

원 저

薏苡仁이 3T3-L1 Adipocytes에서 인슐린성 작용과 인슐린 민감성에 미치는 영향

김중욱, 최용휴, 주영승, 박선민¹⁾, 이미영²⁾, 김호경²⁾, 김홍준²⁾, 고병섭²⁾

우석대학교 한의과대학, 호서대학교 식품영양학과¹⁾, 한국한의학연구원 검사사업부²⁾

Effect of Insulin-like Action and Insulin Sensitizing on 3T3-L1 Adipocytes from *Coicis Semen*

Jong-Uk Kim, Yong-Hyu Choi, Young-Sung Ju,
Sun-Min Park¹⁾, Mi-young Lee²⁾, Ho-Kyoung Kim²⁾, Hong-Jun Kim²⁾, Byoung-Seob Ko²⁾

Oriental medical College, Woosuk University,
Food and Nutrition, Hoseo University¹⁾,
Korea Institute of Oriental Medicine²⁾

Objectives: In this study, water extracts from *Coix lachryma-jobi* Linne var. mayuen Stapf. were investigated for their effects on insulin-like action and glucose uptake in 3T3-L1 cells.

Methods: We examined the effects of insulin-like action on the differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. The *Coicis Semen* was treated with hot water and the extract was freeze-dried. The hot water extract was chromatographed on nonionic polymer resin (Amberlite XAD-4, Sigma) with distilled water (Fr. 1), 20% (Fr. 2), 40% (Fr. 3), 60% (Fr. 4), 80% (Fr. 5), and 100% EtOH (Fr. 6), successively.

Results: Total extract of *Coicis Semen* was fractionated into 0 to 100% MeOH with Amberlite XDA-4 column. Treatment of cells with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of total extracts of *Coicis Semen* significantly increased the differentiation ($p < 0.05$). At 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ level of insulin, the differentiation was accelerated ($p < 0.01$). The effect of extracts plus insulin on the differentiation was greater than that of insulin alone. In 3T3-L1 adipocytes, glucose uptake was higher by 2.7 times with 5 μM of total extract in low dosage of insulin (3 ng/ml) than without total extract. 5 and 50 μM of water and 40% MeOH fractions increased glucose uptake by 3.5 times in 3T3-L1 adipocytes ($p < 0.001$).

Conclusions: *Coicis Semen* contains compounds which play a role of insulin-like action and insulin sensitizer. (J Korean Oriental Med 2002;23(1):83-91)

Key Words: 3T3-L1 adipocytes, insulin-like action, insulin sensitizer

서론

· 접수 : 2001년 10월 8일 · 채택 : 2002년 1월 2일
· 교신저자 : 고병섭, 서울시 강남구 청담동 129-11 세신빌딩
한국한의학연구원
(Tel. 02-3447-7985, FAX. 02-3442-0220, E-mail:
bsko@kiom.re.kr)

최근에 들어 식생활 습관의 변화에 따른 지방 섭

취량의 증가와 스트레스가 급증하면서 제2형 당뇨병의 발생이 최근 전체 인구의 10% 이상 도달할 정도로 그 발병률이 증가하고 있다¹⁾. 우리나라에서는 당뇨병의 95% 이상을 차지하고 있는 것이 제2형 당뇨병이며, 이의 원인은 아직까지 밝혀지지 않았지만 인슐린의 작용력과 인슐린 분비능의 감소로 인한 것이라는 것이 지배적인 가설이다. 인슐린 작용력이 감소하면 근육과 지방조직에서 포도당 이용이 감소하여 혈당이 증가하므로 혈당을 정상화하기 위해서는 인슐린 저항성을 극복할 수 있을 정도로 인슐린 분비가 증가해야 하는데, 이때 체장의 베타세포에서 인슐린을 충분히 분비하지 못하면 제2형 당뇨병으로 발전할 수 있다고 보는 것이다. 그러므로 당뇨병의 치료를 위해서는 인슐린의 작용을 증가시키거나 인슐린 분비를 증가시키는 것이 필요하다²⁾.

최근 한약재를 소재로 한 당뇨병 연구를 살펴보면, 누에·天花粉(하늘타리뿌리), 葶藶(둥굴레뿌리), 枸杞子, 決明子 및 山藥(참마)의 혈당강하 효과에 대한 보고가 있다³⁾. 이중 임 등은 스트렙토조토신을 투여하여 당뇨병을 유발시킨 白鼠에서 하늘타리뿌리 핵산 추출물의 subfraction A와 C가 혈당을 감소시킨다고 보고하였다. 그러나 이 연구에서는 공복시 혈당과 혈중 콜레스테롤의 변화만을 측정하였을 뿐 제2형 당뇨병의 원인으로 알려진 인슐린 저항성이나 인슐린 분비능에 미치는 영향을 측정하지는 않았다⁴⁾. 제2형 당뇨병의 치료에 효과적인 물질을 한약재로부터 찾기 위해서는, 한약재나 분리한 물질이 인슐린 작용력을 호전시키는 지 또한 인슐린 분비를 증가시키는 지를 조사하는 것이 중요하다고 본다.

薏苡仁은 禾本科에 속한 울무 *Coix lachryma-jobi* Linn var. *mayuen* Stapf.의 種仁으로서 甘淡涼無毒하고 脾胃肺經에 歸經하며 健脾滲濕 除痺止瀉 清熱排膿의 효능을 가지고 痰熱을 다스리는 利水滲濕藥이다⁶⁾. 최근에는 임상가에서 비만과 당뇨처방의 구성 약재로 많이 사용되고 있으며, 민간에서는 옛부터 당뇨 식이로도 많이 이용되고 있다.

본 연구에서는 薏苡仁이 인슐린과 유사한 작용을 하는 인슐린성 물질과 인슐린 작용력을 호전시키는

인슐린 민감성을 함유하고 있는지를 탐색하기 위해, 3T3-L1 섬유아세포모델을 이용하여 薏苡仁의 분획 추출물이 3T3-L1 섬유아세포가 3T3-L1 지방세포로 분화할 때 미치는 영향과 3T3-L1 지방 세포내로의 포도당 흡수에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 薏苡仁은 강원도 양양단위농협에서 시판하고 있는 것을 구입한 후, 우석대학교 본 초학교실에서 엄선하여 사용하였고 일련 번호를 붙이고 표본실에 보관하였다.

시료의 조제

薏苡仁 1 kg에 증류수 10 L을 넣고 2시간 동안 熱水로 2회 반복 추출한 후 gauze로 여과하고 2000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 감압농축한 후 동결건조하여 분말 엑스시료 279.8 g을 만들었다. 熱水 엑스시료를 물에 현탁시킨 후 MeOH을 증량시켜 극성을 변화시키면서 Amberlite XAD-4 gel을 사용한 column chromatography를 실시하여 H₂O (Fr. 1), 20% EtOH (Fr. 2), 40% EtOH (Fr. 3), 60% EtOH (Fr. 4), 80% EtOH (Fr. 5) 및 100% EtOH (Fr. 6)으로 나누어 분획하여 저온에서 감압농축 후 동결건조하여 인슐린과 유사하게 작용하는 인슐린성 물질 탐색 실험과 세포내로의 포도당 흡수실험을 하는 측정 시료로 사용하였다.

균주 및 배지

실험에 사용한 3T3-L1 섬유아세포는 한국세포주은행에서 구입하였고 1% fetal bovine serum (FBS), gentamycine (100 units/ml), streptomycin (100 g/ml) 등을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다. 3T3-L1 섬유아세포를 계대 배양할 시 50 ml flask당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin 용액을 제거하고 37℃에서 5분간 보관하여 세

포를 탈착시켰다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 50 ml 배양 flask에 옮겨 37℃에서 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.

인슐린성 물질 탐색 실험 (Insulin like substances assay)

혈구계산기 (Hemocytometer)로 계산된 5×10^3 cells/ml의 세포를 24 Well plate의 well에 넣고 phosphate buffer saline (PBS)로 세척한 후 1% 알부민을 함유하고 있는 DMEM 배지에서 2일 동안 배양한 후, 새로운 DMEM 배지로 갈아주고 熱수로 추출한 薏苡仁 시료를 각각 10 $\mu\text{g/ml}$ 및 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가하여 5일간 배양하였다. 인슐린성 물질로 작용하는 지를 조사하기 위해, 비교 대조군으로 분화유도물질인 dexamethasone(DEX, Aldrich) 0.25 M, 1-methyl-3-isobutyl-xanthine(MIX, Aldrich) 0.5 mM, 인슐린 (10 $\mu\text{g/ml}$, Sigma)이 함유된 DMEM 배지에 시료를 1000, 100, 10, 1 및 0 $\mu\text{g/ml}$ 로 각각 첨가하여 5일간 배양하였다. 분화정도의 측정은 Oil-Red-O로 염색하여 측정하였는데, PBS로 2회 세척 후, 10% formalin을 50 μl 씩 첨가(최종농도 3% formalin)하여 30분간 세포를 고정시키고, 증류수로 3회 반복하여 세척하고, 공기 중에서 건조한 다음 Oil-Red-O로 2시간 동안 염색하였다. 염색후 증류수로 3회 세척하고 공기 중에서 건조시키고 iso-propyl alcohol 100 μl 씩 분주하여 1시간 동안 용출시켜 ELISA reader(Spectra 340, Molecular Devices)로 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

포도당의 세포내로의 흡수실험 (Glucose transport assay)

3T3-L1 섬유아세포를 플라스크에 가득 찰 때 (confluent) 까지 배양한 후 분화 유도 물질이 함유된 배지를 넣어 3일 동안 배양하여 지방세포로 전환시킨 후 그 수를 세어 12 well plate의 well를 빈 공간없이 채울 수 있도록 넣었다. 12 well plate에 옮긴 지방세포를 PBS로 세척한 후 1% 알부민을 함유하고 있는 저농도의 포도당을 함유한 DMEM에서 37℃에서

30분 동안 배양한 후 1 $\mu\text{Ci/ml}$ of [¹⁴C]2-deoxyglucose와 1 mM glucose을 첨가하고 22℃에서 30분 동안 배양하였다. 비특이적인 포도당 흡수를 배제하기 위해서 glucose transporter 4 (GLUT4)의 작용을 억제하는 cytochalasin B와 함께 배양하였을 때의 포도당 흡수량을 빼고 세포내로의 포도당 흡수량을 측정하였다. 세포는 10 mM 포도당이 함유된 PBS으로 세척하고 0.5 N NaOH로 세포를 분해하였다. 분해된 세포를 초산으로 중화시키고 함유된 ¹⁴C의 함량을 베타 카운터로 측정하였다.

인슐린 농도에 따른 세포내로의 포도당 흡수반응 실험
인슐린 농도에 따라 3T3-L1 지방세포의 포도당의 세포내로의 흡수에 미치는 영향을 조사하기 위해서 인슐린 0, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75 ng/ml에서의 포도당의 세포내로의 흡수정도를 측정하였다.

薏苡仁 분획이 포도당 흡수에 미치는 영향

薏苡仁의 熱水 추출물에 대한 분획을 DMSO에 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 녹인 후 이것을 PBS에 5와 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석시켜 두 가지 농도에서 포도당의 세포내로의 흡수를 측정하였다. 熱水 추출물의 각 분획에 인슐린 민감성 재제가 함유되어 있는지의 여부를 조사하기 위해서 3T3-L1 지방세포에 인슐린 3 ng/ml과 함께 각 분획을 넣고 1시간 동안 배양한 후에 세포내로 포도당의 흡수를 측정한 결과를 인슐린 50 ng/ml에서의 포도당 흡수정도와 비교하였다. 대조군으로 인슐린 0 ng/ml (기저 상태, basal state), 3 ng/ml, 인슐린 50 ng/ml을 사용하였다. 모든 실험은 세번 반복하였고, 분리한 물질이 인슐린의 작용에 관계없이 detergent로 작용하여 세포막을 파괴시켜 포도당의 흡수를 증가시키는 것을 배제하기 위해서 인슐린이 0 ng/ml에서 분리한 물질과 함께 포도당 흡수를 측정하였을 때 이 값이 기저 상태의 값보다 높은 것은 포도당의 흡수를 증가시킨다고 해도 인슐린 민감성제재로서의 작용이 없는 것으로 간주하였다.

통계적 처리

薏苡仁 분획을 첨가하였을 때 지방세포로의 분화 정도는 대조군과 비교하여 two-sample t-test로 하였다. 또한 세포내로의 포도당 흡수가 증가하는 정도는 인슐린 3 ng/ml만을 넣고 측정 한 값과, 인슐린 3 ng/ml와 薏苡仁 분획을 함께 넣고 측정 한 값을 two sample t-test로 통계적 유의성을 검증하였다. 모든 통계 처리의 유의성 검증은 p<0.05로 정하였다.

결 과

인슐린성 물질 탐색 실험

3T3-L1 섬유아세포는 DMEM/FBS 배지로 통상적인 조건인 37℃에서 5% CO₂ 항온기에서 배양하면 doubling time이 20~30시간 걸린다고 알려져 있으나, 본 실험에 사용한 3T3-L1 섬유아세포의 표준증식을 조사한 결과 doubling time은 16.7시간이었으며 포화밀도 (saturation density)는 5×10⁴ cells/cm²로 측정되어, 3T3-L1 세포의 일반적인 증식특성을 보유하고 있는 것으로 확인되었다.

薏苡仁을 熱水추출한 분말 엑스시료를 증류수에 녹여 각각 10 µg/ml 및 1 µg/ml로 3T3-L1 섬유아세포에 처리하였고, 이때 분화 유도 물질을 첨가하였을

때와 첨가하지 않았을 때 각각에 대해서 유도 분화 물질만을 첨가한 것의 분화 정도에 대한 백분율로 환산하여 측정하였다. 대조군은 유도 분화물질만을 처리한 것을 100%로 정하였다. 분화유도물질이 첨가되지 않은 경우 1 µg/ml에서는 변화가 없었으나 10 µg/ml의 농도에서 110.9±3.6% (p<0.05)로 유의성 있게 분화를 촉진시켰다. 분화유도물질을 첨가하였을 때, 1 µg/ml와 10 µg/ml에서 각각 123.5±5.2% (p<0.01)와 111.7±4.5% (p<0.05)로 분화를 촉진 시켰다 (Fig. 1).

인슐린 농도에 따른 세포내로의 포도당 흡수반응 실험

인슐린 0, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75 ng/ml에서의 세포내로 포도당 흡수 정도를 측정하였을 때 세포내로 포도당의 흡수는 인슐린이 없는 기저 상태에 비해 인슐린이 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75 ng/ml로 증가하였을 때 세포내로의 포도당 흡수는 1.3, 2.4, 4.6, 8.2, 8.8 그리고 8.8 배로 증가하였다. 즉, 인슐린 농도가 25 ng/ml 이하에서는 인슐린 농도가 증가함에 따라 세포내로의 포도당 흡수가 증가하였지만, 인슐린 농도가 25 ng/ml 이상에서는 인슐린 농도의 증가에 따라 포도당 흡수가 증가하지 않고 최대 정점 (plateau)을 이루었다 (Fig. 2). 그러므로 본 연구에서는 薏苡仁의 분획이 인슐린 작용력을 증가시키는지를 조사하기 위해

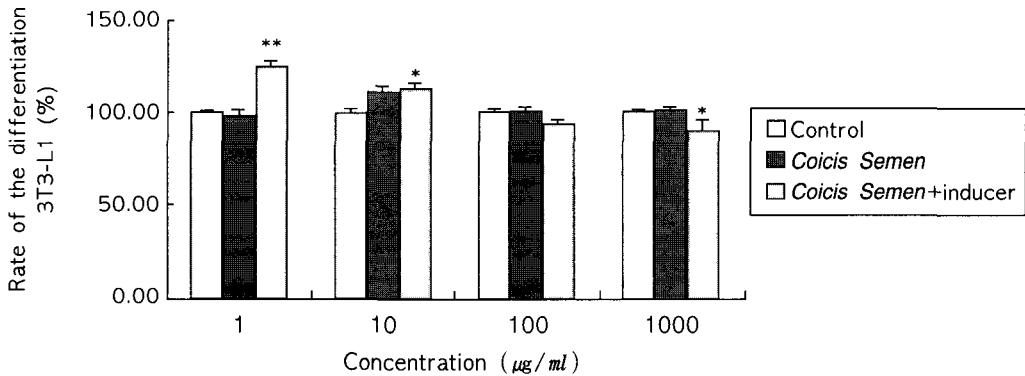


Fig. 1. Effect of Coicis Semen on the adipocyte differentiation of 3T3-L1.

**Significantly different from control group at p<0.01

* Significantly different from control group at p<0.05

서 소량의 인슐린으로 3 ng/ml를 사용하였고 이 농도에 薏苡仁 분획을 첨가하여 포도당 흡수가 증가하여 인슐린 50 ng/ml에서의 포도당 흡수량과 비교하여 인슐린 민감성 제제를 탐색하였다.

薏苡仁 분획이 포도당 흡수에 미치는 영향

3T3-L1 지방세포에서 Amberlite XAD-4 gel을 이용하여 용매의 극성 변화에 의해 나누어진 薏苡仁 분획들을 5와 50 µg/ml에서 세포내로의 포도당 흡수를 조사하였을 때 결과를 Fig. 3와 Fig. 4에 주었다. 용매에 의해 분획하기 전 상태인 薏苡仁 분말엑스에 대해서도 세포내로의 포도당 흡수를 조사하여 비교하였다. 5 µg/ml의 H₂O (Fr. 1)와 40% (Fr. 3) 분획층을 첨가하였을 때가 첨가하지 않은 것에 비해 세포내로의

포도당 흡수량이 현저하게 증가하였고, 5 µg/ml보다는 증가폭이 적었지만 50 µg/ml에서도 Fr. 1과 Fr. 3을 처리한 군이 처리하지 않은 군에 비해 포도당 흡수가 현저하게 증가하였다. 薏苡仁 분말엑스도 Fr. 1과 Fr. 3 만큼 현저하지는 않았지만 포도당 흡수를 증가시켰고, 분획 EtOH 60% (Fr. 4)도 세포내로 포도당 흡수를 증가시켰다. Fr. 4도 농도에 따른 차이를 보여 50 µg/ml의 경우에 비해 5 µg/ml의 경우에 포도당 흡수가 더 높았지만 Fr. 1이나 Fr. 2 보다는 그 양이 적었다. Fr. 1, Fr. 2, Fr. 4의 첨가가 포도당 흡수를 증가시키는 것은 detergent로 작용하여 포도당을 세포내로 비특이적으로 흡수되는 것은 아니었다. 한편 EtOH 80% (Fr. 5)와 100% (Fr. 6)은 오히려 인슐린 작용력을 현저히 감소시켰다.

고 찰

3T3-L1 섬유아세포는 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있는데, 인슐린과 같은 유도물질의 존재하에서는 지방세포로 분화되는 특성을 갖고 있어 지방세포의 대사과정에 있어 지방분해를 억제 혹은 촉진하는 물질을 탐색하거나 그 기전을 연구하는데 사용되어지고, 또한 분화를 촉진하는 물질인 인슐린과 유사한 물질(인슐린성 물질)의 존재 여부를 탐색하는데 사용한

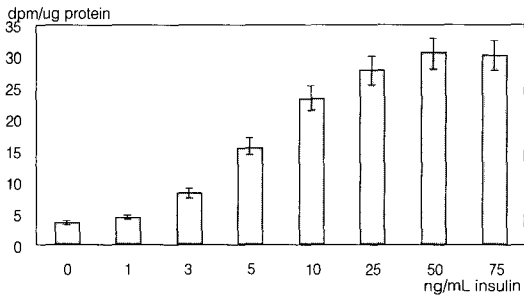


Fig. 2. Insulin dose response.

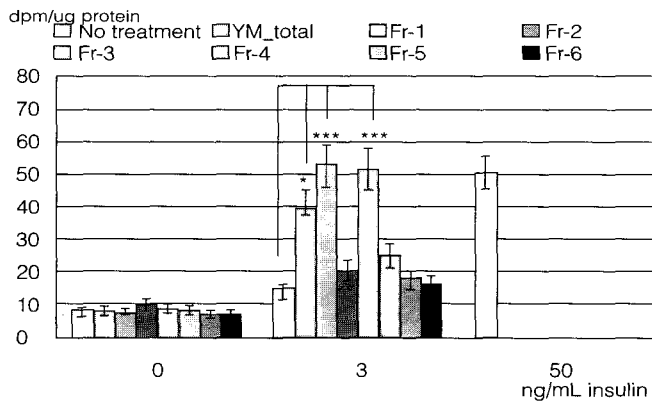


Fig. 3. Glucose transport assay with 5 µg/ml fractions isolated from *Coicis Semen*.

*** Significantly different from no treatment group at P<0.001
* Significantly different from no treatment group at P<0.05

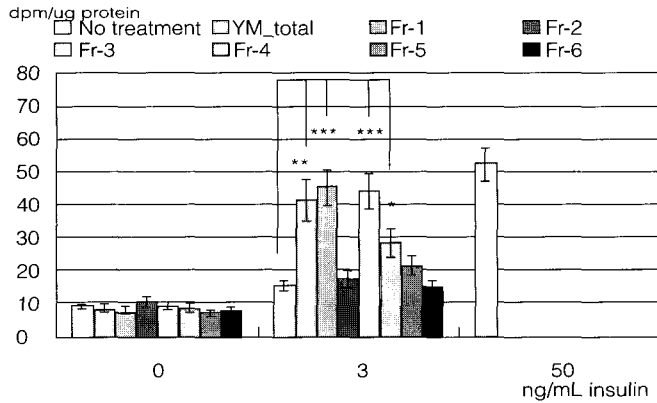


Fig. 4. Glucose transport assay with 50 $\mu\text{g/ml}$ fractions isolated from *Coicis Semen*.

- *** Significantly different from no treatment group at $P < 0.001$.
- ** Significantly different from no treatment group at $P < 0.01$.
- * Significantly different from no treatment group at $P < 0.05$.

다. 3T3-L1 섬유아세포가 지방세포로 분화하면 3T3-L1 지방세포는 *in vivo*에 존재하는 대사성 피이드백 루프에 관련되어 있는 복잡한 문제와 연루되어 있지 않은 지방세포로 인슐린 수용체와 GLUT4를 세포막에 가지고 있어 인슐린이 인슐린 수용체와 결합하여 신호전달과정을 통해 포도당의 흡수를 조절하는 역할을 가지고 있어서 인슐린의 작용력을 향상시키는 물질을 탐색하고 인슐린 신호전달체계를 연구하는 모델로 많이 이용하고 있다. Krenisky JM⁹⁾은 페루 전통의약식물 *Otholobium pubescens*에서 bakuchiol을 분리하여 인슐린 민감성에 관여하고 있는 물질이라고 보고하였고, Hong SJ¹⁰⁾은 人蔘, 天門冬, 黃芩, 地骨皮, 黃柏, 麥門冬으로 구성된 혼합처방이 3T3-L1 지방세포에서 포도당 흡수를 증가시켰다고 보고하고 있다.

특히, 한약을 구성하는 한약재들은 자연의 상태를 순응하면서 독특한 자기 영역을 구축하는데, 그 중에서 주목할 만한 것은 2차대사물로서 생산하는 생리 활성 물질이다. 최근 인슐린성 물질이 한약재에서 2차대사물로서 분리되어 주목을 받고 있는 점도 이런 맥락에서 해석되어질 수 있는 것이다. Kameda는 지방세포에 의한 지방분해와 합성은 음과 양의 대사이고, 또한 생체내의 호르몬은 대사의 음과 양을 나누

는 눈을 갖고 있고, 인슐린은 지방세포에 의한 지방 분해를 저해하고 지방합성을 촉진하며, 카테콜아민은 분해를 촉진하고 합성을 억제한다고 하였다. 인슐린처럼 지방합성을 촉진시키든지 지방분해를 억제하는 물질을 인슐린성 물질이라고 정의하고, Royal jelly로부터 불포화지방산 *trans-10-hydroxy-2-decanoic acid*와 麻黃에서 *nor-pseudoephedrine*이 인슐린성 물질임을 확인하였다¹¹⁾. 한약의 당뇨 치료효과와 인슐린성 물질과의 관계는 한방처방의 비밀을 열어 줄 수 있는 돌파구가 될 수 있는 가능성과 새로운 당뇨병 한방 치료제로써 기대를 한층 높여 주고 있다.

薏苡仁이 효능은 이수삼습(利水滲濕), 제습비(除濕痺), 청열배농(淸熱排膿), 건비지사(健脾止瀉)로서 체내에 비정상적인 수분이 잘 통하도록 하는 역할을 한다^{6,8)}. 한의학에서의 消渴은 二陽이 熱結한 것으로서 上中下 三消로 나누고 있다. 정상적이지 못한 熱을 처리함에 있어서 脾主運化기능을 적용함은 하나의 치료방법이 될 수 있는 바, 이는 運化機能의 失調로 水濕대사에 이상이 생긴 것으로 설명할 수 있는 것이다. 다시 말하면 水濕대사에 관계하는 한약재와 치료법등은 消渴치료의 대상으로 적용될 수 있는 것이다. 즉, 인체 내에 濕의 기운이 너무 강하면 土의

기운을 가진 脾臟의 水濕運化에 영향을 미치게 되고, 이때에 薏苡仁과 같은 利水滲濕藥을 사용한다면 불필요한 水濕을 소변을 통하여 배출하여 줌으로써, 결과적으로는 脾臟의 運化를 정상적으로 만들어 준다고 할 수 있다. 현재 임상에서 薏苡仁이 당뇨와 비만 처방의 구성약재로서 많이 응용되어지고 있고, 민간에서는 옛부터 消渴의 食餌에 이용되어졌음도 이러한 면을 반영한다고 보여진다.

薏苡仁의 추출물이 3T3-L1 섬유아세포에서 지방세포로 분화할 때 미치는 영향은 Fig. 1로 정리하였는데, 분화유도물질이 첨가되지 않은 경우 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 분화에 거의 영향을 미치지 않았고, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 통계적으로 유의하게 분화를 촉진시켰다 ($p<0.05$). 분화유도물질을 첨가하였을 때는 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 세포의 분화 촉진을 가속화시켰지만 ($p<0.01$), 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 1 $\mu\text{g/ml}$ 에 비해 오히려 세포의 분화가 둔화되었다 ($p<0.05$). 3T3-L1 섬유아세포의 분화에 있어 薏苡仁 시료와 유도물질의 상호 작용에 의해 비특이적으로 영향을 미치는 것인지 조사하기 위해 고농도로 검액 시료를 조제하여 각각 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 1000 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 薏苡仁 추출물의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 분화를 억제하는 경향은 보여 통계적 유의성은 없었지만, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 $90.1\pm 2.9\%$ 로 세포의 분화를 억제하였다 ($p<0.01$). 이 결과가 3T3-L1 섬유아세포의 분화과정에서 유도물질과 薏苡仁 시료 간의 상호작용에 의한 것인지 薏苡仁 시료에 대한 농도 의존적인지를 확인하기 위해서 분화유도물질을 첨가하지 않고 각각 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 1000 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였는데 분화에 거의 영향을 미치지 않았다. 薏苡仁 추출물은 전지방세포 3T3-L1의 분화를 촉진시키는 유도물질의 작용점에서 3T3-L1이 인슐린에 더욱 민감하게 작용하여 세포분화와 함께 세포막의 인슐린 수용체가 증가되는 과정에서 유도물질 사이에 상호작용을 하여 고농도에서는 분화를 억제하고 있으며, 농도 의존적으로는 작용하지 않고 있다고 추측되며 추후 더 연구 검토되어야 할 것이다. 이러한 결과는 Takaku T.들에 의해서도 확인되고 있는데, 그들은 麻黃에 함

유되어 있는 ephedrin과 norephedrin에 대한 인슐린성 작용을 검토하였는데, norephedrin은 저농도에서는 지방분해를 촉진하고 고농도에서는 지방분해를 억제하는 작용을 가지고 있음을 확인하였다¹²⁾. 또한, 이들은 비만연구에서 자스민차가 지방합성에 미치는 영향을 검토한 결과 자스민차 단독으로는 어떠한 영향도 미치지 않았지만, 인슐린의 존재하에서 지방합성을 저해하였다고 보고하고 있다¹³⁾.

薏苡仁의 추출물이 3T3-L1 섬유아세포에서 지방세포로 분화할 때 미치는 영향을 종합해보면, 유도물질이 첨가되지 않았을 때 혹은 첨가되어 있더라도 검액의 농도가 저농도에서 3T3-L1 섬유아세포의 분화를 촉진시킨 것은 인슐린성 물질이 함유되어 있음을 시사하는 것이다.

3T3-L1 섬유아세포가 분화유도에 의해 인슐린 수용체 (receptor) 수가 35배정도 급격히 증가되는 특성이 있어 당뇨병의 연구에 있어 포도당 흡수 및 전반적인 대사능이 변화를 측정하는데 이용되고 있는데, Manchem et al.¹⁴⁾에 연구에 따르면 3T3-L1 지방세포를 3.2 μM 이상의 인슐린과 함께 TLK16998을 배양하였을 때 2-deoxyglucose 흡수를 증가시켰다. TLK16998은 인슐린이 인슐린 수용체에 결합한 후 autophosphorylation을 촉진시키고 downstream의 signalling에 있는 IRS-1의 phosphorylation과 GLUT4 translocation을 촉진시키는 것으로 보고하였다. 또한, Mukherjee et al.¹⁵⁾에 따르면 rosiglitazone과 같은 Peroxisome Proliferation Activated Receptor (PPAR)- α agonists는 3T3-L1 섬유아세포를 지방세포로의 분화를 증가시키지는 않지만 지방세포내로의 포도당 흡수는 증가시켰다. 동·식물에서 생산하는 2차대사물이 체내에서 인슐린 민감성 제재로 효과가 있는 것은, 인슐린이 없을 때는 세포내로 포도당 흡수를 증가시키지 않고 인슐린이 존재할 때만 그 물질을 첨가하지 않았을 때에 비해 포도당 흡수를 3~5배 이상 증가시키는 것이다.

Amberlite XAD-4 gel을 이용하여 나누어진 薏苡仁 분획 Fr. 1과 Fr. 3는 인슐린의 존재하지 않을 때는 인슐린의 작용을 증가시키지 않았고, 소량의 인슐린과

분리한 물질이 함께 존재할 때 분리한 물질을 첨가하지 않았을 때에 비해 3.5배 ($p < 0.001$) 포도당 흡수를 증가시켜 인슐린이 50 ng/ml가 존재할 때 만큼 포도당 흡수가 높았고, 분획하지 않은 薏苡仁 전탕액도 2.7 배 증가시켰다. 이 결과는 薏苡仁이 당뇨병의 치료 또는 예방을 위한 효능을 입증하는 것으로 인슐린 민감성 제재로서의 가능성을 시사하였다. 또한, Fr. 5와 Fr. 6은 오히려 인슐린 작용력을 현저히 감소시켰는데, 薏苡仁의 추출물이 전지방세포 3T3-L1에서 지방세포로 분화할 때 미치는 영향의 결과에서 분화유도물질을 첨가시 薏苡仁 추출물이 고농도에서 분화를 억제 하는 것을 뒷받침하는 결과라고 추측된다.

식물의 2차대사물에 항당뇨 생리활성 연구는 혈당이나 혈중 인슐린 농도 및 α -glucosidase 저해활성에 대한 연구가 대부분으로, 신체의 항상성 유지와 기능의 조절역할을 담당하는 Biological Response Modifier(BRM)로써 작용하고 세포들의 수용체의 기능을 조절함으로써 치료 효과를 내는 인슐린 저항성과 인슐린 분비능 및 작용력에 대한 객관적으로 측정하거나 혹은 물질 탐색과 관련된 연구는 거의 없는 실정이다. 근래, 동·식물에서 인슐린처럼 작용하는 물질인 인슐린성물질 (Insulin like substances)과 인슐린 민감성제제의 존재가 확인되고 있어 새로운 당뇨병 치료제의 선도 물질로서 이용 가능성을 시사하고 있다^{16,17)}.

본 연구 결과를 종합해보면, 薏苡仁은 利水滲濕藥類로서 인슐린성 물질을 함유하고 있으며, 추출물을 분획한 Fr. 1과 Fr. 3은 인슐린 저항성을 감소시키는 물질이 함유되어 있어 인슐린 sensitizer로 개발 가능성을 암시하고 있다. 이를 통하여 당뇨처방 및 민간처방의 당뇨 식이로서의 薏苡仁에 대한 새로운 의미를 부여할 수 있는 것이며, 탐색되어진 항당뇨의 생리활성 물질에 대한 분리·정제 및 구조결정의 연구가 급후 계속할 필요성이 있다고 사료된다.

결론

薏苡仁의 인슐린 작용력을 호전시킬 수 있는 인슐

린성 물질과 인슐린 민감성 약제로서의 가능성을 탐색하기 위해, 3T3-L1 지방세포 모델을 이용하여 3T3-L1 fibroblast가 3T3-L1 adipocytes로 분화할 때 미치는 영향과 세포내로의 포도당 흡수를 살펴본 바는 다음과 같다.

1. 薏苡仁을 熱水추출한 분말 엑시료를 3T3-L1 섬유아세포에 처리하여 분화정도를 관찰한 바, 분화유도물질(dexamethasone, 1-methyl-3-isobutylxanthine, 인슐린)이 첨가되지 않은 경우 1 μ g/ml에서는 변화가 없었으나 10 μ g/ml의 농도에서 $110.9 \pm 3.6\%$ ($p < 0.05$)로 유의성 있게 분화를 촉진시켰다. 분화유도물질을 첨가하였을 때, 1 μ g/ml와 10 μ g/ml에서 각각 $123.5 \pm 5.2\%$ ($p < 0.01$)와 $111.7 \pm 4.5\%$ ($p < 0.05$)로 분화를 촉진시켰다.

2. 薏苡仁 추출물이 3T3-L1 섬유아세포의 분화에 있어 고농도 100 μ g/ml와 1000 μ g/ml로 검액 시료를 조제하여 분화에 미치는 영향을 조사한 결과, 분화유도물질을 첨가하지 않은 경우에는 분화에 거의 일어나지 않았지만, 분화유도물질을 1000 μ g/ml로 첨가된 경우에는 $90.1 \pm 2.9\%$ 로 세포의 분화가 나타났다 ($p < 0.01$). 3T3-L1 섬유아세포가 세포분화와 함께 세포막의 인슐린 수용체가 증가되는 과정에서 유도물질 사이에 상호작용을 하여 고농도에서는 분화를 억제하고 있다고 추측되며 추후 더 연구 검토되어야 할 것이다.

3. 인슐린 농도 변화에 따른 세포내로의 포도당 흡수 반응에서 인슐린이 없는 기저 상태에 비해 인슐린이 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75 ng/ml로 증가하였을 때 포도당 흡수는 1.3, 2.4, 4.6, 8.2, 8.8 그리고 8.8 배로 증가하였다.

4. 薏苡仁 분획 Fr. 1과 Fr. 3는 인슐린의 존재하지 않을 때는 인슐린의 작용을 증가시키지 않았고, 인슐린과 분리한 물질이 함께 존재할 때는 인슐린만 존재할 때에 세포내로의 포도당 흡수가 3.5배 ($p < 0.001$) 증가하여 인슐린이 50 ng/ml가 존재할 때의 포도당 흡수량 만큼 높았다. 분획하지 않은 薏苡仁 전탕액이 존재할 경우에도 포도당 흡수량이 2.7

배 증가하였다. EtOH 80% (Fr. 5)와 100% (Fr. 6) 분획이 존재할 때는 오히려 인슐린 작용력을 현저히 감소시켜 세포내로의 포도당 흡수량이 감소하였다.

이상의 결과로 보아, 薏苡仁은 利水滲濕藥으로서 당뇨처방 및 당뇨 식이의 민간처방으로 효능을 입증할 수 있었으며, 이는 薏苡仁이 인슐린성 물질을 함유하고 있고 추출물을 분획한 Fr. 1과 Fr. 3은 인슐린 저항성을 감소시키는 물질이 함유되어 있어 인슐린성 물질과 인슐린 민감성 물질로 개발 가능성을 암시하고 있다.

참고 문헌

1. 의료보험 연합회. 1992년 의료보험 통계 연보. 1993.
2. 민현기. 한국인 당뇨병의 임상적 특성. 당뇨병. 1992; 16:163-170.
3. 임숙자, 김수연, 이주원. 한국산 야생식용식물이 당뇨 유발 흰쥐의 혈당 및 간과 근육의 에너지원 조성에 미치는 영향. 한국 영양학회지. 1995;28:585-594.
4. 임숙자, 최성숙. 하늘타리 재분획물이 streptozotocin 유발 당뇨 흰쥐의 인슐린 활성에 미치는 영향 및 급성 독성에 관한 연구. 한국 영양학회지. 1997;30:25-31.
5. 정성현, 김미선, 류강선. 고탄수화물 식이투여 마우스에서 누에 추출물이 소장내의 α -glucosidase 활성에 미치는 영향. 한국 잡사학회. 1997;39:86-92.
6. 전국한의과대학본초학교수공편. 本草學. 서울:永林社. 1998:306-308.
7. 신민교. 임상본초학개정증보판. 서울:영림사. 1997: 713-714.
8. 難波恒雄. 和漢藥百科圖鑑 全改訂新版. 大阪 保育社. 1993:154-156.
9. Krenisky JM, Luo J, Carney JR. Isolation and antihyperglycemic activity of bakuchiol from *Otholobium pubescens*(Fabaceae), a peruvian medicinal plant used for the treatment of diabetes. Biol. Pharm. Bull.. 1999;22(10):1137-1140.
10. Hong SJ, Fong JC, Hwang JH. Effect of crude drugs on glucose uptake in 3T3-L1 adipocyte. Gaxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi. 2000;16(9):445-451.
11. Kameda K, Chikaki M, Morimoto C, Jiang M, Okuda H.. Insulin like action of trans-10-hydroxy-2-decanoic acid and its related substance. J. Traditional Med. 1996;13:456-457.
12. Takaku T, Jiang M, Okuda H, Maeda N. Isolation of Insulin like substance from *Ephedra sinica* STAPF. J. Traditional Med. 1997;14:358-359.
13. Han L-K, Li J, Morimoto C, Takaku T, Okuda H. Effect of Jasmin Tea on obesemice. J. Traditional Med. 1997; 14:364-365.
14. Manchem VP, Goldfine ID, Kohanski RA, Cristobal CP, Lum RT, Schow SR, Shi S, Spevak WR, Laborde E, Toavs DK, Villar HO, Wick MM, Kozlowski MR. A nove small molecule that directly sensitizes the insulin receptor in vitro and in vivo. Diabetes. 2001;50(4): 824-3012.
15. Mukherjee R, Hoener PA, Jow L, Bilakovics J, Klausing K, Mais DE, Faulkner A, Croston GE, Paterniti JR Jr. A selective peroxisome proliferator-activated receptor- gamma (PPARgamma) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Mol. Endocrinol. 2000;14(9):1425-1433.
16. Gray AM, Flatt PR. Insulin-reasing and Insulin-like activity of the Traditionnal antidiabetic plant *Coriandrum sativum*(coriander) Br. J. Nutr. 1999;81(3):203-209.
17. Tafuri SR. Troglitazone enhances differentiation, basal glucose uptake, and GLUT1 protein levels in 3T3-L1 adipocytes. Endocrinology. 1996;137:4706.