 감사의 글

본 논문은 우석대학교 교내연구비의 지원에 의한 것으로 깊은 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. Kameda, K., Chikaki, M., Morimoto, C., Jiang, M. and Okuda, H. (1996) Insulin like action of trans-10-hydroxy-2-decanoic acid and its related substance. *J. Traditional Med.* **13**, 456-457.
2. Krenisky, J. M., Luo, J. and Carney, J. R. (1999) Isolation and antihyperglycemic activity of bakuchiol from *Otholobium pubescens*(Fabaceae), a peruvian medicinal plant used for the treatment of diabetes. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 1137-1140.
3. Murakami, N., Inoue, G., Okamoto, M., Yoshimasa, Y., Kohno, S., Hayashi, T., Kato, K., Kuzuya, H. and Nakao, K. (1997) Antihyperglycemic mechanism of M16209, an antidiabetic agent, in 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci.* **60**, 1821-312.
4. Heo Jun (1610) In *Japbyeongpyeon, Donguibogam*: Haeseongsa (A newly reprinted edition in 1994). Seoul, Korea.
5. Alley, M. C., Scudiro, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. I., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589.
6. Skehan, P., Strong, R., Scudiero D. A., Monks, A., McMahon, J., Vistica, A. D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107.
7. Dennis, J. E. and Caplan, A. I. (1996) Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of H-2Kb-tsA58 transgenic Mouse. *J. Cell Physiol.* **167**, 523-538.
8. Sekiya, K. and Zheng, Y. (1997) Effect of medical plant on peradipocyte differentiation. *J. Traditional Med.* **14**, 356-357.
9. Broadhurst, C. L., Polansky, M. M. and Anderson, R. A. (2000) Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 849-852.
10. Mukherjee, R., Hoener, P. A., Jow, L., Bilakovics, J., Klausling, K., Mais, D. E., Faulkner, A., Croston, G. E. and Paterniti, J. R. (2000) A selective peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPARgamma) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1425-1433.
11. Takaku, T., Jiang, M., Okuda, H. and Maeda, N. (1997) Isolation of Insulin like substance from *Ephedra sinica* STAPP. *J. Traditional Med.* **14**, 358-359.
12. Konno, C. (1985) Isolation and hypoglycemic activity of ephedrans A, B, C, D and glycans of *Ephedra distachya* Herbs. *Planta Med.* **51**, 162-163.
13. Hikino, H., Yoshizawa, M., Oshima, Y. and Konno, C. (1989) Isolation and hypoglycemic activity of trichosans A, B, C, D and E: glycans of *Trichosanthes kirilowii* Roots. *Planta Med.* **55**, 162-163.
14. Im, S. J. and Choe, S. K. (1997) The Effect of *Trichosanthes kirilowii* Max. Subfractions on the Insulin Activity in Streptozotocin Induced Diabetic Rats and Their Acute Toxicity. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **30**, 25-31.
15. Ng, T. B., Li, W. W. and Yeung, H. W. (1987) Effects of ginsenosides, lectins and *Momordica charantia* insulin-like peptide on corticosterone production by isolated rat adrenal cells. *J. Ethnopharmacol.* **21**, 21-9.

---

**Screening of Insulin-like Substances from Traditional Herbs of Diabetes Prescription in Donguibogam**

Young-Sung Ju and Byoung-Seob Ko<sup>1\*</sup> (*Oriental medical College, Woosuk University, Jeonju 565-701, Korea; <sup>1</sup>Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul 135-100, Korea*)

**Abstract:** In order to search for insulin-like substances from the constituted herbs of Sogal prescriptions, we selected 19 traditional herbs, based on a review of the Donguibogam. The effects of the hot-water extract from the selected herbs on the proliferation and the differentiation of 3T3-L1 fibroblasts were tested. The various water-extracts from *Pinellia ternata*, *Magnolia obovata*, *Rheum palmatum*, *Acanthopanax sessiliflorum*, *Atractylodes japonica* and *Strychnos ignatii* inhibited the proliferation of 3T3-L1 fibroblasts, did not influence entirely in differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. Treatment of 3T3-L1 fibroblasts with the extract from *Ephedra sinica*, *Trichosanthes kirilowii*, *Scrophularia buergeriana* and *Sophora flavescens* significantly increased the differentiation of the cells. In conclusion, these may contain such compounds that play a role of insulin-like action.

---

Key words: Donguibogam, Sogal prescriptions, 3T3-L1, insulin-like substances

\*Corresponding author