

消渴 치료 處方 加減이 3T3-L1 Adipocytes에서 인슐린 유사성과 인슐린 민감성에 미치는 영향

박선민¹ · 최미경¹ · 전동화² · 최수봉² · 박성규³ · 이미영 · 김호경 · 황영희 · 고병섭*

한국한의학연구원, 1: 호서대학교 자연과학대학, 2: 건국대학교 의과대학, 3: 경희대학교 한의과대학

Insulin-like and Insulin Sensitizing Effects of Modified Anti-diabetic Remedies in 3T3-L1 Fibroblasts

Sun Min Park¹, Mi Kyung Choi¹, Dong Wha Jun², Soo Bong Choi², Seong Kyu Park³,
Mi Young Lee, Ho Kyoung Kim, Young Hee Hwang, Byoung-Seob Ko*

*Korea Institute of Oriental Medicine, 1: Food and Nutrition, Hoseo University,
2: School of Medicine, Konkuk University, 3: College of Oriental Medicine, Kyunghee University*

Based on the data from our previous studies, four new diabetic remedies were composed with the addition of Coicis Semen into Okchun-san (OCH), Commelinae Herba into Gangsim-tang (GST), Scrophulariae Radix into Sunki-san (SKS), and Erythrinae Cortex into Yukmijihuang-hwan (YMG). The water extracts of these new remedies were treated in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes in order to investigate insulin-like substances and insulin sensitizers, respectively. With and without differentiation inducers, unmodified SKS (SKS-O) treatment induced 3T3-L1 fibroblasts into adipocytes more than the control. However, without inducers, YMG treatment, but not SKS, induced the differentiation more than the control among modified remedies. Without inducers, SKS, OCH as well as YMG increased the induction of differentiation from 3T3-L1 fibroblasts into adipocytes, compared to the control. The treatment of OCH and YMG with 1ng/mL insulin increased glucose uptake much more than only insulin 1 ng/mL treatment. Thus, OCH and YMG contained increased insulin actions. In conclusions, the modified remedies, OCH and YMG, contained insulin-like substances and insulin sensitizers, and they can be improved the hypoglycemic effects.

Key words : 3T3-L1 fibroblasts, insulin-like, insulin sensitizers, hypoglycemic effects

서 론

우리나라의 당뇨병 유병률은 과거 20년 동안 급격히 증가하여 최근의 연구보고에 따르면 전체 인구의 약 8-10%이며, 향후 20년 동안 더욱 급증할 것으로 알려지고 있다. 이 현상은 우리나라 뿐 아니라 동남 아시아 국가에서 나타나는 현상으로 그 이유는 이 나라들은 과거에 영양 섭취가 부족하여 "thrifty gene"이 유발되었을 가능성이 높고, 이 유전자는 과다 영양 상태가 되면 당뇨병을 유발시킬 가능성이 높은 것으로 알려지고 있다¹⁾. 그러므로 당뇨병을 근본적으로 치료하여 혈당을 정상화시킬 수 있는

치료 약재의 개발은 매우 필요한 것으로 사료된다.

당뇨병의 발병 기전에 대해서 아직까지 확실하게 밝혀진 바는 없으나 인슐린 작용력의 감소로 인한 인슐린 저항성과 인슐린 부족에 의한 것이라고 알려지고 있다. 인슐린 작용의 감소는 인슐린의 작용 조직인 근육이나 지방 조직에서 인슐린이 세포막의 인슐린 수용체와 결합한 후 세포내의 신호 전달체계 활성화의 장애와 관련이 있다는 보고되고 있다. 이러한 인슐린 저항성의 증가는 혈당을 증가시키고, 췌장의 베타세포에서 인슐린 저항성을 극복하기 위해서 인슐린의 분비가 증가한다. 인슐린 분비가 인슐린 저항성을 극복할 수 있을 정도로 높으면, 비만처럼 인슐린 저항성이 있더라도 정상혈당을 유지하고 포도당 불내성증이나 당뇨병을 나타내지 않는다. 그러나 인슐린 분비가 인슐린 저항성을 극복하지 못하면 혈당이 정상 이상으로 높아지고 포도당

* 교신저자 : 고병섭, 대전시 유성구 전민동 461-24, 한국한의학연구원

· E-mail : bsko@kiom.re.kr, Tel : 042-868-9411

· 접수 : 2004/01/26 · 수정 : 2004/03/08 · 채택 : 2004/03/29

불내성을 거쳐 당뇨병으로 진전된다. 그러므로 당뇨병의 발병을 예방하고 병세의 진전을 지연시키기 위해서는 인슐린 저항성을 감소시키면서 인슐린 분비능을 향상시키는 것이 필요하겠다. 인슐린성 물질은 인슐린처럼 작용하는 물질로 분비되는 인슐린이 부족하더라도 혈당을 저하시키는 효과가 있는 물질이다. Takaku 등³⁾은 마황에서 norpseudoephedrine을 분리하여 인슐린성 물질을 확인하였고, Kameda 등⁴⁾도 royal jelly에 함유하고 있는 불포화지방산 trans -10-hydroxy-2-decanoic acid가 인슐린성 물질임을 확인하여 royal jelly가 당뇨병 예방 및 치료에 효과가 있음을 보고하였다. 인슐린 민감성 약은 일본의 약초에서 분리한 thiazolidinedione 계통의 물질로 1999년도에 미국 식약청에서 허가를 받아 현재 rosiglitazone, pioglitazone 등의 약이 판매되고 있다⁵⁾.

한의학에서 消渴의 병증은 上消證은 渴而多飲, 中消證은 消穀善飢 및 下消證은 渴而尿數 등의 증상을 특징으로 하며, 당뇨병 치료의 목표인 고혈당으로 인한 渴症, 體重減少, 多尿 등의 증상과 유사한 점을 발견할 수 있다⁶⁾. 한의학에서 消渴의 치료 처방으로 降心湯은 상소증에 順氣散은 중소증에 六味地黃丸은 하소증 및 玉泉散은 소갈의 通治 처방으로 기록되어 있다⁶⁾. 당뇨에 사용되는 동의보감 처방에 본 연구자들은 기존 연구에서 인슐린성 물질과 인슐린 민감성 물질의 탐색을 통하여 보고된 薏苡仁⁷⁾, 鴨跖草, 玄參, 海桐皮⁸⁾ 등 한약을 기존의 소갈 처방에 가미하여 새로운 한약 처방을 구성하였다.

본 연구에서는 기존의 한약 처방과 가미된 한약 처방이 인슐린성 작용과 인슐린 민감성 작용이 있는 지 여부를 3T3-L1 섬유아세포와 지방세포에서 비교 조사하였다.

재료 및 방법

1. 약재

본 실험에서 사용된 약재는 서울 경동시장에서 구입한 후 한국한의학연구원에서 엄격하게 감별하고 선정한 것을 사용하였고, 일련 번호를 붙이고 한국한의학연구원 표본실에 보관하고 있다.

2. 시료의 조제

당뇨병의 소갈 처방으로 사용하는 원처방인 옥천산(OCH-O), 감심탕(GST-O), 순기산(SKS-O) 그리고 육미지황환(YMG-O)의 처방들과 본 연구자들의 과거 연구에서 효과가 있는 것으로 평가된 약재를 첨가하여 변형시킨 의이인가미 옥천산(OCH), 압척초가미 감심탕(GST), 현삼가미 순기산(SKS), 해동피가미 육미지황환(YMG)의 가미 처방을 만들었다. 가미 처방의 구성 약물은 Table 1에 주었다. 이들 약재를 각각 정확하게 중량을 측정한 뒤 환류추출기에 1차 증류수 4,000ml와 함께 넣은 뒤 100℃ 가까이 온도가 상승하여 탱액이 끓는 시점으로부터 2시간 동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻은 후, 동결건조기를 이용하여 건조하였다(Table 1).

Table 1. The Composition of Herb Extracts

OCH-O		OCS		GST-O		GST	
Pharmaceutical name	Dose (%)	Pharmaceutical name	Dose (g)	Pharmaceutical name	Dose (%)	Pharmaceutical name	Dose (%)
Trichosanthis Radix	12.5	Trichosanthis Radix	12.5	Trichosanthis Radix	20.0	Trichosanthis Radix	10.0
Puerariae Radix	6.25	Puerariae Radix	6.25	Ginseng Radix	10.0	Ginseng Radix	5.0
Rehmanniae Radix	6.25	Rehmanniae Radix	6.25	Polygalae Radix	10.0	Polygalae Radix	5.0
Schizandrae Fructus	6.25	Schizandrae Fructus	6.25	Angelicae Gignatis Radix	10.0	Angelicae Gignatis Radix	5.0
Glycyrrhizae Radix	6.25	Glycyrrhizae Radix	6.25	Rehmanniae Radix Preparat	10.0	Rehmanniae Radix Preparat	5.0
Oryzae Semen	62.5	Coicis Semen	62.5	Poria	10.0	Poria	5.0
				Astragali Radix	10.0	Astragali Radix	5.0
				Schizandrae Fructus	10.0	Schizandrae Fructus	5.0
				Glycyrrhizae Radix	10.0	Glycyrrhizae Radix	5.0
						Commelinae Herba	50.0
HSK-O		SKS		YMH-O		YMG	
Pharmaceutical name	Dose (%)	Pharmaceutical name	Dose (%)	Pharmaceutical name	Dose (%)	Pharmaceutical name	Dose (%)
Magnoliae Cortex	45.4	Magnoliae Cortex	31.3	Rehmanniae Radix Preparat	18.3	Rehmanniae Radix Preparat	16.0
Rhei Radix et Rhizoma	36.4	Rhei Radix et Rhizoma	25.0	Dioscoreae Rhizoma	9.1	Dioscoreae Rhizoma	8.0
Aurantii Immaturus Fructus	18.2	Aurantii Immaturus Fructus	12.5	Corni Fructus	9.1	Corni Fructus	8.0
		Scrophulariae Radix	31.3	Schizandrae Fructus	9.1	Schizandrae Fructus	8.0
				Poria	6.8	Poria	6.0
				Alismatis Rhizoma	6.8	Alismatis Rhizoma	6.0
				Moutan Cortex	6.8	Moutan Cortex	6.0
				Puerariae Radix	6.8	Puerariae Radix	6.0
				Liriodis Tuber	6.8	Liriodis Tuber	6.0
				Mori Fructus	6.8	Mori Fructus	6.0
				Astragali Radix	6.8	Astragali Radix	6.0
				Bombyx Batryticatus	6.8	Bombyx Batryticatus	6.0
						Erythrinae Cortex	12.0

OCH-O: original remedy of Okchun-san, OCH: Okchun-san added with Coicis Semen, GST-O: original remedy of Gangsim-tang, GST: Gangsim-tang added with Commelinae Herba, SKS-O: original remedy of Hyunsamsunki-san, SKS: Hyunsamsunki-san added with Scrophulariae Radix, YMG-O: original remedy of Yukmijihuang-hwan, YMG: Yukmijihuang-hwan added with Erythrinae Cortex

3. 세포 배양

실험에 사용한 3T3-L1 세포는 미국세포주은행에서 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 flask 당 1 ml의 0.25 % trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37 °C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대배양하였다. 탈착된 세포는 10 % FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기 (50 ml culture flask)에 옮겨 1 : 20의 split ratio로 CO₂ 배양기 (37 °C, 5 % CO₂)에서 배양하였다.

4. 인슐린성 물질 탐색 실험

혈구계산기(Haemacytometer)로 계산된 5×10³ cells/ml의 세포를 24 well plate의 각 well에 넣고 PBS로 세척한 후 1% bovine serum albumin을 함유하고 있는 DMEM 배지에서 2일 동안 배양한 후, 새로운 DMEM배지로 갈아주고 열수로 추출한 한약처방인 OCH, YMG, SKS, GST 시료를 각각 1, 10, 100 또는 250 µg/ml 를 첨가하여 7 일간 배양하였다. 그리고 인슐린과의 관계를 알아보기 위해, 분화유도물질인 dexamethasone 0.25 µM (DEX, Aldrich), 1-methyl-3-isobutylxanthine 0.5 mM (MIX, Aldrich), insulin (10 µg/ml, Sigma)과 함께 원방인 OCH-O, YMG-O, SKS-O, GST-O와 가미 처방인 OCH, YMG, SKS, GST의 추출물을 각각 1, 10, 100, 또는 250 µg/ml를 첨가하여 7일간 배양하였다. 대조군은 분화유도물질만이 함유된 DMEM 배지를 사용하였다. 분화정도의 측정은 Oil-Red-O로 염색하여 측정하였는데⁹⁾, 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 iso-propyl alcohol 100 µl씩 분주하여 1시간 동안 용출시켜 ELISA reader로 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 지방세포내로의 포도당 섭취 실험

3T3-L1 섬유아세포를 계대배양과 동일한 방법으로 완전히 채워질 때까지 배양하였다. 배양용기 바닥을 완전히 채운 지 2 일 후에 유도 분화 물질을 넣어 3일 동안 배양한 후 2일에 한번씩 DMEM을 새로 바꾸어 주어 지방세포로 완전히 전환된 10-15일 사이에 포도당 섭취 실험을 하였다. 배양용기에 있는 지방세포의 수를 세어 12 well plate의 well을 빈 공간없이 완전히 채울 수 있도록 분주하였다. Well plate에 옮긴 지방세포를 PBS로 세척한 후 1% bovine serum albumin을 함유하고 있는 저농도의 포도당을 함유한 DMEM에서 12시간 이상 지난 후 HEPES 용액에서 37 °C에서 한약 추출물을 첨가하여 30 분 동안 배양하였다.

그 후 1 µCi/ml of [¹⁴C]2-deoxyglucose 와 1 mM 포도당을 첨가하고 22°C에서 30분 동안 배양하여 포도당의 세포내로의 섭취 정도를 ¹⁴C이 세포내로 이동한 양으로 측정하였다. 비특이적인 포도당 섭취를 배제하기 위해서 glucose transporter 4

(GLUT4)의 작용을 억제하는 cyto B와 함께 배양하였을 때의 포도당 이동량을 빼고 세포내로 이동한 포도당의 양을 측정하였다. 세포는 10mM 포도당 함유한 PBS으로 세척하고 0.5 N NaOH로 세포를 분해하였다. 분해된 세포를 초산으로 중화시키고 함유된 ¹⁴C의 함량을 베타 counter (Tri-Carb 2100TR, Packard Bioscience, IL)로 측정하였다¹⁰⁾.

6. 한약 처방이 포도당 섭취에 미치는 영향 실험

OCH, YMG, SKS, GST 등의 가미 처방을 DMSO에 녹인 후 이것을 PBS에 0.3와 3µg/ml로 희석시켜 두가지 농도에서 포도당 섭취를 측정하였다. OCH, YMG, SKS, GST 한약 처방에 인슐린 민감성제제가 함유되어 있는지의 여부를 조사하기 위해서 3T3-L1 지방세포에 인슐린 1 ng/ml과 함께 각 추출물을 0.1 µg/ml와 1µg/ml 넣고 1시간 동안 배양한 후에 포도당 섭취 정도를 측정하였다. 대조군으로 인슐린 0 ng/ml (basal), 1 ng/ml, 인슐린 50 ng/ml을 사용하였다. 각 추출물의 결과는 추출물을 첨가하지 않고 인슐린을 1 ng/ml 첨가한 것과 인슐린 50ng/ml 첨가한 것에서의 결과와 비교하였다.

모든 실험은 3회 반복하였고, 분리한 물질이 인슐린의 작용에 관계없이 detergent로 작용하여 세포막을 파괴시켜 포도당 섭취를 증가시키는 것을 배제하기 위해서 인슐린이 0 ng/ml 에서 분리한 물질과 함께 포도당 섭취를 측정하였을 때 이 값이 기저 (basal) 값보다 높은 것은 포도당 섭취를 증가시킨다고 해도 인슐린 민감성 제제로서의 작용이 없는 간주하였다.

7. 통계 처리

각각의 한약처방에서 처리한 양에 따라 대조군과 비교하여 two sampled t-test로 통계적 유의성을 검증하였다. 모든 통계 처리의 유의성 검증은 p<0.05로 정하였다.

연구 결과

1. 인슐린성 물질 탐색

3T3-L1 섬유아세포가 용기에 완전히 채워졌을 때 분화유도 물질을 첨가하지 않고 원방인 OCH-O, YMG-O, SKS-O, GST-O 및 가미 처방인 OCH, YMG, SKS, GST를 첨가하고 7 일 후에 약물 대신 DMSO를 첨가한 대조군과 비교하였다. 원방 중에서는 250 µg/ml 처리하였을 때 SKS-O가 대조군에 비해 3T3-L1 섬유아세포를 지방세포로 유의하게 분화시켰다. 즉, SKS-O에는 인슐린처럼 작용하는 물질이 있는 것으로 사료되었다 (Table 2).

원방에 가미를 한 경우에는 SKS는 3T3-L1 섬유아세포의 분화를 촉진시키지 않았고, 250 µg/ml YMG를 처리하였을 때만 지방세포로의 분화를 촉진시켰다. 원방인 YMG-O도 3T3-L1 섬유아세포의 분화를 촉진시키기는 하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 한편, GST는 10 µg/ml 이상을 처리하였을 때 대조군에 비해 지방세포로의 분화를 오히려 억제시켰다.

Table 2. The Effect of Oriental Medicine on the Adipocyte Differentiation from 3T3-L1 Fibroblasts without Differentiation Inducers

Conc. Group	Control	1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	250 μ g/ml
OCH-O	100.00±4.69	89.00±2.64	84.44±6.75	96.89±2.05	104.36±8.51
OCH	100.00±6.93	128.05±3.45*	92.07±14.66	84.45±9.05	81.10±6.34
GST-O	100.00±8.72	99.26±6.29	110.37±5.24	109.88±4.54	122.72±7.33
GST	100.00±4.61	105.45±0.64	80.45±2.57*	82.50±4.18*	71.14±4.18*
SKS-O	100.00±1.24	118.42±8.68	119.29±8.68	120.61±16.74	141.23±10.78*
SKS	100.00±9.09	95.91±8.27	85.96±0.83	81.87±4.96	83.04±1.65
YMG-O	100.00±8.17	111.17±14.61	97.39±6.64	118.06±13.73	122.76±9.74
YMG	100.00±8.88	112.08±2.73	109.18±1.37	120.77±6.83	128.02±2.05*

The confluent 3T3-L1 fibroblast were incubated with DMEM/FBS medium contained extracts without differentiation inducers for 7 days, and the differentiation was measured. a) Each value represents mean \pm standard error of determinations, respectively. Significantly different from control group(*: p<0.05, **: p<0.01). OCH-O: original remedy of Okchun-san. OCH: Okchun-san added with Coicis Semen. GST-O: original remedy of Gangsim-tang. GST: Gangsim-tang added with Commelinae Herba. SKS-O: original remedy of Hyunsamsunki-san. SKS: Hyunsamsunki-san added with Scrophulariae Radix. YMG-O: original remedy of Yukmijhuang-hwan. YMG: Yukmijhuang-hwan added with Erythrinae Cortex

3T3-L1 섬유아세포에 분화 유도 물질과 함께 원방과 가미 처방을 처리한 것과 약물 없이 분화 유도물질만 처리한 대조군을 비교하여 처방에서 추출한 약물이 분화 유도 물질의 효과를 상승시키는 지를 조사하였다 (Table 3). 이때 원방의 경우는 분화 유도물질없이 약물만 처리했던 경우와 마찬가지로 SKS-O만이 대조군에 비해 지방세포로의 분화를 촉진시켰다. 그러나 가미 처방의 경우는 250 μ g/ml 농도의 SKS 뿐만 아니라 YMG와 OCH 모두 대조군에 비해 3T3-L1 섬유아세포에서 지방세포로의 분화를 촉진시켰다. 또한 OCH는 100 μ g/ml의 농도로 처리했을 때도 분화유도 물질의 효과를 상승시켜 지방 세포로의 분화를 촉진시켰다. 그러므로 OCH는 인슐린이 존재하는 경우에만 인슐린성 물질로 작용한다는 것을 알 수 있었다.

Table 3. The Effect of Oriental Medicine on the Adipocyte Differentiation from 3T3-L1 Fibroblasts with Differentiation Inducers

Conc. Group	Control	1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	250 μ g/ml
OCH-O	100.00±0.91	86.94±3.63	85.87±11.20	88.87±5.15	105.35±12.11
OCH	100.00±3.45	109.48±2.28	105.72±6.07	115.12±2.66*	123.17±9.49*
GST-O	100.00±8.60	110.84±7.60	100.85±4.34	99.06±1.81	98.46±2.07
GST	100.00±5.71	90.13±11.42	83.63±0.95	76.68±9.51	85.50±2.21*
SKS-O	100.00±9.47	109.15±4.51	108.51±9.03	94.15±12.19	126.17±7.72*
SKS	100.00±4.75	103.02±2.37	112.08±4.75	110.40±9.96	129.53±0.95*
YMG-O	100.00±4.78	96.36±7.02	97.95±3.75	93.38±9.37	110.60±16.79
YMG	100.00±4.23	99.67±7.52	112.62±3.29	114.62±7.05	130.56±7.99*

The confluent 3T3-L1 fibroblast were incubated with DMEM/FBS medium contained extracts with differentiation inducers (dexamethasone, 1-methyl-3-isobutylxanthine and insulin) for 7 days, and the differentiation was measured. a) Each value represents mean \pm standard error of determinations, respectively. Significantly different from control group(*: p<0.05, **: p<0.01). OCH-O: original remedy of Okchun-san. OCH: Okchun-san added with Coicis Semen. GST-O: original remedy of Gangsim-tang. GST: Gangsim-tang added with Commelinae Herba. SKS-O: original remedy of Hyunsamsunki-san. SKS: Hyunsamsunki-san added with Scrophulariae Radix. YMG-O: original remedy of Yukmijhuang-hwan. YMG: Yukmijhuang-hwan added with Erythrinae Cortex

2. 처리한 인슐린 양이 포도당 섭취량에 미치는 영향

3T3-L1 지방세포에 인슐린 0, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75 ng/ml을 처리한 후 포도당 섭취 정도를 측정하였을 때 인슐린 농도가 25 ng/ml까지는 인슐린 농도가 증가함에 따라 포도당 섭취가 증가하였고, 25 ng/ml보다 높은 인슐린 농도에서는 세포내로의 포도당 섭취가 인슐린 농도에 따른 차이가 없었다 (Fig. 1).

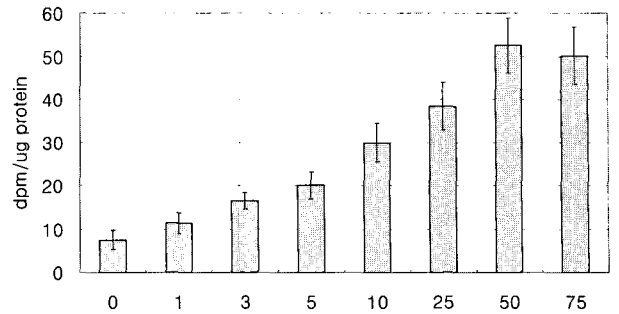


Fig. 1. Glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes upon insulin dosage

3. 한약 처방이 포도당 섭취량에 미치는 영향

가미 처방인 OCH, YMG, SKS와 GST의 열수 한약 추출물을 3T3-L1 지방세포에서 포도당 흡수를 측정하였다. OCH와 YMG 추출물은 인슐린을 1 ng/ml와 함께 처리하였을 때 1 ng/ml 인슐린만을 첨가하였을 때에 비해 통계적으로 유의하게 포도당 흡수를 높였다 (Fig. 2). 특히 OCH는 용량 의존적으로 포도당 흡수량이 증가하여, 인슐린 1 ng/ml만을 처리하였을 때에 비해 OCH 추출물 0.3 μ g/ml과 1 ng/ml 인슐린을 첨가하였을 때도 증가하였고, 3 μ g/ml OCH 추출물과 1ng/ml 인슐린을 첨가하였을 때는 더 많이 증가하여 인슐린만을 50ng/ml를 첨가하였을 때 만큼 포도당 흡수가 높았다. 또한 YMG처방은 3 μ g/ml YMG 추출물을 1 ng/ml 인슐린과 함께 처리하였을 때만 인슐린 1 ng/ml만을 처리한 것에 비해 포도당 흡수가 높았고 이것은 인슐린을 50 ng/ml 처리한 것이 비해서는 낮았다 (P<0.01). 즉, OCH와 YMG 추출물에는 인슐린작용을 향상시키는 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있다는 것을 알 수 있었다.

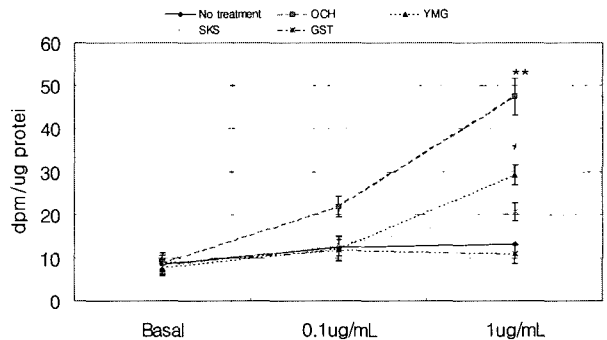


Fig. 2. Glucose uptake with 1 ng/mL insulin and extracts from OCH, YMG, SKS, and GST in 3T3-L1 adipocytes. In basal state, neither of insulin nor extracts were treated in all groups. * Significantly different from no treatment group in 0.1 μ g/ml or 1 μ g/ml treatment group at α =0.01, ** at α =0.001. OCH: Okchun-san added with Coicis Semen. GST: Gangsim-tang added with Commelinae Herba. SKS: Hyunsamsunki-san added with Scrophulariae Radix. YMG: Yukmijhuang-hwan added with Erythrinae Cortex

고찰

3T3-L1 섬유아세포는 분화유도 물질을 처리하면 지방세포로 분화되고 이때 인슐린 수용체 (receptor) 수가 35배정도 급격히 증가하여 인슐린에 민감한 세포로 전환되므로 포도당 흡수 및 전반적인 대사에 관한 연구를 하는데 이용하기에 적절하다. 3T3-L1 섬유아세포는 분화 유도물질을 처리하면 지방세포로 분

화되며 분화 유도 물질의 하나가 인슐린으로, 인슐린이 없이는 지방세포로 분화되지 않는다. 그러므로 인슐린성 물질을 탐색할 때 약물을 투여하였을 때 유도분화물질 없이 지방세포로 분화된다면 투여한 물질은 인슐린으로 작용한다는 것을 알 수 있다. 또한 유도 분화 물질과 함께 약물을 투여하였을 때도 약물을 처리하지 않은 것에 비해 지방세포로의 분화가 증가한다면 그 약물은 인슐린성 물질로 간주 할 수 있다. 그러므로 3T3-L1 섬유아세포 또는 인슐린성 물질을 탐색하는데 좋은 모델이다^{4,11)}. 또한 분화된 3T3-L1 지방세포는 *in vivo*에 존재하는 대사성 피이드백 루프와 같은 복잡한 대사와 연루되어 있지 않은 지방세포로 인슐린 수용체와 glucose transporter4 (GLUT4)를 세포막에 가지고 있으므로 인슐린 작용력을 향상시키는 인슐린 민감성 물질을 탐색하기에 좋은 모델이기도 하다. 3T3-L1 지방세포는 인슐린이 인슐린 수용체와 결합하여 신호전달과정을 통해 포도당의 흡수를 조절하므로 인슐린의 작용력을 향상시키는 물질을 탐색하고 인슐린 신호전달체계를 연구하는데 많이 이용하고 있다. Takahashi 등은 3T3-L1 지방세포와 HepG2 간세포에서 식물에서 분리한 isoprenol이 당뇨병과 관련된 고지혈증을 호전시키는 효과가 있다는 것을 보고하였다. Kamei 등은 식물에서부터 분리한 chalcone의 유도체인 2'-benzyloxychalcone 이 3T3-L1 지방세포에서 phosphatidylinositol 3-kinase의 활성을 향상시켜 포도당의 흡수를 증가시켰다고 보고하였다¹²⁾. Manchem 등¹³⁾의 연구에 따르면 3T3-L1 지방세포를 3.2 μ M 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 등¹⁴⁾에 따르면 rosiglitazone과 같은 proxisome proliferation activated receptor (PPAR)-r agonists는 3T3-L1 섬유아세포를 지방세포로의 분화를 증가시키지는 않지만 지방세포내로의 포도당 흡수는 증가시켰다. 동·식물에서 생산하는 이차대사물이 체내에서 인슐린 민감성 제제로 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 증가시키기 때문이다.

降心湯은 특히 스트레스로 인한 心火上炎이 원인이 되어 발생하는 煩渴引飲과 氣血日消의 증상을 치료하는 처방으로, 상소증의 口渴과 多飲 증상의 치료에 사용된다. 順氣散은 식욕이 왕성하며 소변이 황적색인 중소증을 치료하는 처방으로서, 당뇨병의 체중감소와 유사한 증후인 중소증의 消穀善飢 증상의 치료에 적합하다. 六味地黃丸은 腎虛로 인한 소갈증인 腎消의 腿膝枯細 증상을 치료하는 대표 처방이며, 하소증은 구갈과 尿數이 특징 증상으로 당뇨병의 多尿와 유사한 증후이다. 玉泉散은 소갈의 聖藥으로 알려져 있으며, 의이인가미 옥천산은 소갈증의 통용 처방인 玉泉散의 구성 약물에서 糯米를 대용하여 健脾滲濕의 효능이 있는 薏苡仁을 가미하여 구성된 처방이다. 薏苡仁은 利水滲濕藥으로서 식이 요법으로 당뇨 처방 및 당뇨 식이로 사용되어 왔으며 본 연구자들이 보고한 결과에서도 의이인 추출물은 인슐린성

물질을 함유하고 있으며, 의이인 추출물을 에탄올로 분획하였을 때 물층과 에탄올 40% 분획층에 인슐린 작용력을 증가시키는 물질이 함유되어 있었다⁷⁾. 또한 엄나무 수피인 海桐皮的 경우도 인슐린성 물질을 함유하고 있고, 메탄올 10%와 30% 분획층에 인슐린 작용력을 향상시키는 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있다는 것을 보고하였다⁸⁾. 본 연구에서 의이인, 해동피, 현삼 및 압적초를 소갈 처방인 降心湯, 順氣散, 六味地黃丸 및 玉泉散에 첨가하여 원방을 변형시킨 처방을 만들어 인슐린성 물질과 인슐린 민감성 물질로 작용하는 지 여부를 조사하였다.

원방과 가미 처방 사이의 인슐린성 물질로 작용하는 지를 조사하였을 때 원방에서는 순기산만이 분화 유도 물질없이 3T3-L1 섬유아세포를 분화를 증가시켰고, 현삼을 가미한 순기산은 오히려 인슐린성 물질로서의 기능이 소실되었다. 해동피가미 육미지황환은 원방에 비해 분화 유도 물질없이 3T3-L1 섬유아세포를 분화를 효과적으로 증가시켰다.

한편 분화유도 물질과 함께 처방을 처리하였을 때도 원방에서는 순기산만이 인슐린성 물질로 작용하였다. 그러나 원방을 변형한 경우에는 해동피가미 육미지황환, 의이인가미 옥천산, 현삼가미 순기산이 모두 분화 유도물질과 함께 처리하였을 때 인슐린성 물질로 작용하였다. 특히 의이인가미 옥천산은 낮은 농도에서도 분화를 촉진시켜 가장 효과적인 것을 알 수 있었다.

또한 인슐린 민감성의 조사 결과는 의이인가미 옥천산이 인슐린 작용을 가장 많이 증가시켰고, 해동피가미 육미지황환이 두 번째로 인슐린 작용을 증가시켰다. 나머지 두 처방은 인슐린 작용력을 대조군에 비해 현저하게 증가시키지 못하였다. 의이인과 해동피는 본 연구자들의 과거에 연구에서 이미 인슐린성 물질과 인슐린 작용력을 증가시키는 인슐린 민감성 물질을 함유하고 있음을 밝힌 바 있으며, 원방에 그들을 가미하였을 때도 그 효과가 변함없이 크다는 것을 알 수 있었다.

결 론

소갈 처방으로 사용되는 옥천산 (OCH-O), 강심탕 (GST-O), 순기산 (SKS-O), 육미지황환 (YMG-O)의 원방을 본 연구자들의 과거 연구에서 효과가 있는 것으로 평가된 약재를 첨가하여 의이인가미 옥천산 (OCH), 압적초가미 강심탕 (GST), 현삼가미 순기산 (SKS), 해동피가미 육미지황탕 (YMG)의 새로운 가미 처방을 만들었다. 본 연구에서는 이러한 원방과 새로운 한약 처방이 인슐린성 작용과 인슐린 민감성 작용이 있는 지 여부를 3T3-L1 섬유아세포와 지방세포에서 조사하였다.

분화 유도물질을 첨가하지 않고 처방만을 처리하였을 때, 원방중에서는 순기산을 250 μ g/ml 처리한 것에서 대조군에 비해 3T3-L1 섬유아세포를 지방세포로 유의하게 분화시켰으며, 가미 처방중에서는 250 μ g/ml의 해동피가미 육미지황탕을 처리하였을 때 3T3-L1 섬유아세포가 지방세포로의 분화를 촉진시켰다. 분화유도 물질과 함께 처방을 처리하였을 때, 원방중에서는 순기산을 첨가하였을 때 대조군에 비해 지방세포로의 분화를 촉진시켰으며, 가미처방중에서는 의이인가미옥천산, 현삼가미순기산, 해

동피가미 육미지황탕이 대조군에 비해 3T3L-1 섬유아세포를 지방세포로의 분화를 촉진시켰다. 한약 처방과 1 ng/ml 인슐린을 함께 3T3-L1 지방세포에 처리하였을 때 의이인가미육천산, 해동피가미육미지황환 추출물은 1 ng/ml 인슐린만을 첨가하였을 때에 비해 통계적으로 유의하게 포도당 흡수를 높였다.

따라서 의이인가미 육천산, 해동피가미 육미지황환의 두가지 처방에는 인슐린작용을 향상시키는 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (02-PJ9-PG1-CO02-0002)

참고문헌

1. Yajnik CS. Nutrition, growth, and body size in relation to insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 3(2):108-114, 2003.
2. Gerich JE. Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin. Proc.* 78(4):447-456, 2003.
3. Takaku T, Jiang M, Okuda H, Maeda N. Isolation of Insulin like substance from Ephedra sinica STAPF. *J. Traditional Med.* 14:358-359, 1997.
4. 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.* 13: 456-457, 1996.
5. Mudaliar S, Chang AR, Henry RR. Thiazolidinediones, peripheral edema, and type 2 diabetes: incidence, pathophysiology, and clinical implications. *Endocr. Pract.* 9(5):406-416, 2003.
6. 許浚. 東醫寶鑑. 南山堂. 서울. p.98, 140-142, 1990.
7. 김종육, 최용휴, 주영승, 박선민, 이미영, 김호경, 김홍준, 고병섭. 의이인가미 3T3-L1 Adipocytes에서 인슐린성 작용과 인슐린 민감성에 미치는 영향, *대한한의학회지*, 23(1):83-91, 2002.
8. 고병섭, 김호경, 박선민. 엄나무 추출물이 3T3-L1 지방세포에서 인슐린 민감성과 인슐린 유사성 작용에 미치는 영향, *한국농화학회지*, 45:42-46, 2002.
9. Gray AM, Flatt PR. Insulin-reasing and Insulin-like activity of the Traditional antidiabetic plant Coriandurm sativum (coriander). *Br. J. Nutr.* 81(3):203-209, 1999.
10. Kamei R, Kadokura M, Kitagawa Y, Hazeki O, Oikawa S. 2'-benzyloxychalcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci.* 73:2091-2099, 2003.
11. Tafuri SR. Troglitazone enhances differentiation, basal glucose uptake, and GLUT1 protein levels in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology.* 137:4706-4711, 1996.
12. Takahashi N, Kawada T, Goto T, Yamamoto T, Taimatsu A, Matsui N, Saito M, Hosokawa M, Fushiki T. Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. *FEBS Letters.* 514:315-322, 2002.
13. 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 novel small molecule that directly sensitizes the insulin receptor in vitro and in vivo. *Diabetes.* 50(4):824-830, 2001.
14. Mukherjee R, Hoener PA, Jow L, Bilakovics J, Klausung K, Mais DE, Faulkner A, Croston GE, Paterniti JR Jr. A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 14(9):1425-1433, 2000.
15. Takaku T, Jiang M, Okuda H, Maeda N. Isolation of Insulin like substance from Ephedra sinica STAPF. *J. Traditional Med.* 14:358-359, 1997.