

## 3T3-L1 지방세포에서 황백 추출물의 Glucose Uptake 촉진 및 인슐린 저항성 개선 활성

김소희<sup>1</sup> · 신은정<sup>1</sup> · 현창기<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>한동대학교 대학원 생명과학과, <sup>2</sup>한동대학교 생명식품과학부

## Enhancing Effects of Extracts of *Phellodendri Cortex* on Glucose Uptake in Normal and Insulin-resistant 3T3-L1 Adipocytes

So Hui Kim<sup>1</sup>, Eun-Jung Shin<sup>1</sup>, and Chang-Kee Hyun<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Graduate School, Handong Global University, and

<sup>2</sup>School of Life and Food Sciences, Handong Global University, Pohang, Kyungbuk 791-708, Korea

**Abstract** – Anti-hyperglycemic effects of 17 medicinal plants that have been used for ameliorating diabetes in oriental medicine were evaluated using glucose transport assay in 3T3-L1 adipocytes. Higher activities were obtained by treating water or alcohol extract of *Phellodendri Cortex* (PC), which showed enhancing effects both on basal and insulin-stimulated glucose uptake. The latter effect of PC was completely inhibited by wortmannin, a specific inhibitor for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), but not affected by SB203580, a specific inhibitor for p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). Genistein, an inhibitor for tyrosine kinases, abolished the PC effects completely. Treatment of vanadate, an inhibitor for tyrosine phosphatases, together with PC showed no significant synergic enhancement in glucose uptake. The results of inhibitors associated with insulin signaling pathway indicated that extracts of PC enhance glucose uptake by PI 3-kinase activation which is an upstream event for GLUT4 translocation. Antidiabetic effects of PC extract might be also due to enhanced tyrosine phosphorylation and reduced tyrosine dephosphorylation. In addition, PC accelerated insulin-stimulated glucose uptake in insulin-resistant cells, recovering the uptake level close to that of normal cells. These findings may offer a new way to utilize extracts of PC as novel anti-hyperglycemic agents.

**Key words** – *Phellodendri Cortex*, anti-hyperglycemic effect, glucose uptake, insulin resistance, 3T3-L1 adipocytes

당뇨병은 발생기전에 따라 췌장 베타세포를 파괴하는 자가면역과정이 주 원인이 되어 인슐린 분비 부족현상이 발생하는 제1형 당뇨(type 1 diabetes mellitus, T1DM)와 인슐린 저항성, 베타세포 기능저하, 유전적 소인 등의 상호작용으로 인한 제2형 당뇨(type 2 diabetes mellitus, T2DM)로 분류된다. 현재 당뇨병의 치료를 위하여 사용되고 있는 경구 혈당강하제에는 탄수화물의 소화를 제한하여 식후 고혈당을 예방하는  $\alpha$ -glucosidase 저해제(acarbose, miglitol 등), 인슐린 분비를 촉진하는 sulfonylurea계, hepatic glucose output을 감소시키는 metformin 및 peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ ) agonist로 작용하여 인슐린 감수성을 촉진시키는 thiazolidinedione계 약제 등이 있다.<sup>1,2)</sup>

그러나 이들 혈당강하제가 안고 있는 문제점은 고장(鼓腸, flatulence)이나 설사의 유발, 젖산 축적의 위험성, 신부전 증상의 악화, 간독성, 체중 증가, 빈혈, 부종 등으로 나타나는 여러 가지 형태의 부작용이다.<sup>1,3)</sup> 혈당강하제는 장기적인 복용이 필연적이므로 특히 부작용에 대한 우려에 민감하다. 이러한 배경으로 미국 등 선진국에는 이미 당뇨병 환자용 기능성 식품이 다양하게 개발되기도 하였다.<sup>4)</sup> 특히 대체의료의 개념이 부각되면서 부작용이 적은 의약대체소재들이 주목받고 있는데, 현재 판매되는 항당뇨 의약대체소재로는 *Lagerstroemia speciosa*(바나바), *Gymnema sylvestre*(검네마), *Mori folium*(桑葉), *Psidium guajava*(구아바 잎), *Oenothera odorata*(月見草) 등 약용식물 자원을 이용한 상품들이 있으며,<sup>5)</sup> 최근 이 추출물 소재들에 대한 구체적인 연구도 활발히 이루어지고 있다.<sup>6-8)</sup> 실제 당뇨병 개선을 위해 한방치료 또는 민간요법에서 사용하는 약용식물은 그 종류가 30종이

\*교신저자(E-mail) : ckhyun@handong.edu  
(FAX) : 054-260-1362

넘는 것으로 파악된다.<sup>9,10)</sup> 국내에서도 여러 약용식물들에 대한 항당뇨 활성 관련 연구가 활발히 진행되어 왔다.<sup>11-22)</sup> 그러나 이들 연구들은 당뇨모델 실험동물에 대한 급여실험에 의해 관찰되는 혈당치 강하현상을 보고하는 내용이 주를 이루고 있어서, 그 활성기전에 대한 정보가 매우 미흡한 실정이라 하겠다. 세포 시스템을 이용하여 활성을 규명한 연구로는 3T3-L1 지방세포를 이용하여 엄나무 추출물<sup>23)</sup> 및 목단피 추출물<sup>24)</sup>에 대한 *in vitro* 인슐린 감수성 촉진활성에 관하여 보고되었다. 기전 연구로는 최근 맥문동의 homoiso-flavone 분획이 PI 3-K pathway를 통해 3T3-L1 지방세포에서의 glucose uptake을 촉진시킨다는 보고와<sup>25)</sup> 황련의 berberine 분획이 3T3-L1 세포의 인슐린 감수성과 Min6 세포의 인슐린 분비를 촉진시키는 활성에 대한 내용이<sup>26)</sup> 보고된 바 있다.

인슐린이 지방세포 또는 근육세포의 인슐린 수용체 (insulin receptor, IR)에 결합하면 autophosphorylation에 의해 IR이 활성화된 후 insulin receptor substrate(IRS)를 인산화시키게 되고,<sup>27)</sup> 이어서 mitogen-activated protein kinase(MAPK) pathway, phosphatidylinositol 3-kinase(PI 3-kinase) pathway, TC10 pathway 등이 활성화된다.<sup>27-29)</sup> 이 중 glucose transport 라는 인슐린 고유의 기능을 위한 신호전달과정은 PI 3-K 및 TC10 pathway가 작용하여 glucose transporter인 GLUT4의 translocation이 유도되어 일어나게 된다.<sup>30)</sup> 한편 이러한 인슐린 신호전달과정들을 이용하여 항당뇨 활성을 나타내는 소재의 활성기전을 규명할 때 최종적인 혈당강하효과로 이어지는 신호전달 상의 촉진과정은 소재에 따라 다를 수 있다. 어떤 것은 GLUT4 translocation 촉진을 통해 세포의 glucose uptake을 증가시키는 활성이 있지만 IR  $\beta$ -subunit 또는 IRS-1에 대한 인산화에는 아무런 영향을 주지 않을 수도 있고,<sup>31)</sup> 또 다른 경우는 IR의 활성화에 의해 인슐린과 유사한 작용(insulinomimetic)을 나타내는 것,<sup>6,32)</sup> IR 활성화없이 Akt의 활성화 작용을 나타내는 것<sup>33)</sup> 등 다양하다. 항당뇨 물질인  $\alpha$ -lipoic acid의 경우에는 IR 활성화 작용<sup>34)</sup>뿐만 아니라 GLUT4 translocation 촉진과 함께 MAPK pathway를 통해 GLUT4의 활성화를 촉진시키는 작용<sup>35)</sup> 등 다각적인 활성이 보고되고 있다.

본 연구에서는 지방세포에 대한 glucose uptake assay를 이용하여 한방치료 또는 민간요법에서 소갈증에 효능이 있다고 알려지거나 항당뇨 효과가 기대되는 17종의 약용식물의 추출물들에 대해 3T3-L1 지방세포에서의 glucose uptake 촉진활성을 탐색 비교하였다. 또한 고효성이 확인된 황백 (*Phellodendron Cortex*) 추출물에 대하여, 인슐린 신호전달을 저해하는 저해제를 이용한 실험을 통해 그 활성의 개략적인 기전을 규명하였다. 황백은 항염증, 항괴양 작용이 알려져<sup>36)</sup> 건위약 소재로 사용되거나, 항산화 작용을 이용하여 항당뇨 한약 당재에 첨가되고 있다.<sup>10)</sup> 항당뇨 작용에 대해

서는, 두릅나무와 황백의 혼합 추출물이 전통적으로 한방에서 당뇨의 치료에 이용되어 왔음에 착안하여, 그 혼합물의 butanol 추출물에 대한 간세포에서의 glucose consumption 촉진효과가 보고된 바 있다.<sup>37)</sup> 그러나 황백 추출물 단독으로 항당뇨 작용과 관련하여 연구된 내용은 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서는 지방세포에서의 glucose uptake 촉진작용을 확인하고 그 활성기전을 예측함으로써, 황백 추출물의 항당뇨 활성소재로의 응용 가능성을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**약용식물 추출물의 제조** - 각 약용식물의 추출물은 한국 식물추출물은행(한국생명공학연구원, 대전)으로부터 구입하여 사용하였다. 각 약용식물 별로 추출물은행의 정해진 추출방식에 의해 얻어진 열수 추출물 및 알코올(80% 메탄올) 추출물을 공급받아 사용하였다.

**3T3-L1 지방세포의 배양 및 인슐린 저항성의 유도** - 3T3-L1 fibroblasts(미국 플로리다대학 생화학분자생물학과 Susan Frost 교수로부터 받은 세포주를 10 passage 이내에서 사용)를 35-mm culture dish에 배양하고 Frost와 Lane의 방법<sup>38)</sup>에 따라 지방세포로 분화시켜 사용하였다. 즉, 세포를 25 mM glucose를 포함하는 Dulbecco's minimal essential medium (DMEM)에 10% calf serum(CS)을 혼합한 배지에 confluence에 이르도록 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양한 후, 25 mM glucose 포함 DMEM에 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 0.25  $\mu$ M dexamethasone, 1  $\mu$ g/ml insulin 및 10% FBS를 첨가하여 제조한 differentiation medium에서 2일간 배양하며 분화시키고, 분화된 세포는 25 mM glucose, 10  $\mu$ g/ml insulin, 10% FBS를 포함하는 DMEM에 2일간 더 배양하였다. 이 시점부터는 DMEM(25 mM glucose+10% FBS)에서 2-3일 간격으로 배지를 교환해주면서 유지시키고, 분화 후 6일 이내에 실험에 사용하였다.

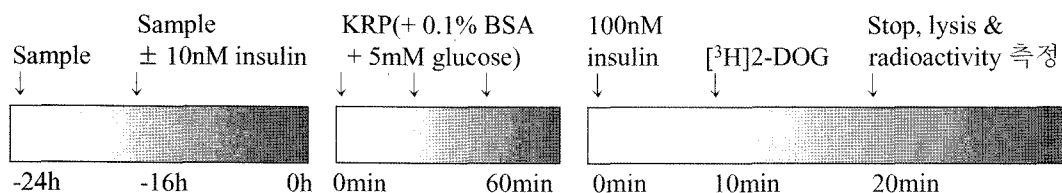
인슐린 저항성이 유도된 3T3-L1 지방세포를 사용할 때에는 저농도의 만성 인슐린(chronic insulin)을 16시간 동안 처리해주었다. 즉 DMEM(25 mM glucose+10% FBS)에 직접 10 nM insulin을 첨가하여 16시간 동안 배양하였다.

**추출물 시료 처리 및 2-deoxyglucose(2-DOG) uptake 측정(glucose transport assay)** - 열수추출물과 알코올 추출물 시료는 각각 PBS와 DMSO에 용해시켜 처리하였다. 3T3-L1 지방세포에 24시간 동안 추출물 시료를 처리하고 비처리 대조구와 비교하여 glucose uptake 촉진 정도를 측정하였다. 하나의 조건 당 세포가 배양된 2개의 35-mm dish를 준비하여 duplicate로 측정하여 최종 radioactivity 측정치의 평균값을 얻었다. 열수추출물과 알코올 추출물의 비처리 대조구에는 각각 PBS와 DMSO만을 처리하였다. Glucose transport assay는 Thomson 등의 방법<sup>38,39)</sup>을 수정하여 사용

하였다. 시료 처리가 끝난 dish에서 배지를 제거하고 37°C로 유지되는 plate 위에서 KRP(+0.1% BSA+5 mM glucose)로 3 ml×3회의 세척과정을 20분 간격으로 3회 반복하여 잔여 인슐린 및 시료를 세척하였다. 이어서 1 ml의 KRP를 주입하고 37°C에서 100 nM 급성 인슐린(acute insulin)을 가하여 10분 동안 자극한 다음 표지되지 않은 2-DOG와 [<sup>3</sup>H]2-DOG(Amersham Pharmacia)를 함께 KRP에 녹인 용액(0.2 mM, 0.2 μCi)을 가하여 정확히 10분간 incubation시켰다. Ice-cold PBS 3 ml로 세척하여 uptake 반응을 중지시키고 PBS로 2회(×3 ml) 더 세척하였다. 세포를 1시간 정도 통풍 건조시킨 후 0.1% SDS 1 ml을 가하여 pasteur glass pipette으로 밀고 당기면서 lysis 시키고 lysate 300 μl를 취하여 liquid scintillation counter(Beckman)로 radioactivity를 측정하였다. 측정과정은 인슐린 저항성 세포를 예로 들어 아래와 같이 도식할 수 있다(정상세포의 경우는 10 nM 만성 인슐린 처리과정 및 washes 과정 생략).

**결과 및 고찰**

**17종 약용식물의 추출물에 대한 glucose uptake 촉진 작용 검색** - 한방치료 또는 민간요법에서 당뇨병에 효능이 있다고 알려진 갈근(葛根, *Puerariae Radix*), 팔루근(括藹根, *Trichosanthes Radix*), 맥문동(麥門冬, *Liliodpe Tuber*), 방풍(防風, *Ledebouriellae Radix*), 백출(白朮, *Atractylodis Rhizoma alba*), 산약(山藥, *Dioscorea Rhizoma*), 옥죽(玉竹, *Polygonati odoratum Rhizoma*), 지골피(地骨皮, *Lycii Radicis Cortex*), 지모(知母, *Anemarrhenae Rhizoma*), 생지황(生地黃, *Rehmaniae Radix crudus*), 숙지황(熟地黃, *Rehmaniae Radix Preparata*), 창출(蒼朮, *Atractylodis Rhizoma*), 택사(澤瀉, *Alismatis Rhizoma*), 현삼(玄參, *Scrophulariae Radix*), 황기(黃耆, *Astragali Radix*), 황백(黃柏, *Phellodendri Cortex*), 황정(黃精, *Polygonati sibiricum Rhizoma*) 등의 17종 약용식물에 대하여 추출물을 제조하고 활성을 탐색하였다. 대조군



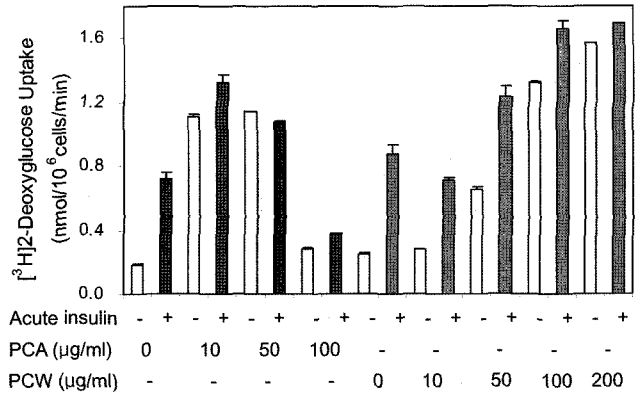
**Table I.** Enhancement (%) of glucose uptake levels in 3T3-L1 adipocytes treated with alcohol- or water-extract of 17 medicinal plants

Sample	Alcohol Extract						Water Extract					
	Acute insulin stimulation			Acute insulin stimulation			Acute insulin stimulation			Acute insulin stimulation		
Concentration(μg/ml)	Basal	50	100	Basal	50	100	Basal	50	100	Basal	50	100
갈근( <i>Puerariae Radix</i> )	96	107	120	96	104	103	129	116	123	80	75	70
팔루근( <i>Trichosanthis Radix</i> )	116	122	395	95	69	79	87	96	100	93	91	102
맥문동( <i>Liriopis Tuber</i> )	114	107	106	84	76	91	100	83	92	121	122	130
방풍( <i>Ledebouriellae Radix</i> )	108	98	98	86	101	109	157	173	187	114	127	122
백출( <i>Atractylodis Rhizoma alba</i> )	129	116	123	80	75	70	96	107	120	96	104	103
산약( <i>Dioscorea Rhizoma</i> )	169	121	145	91	109	94	122	115	133	111	104	95
옥죽( <i>Polygonati officinalis Rhizoma</i> )	79	101	130	106	99	114	86	126	146	107	102	102
지골피( <i>Licii Radicis Cortex</i> )	81	62	89	99	89	92	67	84	189	113	104	40
지모( <i>Anemarrhenae Rhizoma</i> )	103	130	114	100	104	97	84	97	92	117	108	111
생지황( <i>Rehmaniae Radix Crudus</i> )	66	91	85	87	79	77	125	108	123	92	101	99
숙지황( <i>Rehmaniae Radix Preparata</i> )	172	119	139	104	115	116	112	113	109	95	97	98
창출( <i>Atractylodis Rhizoma</i> )	95	41	132	95	95	108	115	98	99	107	117	73
택사( <i>Alismatis Rhizoma</i> )	99	137	150	89	84	89	133	179	149	124	125	144
현삼( <i>Scrophulariae Radix</i> )	104	113	59	112	102	102	100	138	143	112	89	75
황기( <i>Astragali Radix</i> )	124	100	97	94	94	92	96	97	104	96	102	95
황백( <i>Phellodendri Cortex</i> )	611	626	156	185	150	53	112	262	532	81	140	189
황정( <i>Polygonati Rhizoma</i> )	105	107	94	145	138	121	133	145	115	88	87	103

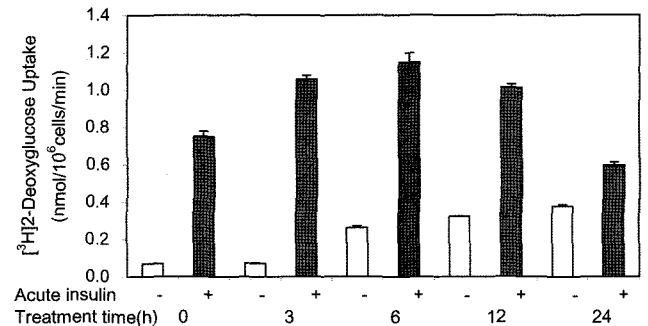
세포에서의 glucose uptake 값에 대해 각 추출물을 처리함으로써 향상된 정도를 %로 계산하여 Table I에 나타내었다. 탐색한 약용식물 중에 황백의 열수 추출물과 알코올 추출물이 가장 glucose uptake 촉진효과가 우수하였다. 즉, 급성 인슐린(100 nM, 10분)을 처리해주는 인슐린 자극 glucose uptake(insulin-stimulated glucose uptake)에 있어서 10 µg/ml의 알코올 추출물은 대조구 대비 185%로, 100 µg/ml의 열수 추출물은 189%로 증가시키는 탁월한 glucose uptake 증가효과를 보여주었다. 이는 본 세포시스템에서 측정된 기존의 항당뇨 약제인 pioglitazone(10 µM)의 인슐린 자극 glucose uptake 촉진활성이 140% 수준임(data not shown)을 감안할 때 매우 우수한 촉진활성으로 평가되었다. 또한 급성 인슐린을 처리하지 않는 인슐린 무자극 glucose uptake(basal glucose uptake)에서도 100 µg/ml의 열수 추출물 처리에 의해 5.3배 이상 증가되는 매우 우수한 glucose uptake 촉진효과를 나타내었다. 인슐린 자극 glucose uptake과 무자극 uptake 모두에 대하여 크게 촉진시키는 이러한 효과는 다른 추출물에서는 나타나지 않는 현상으로서 황백 추출물의 촉진활성 기전이 독특한 것임을 알 수 있었다. 그러나 한편으로 알코올 추출물의 경우에는 50 µg/ml 이상의 농도에서 오히려 촉진활성이 낮아짐으로 보아 세포독성을 가지고 있음을 보여주었다.

황백 이외의 약용식물 중에서는 황정의 알코올 추출물과 택사의 열수 추출물도 144~145% 수준까지의 촉진작용으로 우수한 인슐린 자극 glucose uptake 촉진효과를 보여주었다. 또한 맥문동과 방풍의 열수 추출물도 127~130% 수준의 유의적인 촉진효과를 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 황백 추출물이 나타낸 탁월한 촉진효과와 독특한 촉진기전에 주목하여 황백 추출물에 대하여 추가적인 활성 분석을 실시하였다.

**황백 추출물을 처리한 시간과 처리농도에 비례하여 3T3-L1 지방세포에서의 glucose uptake은 증가된다.** - 황백의 촉진활성을 확인하기 위해 우선 황백 추출물의 처리농도와 처리시간을 달리해서 glucose uptake의 변화를 조사하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 황백의 추출물들은 농도의존적으로 촉진활성이 증가하는 경향을 보여주었는데, 열수 추출물은 200 µg/ml의 농도까지 지속적인 촉진활성의 증가를 나타낸 반면, 알코올 추출물의 경우는 10 µg/ml 처리로 가장 높은 촉진활성이 나타난 후 그보다 높은 농도에서는 오히려 촉진활성이 떨어지는 경향을 보여줌으로써 50 µg/ml 이상에서는 세포독성의 영향을 받은 것으로 판단되었다. Fig. 2에는 열수추출물을 100 µg/ml의 농도로 처리시간을 달리하면서 실험한 결과를 나타내었다. 흥미롭게도 인슐린 무자극 glucose uptake은 24시간까지 처리시간에 따라 지속적으로 촉진활성이 높아진 반면, 인슐린 자극 glucose uptake의 경우에는 6시간 처리시 가장 높은 활성을 보인 후 그 이상의 처리는 오히



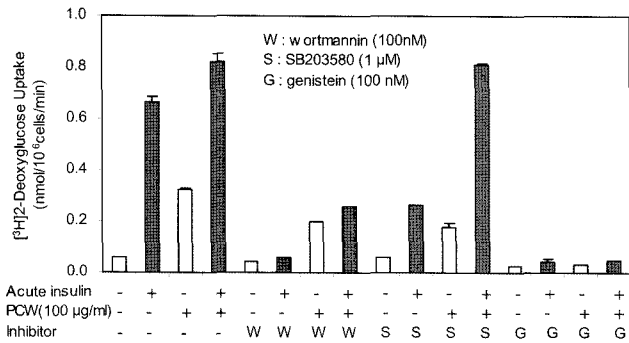
**Fig. 1.** Enhancement of basal and insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes treated with extracts of *Phellodendri Cortex* (PC). PCA: alcohol extract of PC, PCW: water extract of PC.



**Fig. 2.** Time course for enhancing effect of PCW on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes.

려 활성을 떨어뜨림을 알 수 있었다. 이 결과로부터 인슐린 무자극 glucose uptake과 인슐린 자극 glucose uptake을 촉진시키는 성분은 서로 다른 물질인 것으로 추정되었다. 얻어진 결과를 근거로 하여, 이후의 실험은 황백 열수추출물을 6시간 동안 처리하는 조건으로 고정하여 각종 저해제의 처리에 의해 황백의 활성이 어떤 영향을 받는지 조사하였다.

**Wortmannin은 황백과 인슐린을 처리한 3T3-L1 지방세포에서의 glucose uptake를 거의 완전히 감소 시키지만 황백만을 처리한 경우에는 큰 영향을 미치지 못한다.** - 인슐린의 신호전달 과정에서 PI 3-kinase는 인슐린 자극 glucose uptake을 일으키는 신호전달 매개체로서의 중요한 역할을 수행한다. 황백의 효과와 PI 3-kinase의 역할과의 연관성을 알아보기 위해 PI 3-kinase를 특이적으로 저해하는 wortmannin을 처리하였다. 3T3-L1 지방세포에 황백 열수추출물을 6시간 동안 처리한 후, 급성 인슐린을 가하기 전에 100 nM의 wortmannin을 10분 동안 먼저 처리하여 glucose uptake의 변화를 조사하였다. Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 우선 황백을 처리하지 않은 대조구에서는 wortmannin에 의해서 인슐린 자극 glucose uptake이 완전히 억제됨으로써 wortmannin



**Fig. 3.** Effect of wortmannin, SB203580, and genistein on enhancement of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes treated with PCW.

이 PI 3-kinase를 저해제로서 잘 작용하고 있음을 보여주었다. 반면 황백을 처리한 경우에는 황백에 의해 증가된 인슐린 무자극 glucose uptake은 wortmannin에 의해 부분적으로만 감소하였으나, 인슐린 자극 glucose uptake에서의 증가효과는 거의 완전히 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이로써 황백의 인슐린 자극 glucose uptake에 대한 촉진효과가 PI 3-kinase에 대한 독립적인 촉진작용에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 즉 PI 3-kinase의 활성화를 촉진시킴으로써 그 downstream인 GLUT4 translocation이 촉진되어 glucose uptake이 향상된 것으로 추정되었다. 한편 황백에 의해 촉진된 인슐린 무자극 glucose uptake는 PI 3-kinase와 별로 관계가 없음이 확인되었다. 인슐린 무자극 glucose uptake은 주로 GLUT1에 의해 이루어지며 MAPK kinase의 활성화에 의해 GLUT1의 발현과 translocation이 촉진되는 것으로 알려져 있다.<sup>40)</sup> 이러한 점을 감안할 때, 황백 추출물의 처리에 의해 GLUT1의 발현과 translocation이 촉진되었을 것으로 판단되었다.

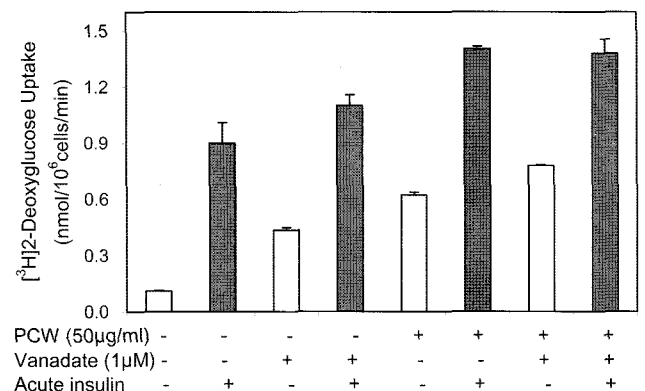
p38의 저해제인 SB203580은 3T3-L1 지방세포에서 황백에 의해 증가된 glucose uptake에 아무런 영향을 끼치지 못한다. - 지방세포와 근육세포에서의 glucose uptake 현상은 GLUT4의 translocation 뿐만 아니라 그 활성화에 의해서도 촉진되며 이에 관여하는 단백질이 MAPK 중 하나인 p38인 것으로 알려져있다.<sup>41,42)</sup> 본 연구에서는 황백이 p38의 작용에 미치는 영향을 조사하기 위해 p38에 특이적 저해제인 SB203580을 1 µM의 농도로 처리하였다. Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 황백을 처리하지 않은 대조구에서 SB203580에 의해 인슐린 자극 glucose uptake가 20% 정도 감소하는 것으로 나타나 GLUT4의 활성화에 의한 glucose uptake이 저해를 받고 있음을 보여주었다. 그러나 황백을 처리한 경우에도 그 감소의 정도가 대조구와 비슷한 수준으로 나타나는 것으로 보아 p38과 황백의 효과와는 별 연관성이 없는 것으로 판단할 수 있었다.

Tyrosine kinase의 저해제인 genistein은 황백의 glucose uptake 촉진작용을 완전히 막는다. - IR, IRS를 비

롯하여 인슐린 신호전달 매개 단백질들의 tyrosine 인산화는 인슐린 신호전달에서 매우 중요하다. 황백과 tyrosine 인산화와의 연관성을 알아보기 위해 tyrosine kinase의 저해제인 genistein 처리 여부에 따라 황백의 효과에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 급성 인슐린 처리 전 30분 동안 100 nM의 genistein을 처리하고 glucose uptake를 측정된 결과, genistein에 의해서 대조구는 물론 황백을 처리한 경우에서도 glucose uptake가 완전히 억제되었다. Wortmannin이 인슐린 자극 glucose uptake만 억제했던 것과 달리, genistein은 황백에 의해서 증가된 인슐린 무자극 glucose uptake도 완전히 억제됨을 보여주었다. 이로써 황백의 작용이 인슐린 신호전달에 매개되는 단백질들의 tyrosine 인산화에 근본적으로 관련되어 있음을 확인할 수 있었다.

황백과 vanadate를 같이 처리한 3T3-L1 지방세포에서 glucose uptake는 additive 한 양상을 보인다. - Vanadate는 tyrosine phosphatase 저해작용을 가지고 있어서 이미 혈당 강하 물질로 사용되고 있다.<sup>43,44)</sup> Vanadate와 황백의 효과를 비교해보고, 두 가지를 함께 처리했을 때의 효과는 어떠한지 알아보았다. 먼저 황백을 처리한 후 급성 인슐린을 처리하기 15분 전에 1 mM의 vanadate를 처리해서 glucose uptake을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 vanadate와 황백 열수추출물은 인슐린 자극이 없는 상태에서도 어느 정도 glucose uptake을 증가시켰다. 그러나 두 가지를 동시에 처리했을 때 각각의 단독 처리에 비해 유의적인 증가는 관찰되지 않았다. 이로써 황백의 효과는 vanadate와 비슷한 작용, 즉 tyrosine 탈인산화를 막거나 돕는 작용에 의한 것임을 간접적으로 추정할 수 있었다. 이러한 현상은 앞서 확인된 바와 같이, 황백의 효과가 tyrosine 인산화 저해제에 의해 완전히 억제된 결과와 일치하는 것으로서, 황백의 작용기전이 tyrosine 인산화와 연결되어 있음을 재차 확인시켜 주었다.

황백을 처리한 3T3-L1 지방세포에서 인슐린 저항성에 의한 glucose uptake의 감소가 개선된다. - 인슐린 저항



**Fig. 4.** Effect of vanadate on enhancement of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes treated with PCW.

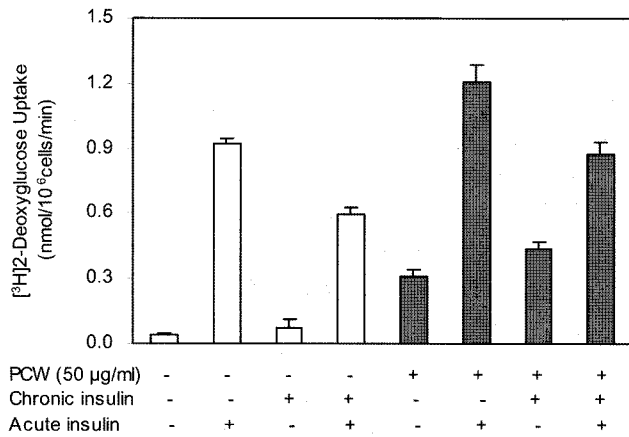


Fig. 5. Recovery of glucose uptake in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes treated with PCW.

성을 유도시킨 세포에서의 황백의 효과를 알아보았다. 3T3-L1 지방세포를 10 nM 인슐린(만성 인슐린)으로 16시간 동안 처리해서 인슐린 저항성을 유도하고 glucose uptake assay를 실시하기 6시간 전부터 황백 열수추출물을 처리한 후 glucose uptake 촉진효과를 조사하였다. Fig. 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 대조구에서는 만성 인슐린 처리에 의해 급성 인슐린을 가하였을 때의 인슐린 자극 glucose uptake이 65% 수준으로 떨어진 것을 볼 때 인슐린 저항성이 잘 유도되었음을 확인할 수 있었다. 얻어진 인슐린 저항성 세포 시스템에 황백을 처리하였을 때 인슐린 저항성에 의해 감소된 glucose uptake이 황백 추출물의 처리에 의해 현저히 개선되었으며, 인슐린 자극 glucose uptake의 수준이 정상세포와 거의 유사한 수준으로 회복되고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 지방세포가 인슐린 저항성 상태로 바뀌게 되는 현상은 여러 가지 경로를 통해 일어날 수 있지만, 본 연구에서 조절한 조건, 즉 낮은 농도(10 nM)의 인슐린에 오랜 시간 동안(12시간 이상) 노출되게 되면 IRS-1의 양이 줄어들어 인슐린 저항성이 유도되게 된다. IRS-1은 인슐린 자극을 IR로부터 받아 tyrosine 인산화에 의해 활성화됨을 감안할 때, 황백의 처리에 의해 인슐린 저항성 세포의 인슐린 자극 glucose uptake이 회복되는 것은 인슐린 저항성에 의해 IRS-1의 양이 감소되지만 IRS-1의 인산화가 촉진되어 보상시켜주는 작용에 의한 것으로 추정되었다. 이와 같은 결과로부터, 황백 추출물의 glucose uptake 촉진활성이 인슐린 저항성을 주원인으로 하는 제2형 당뇨병에 대한 항당뇨 활성으로 연결될 수 있음을 판단할 수 있었다.

## 결 론

항당뇨 효과를 위해 한방치료 또는 민간요법에서 사용되고 있는 17종의 약용식물에 대하여 3T3-L1 지방세포에서의

glucose uptake에 미치는 영향을 조사함으로써 혈당강하소재로의 응용 가능성을 평가하였다. 그 중 황백 추출물이 glucose uptake 촉진활성이 가장 우수함을 확인하였으며, 급성 인슐린을 처리한 인슐린 자극 glucose uptake과 처리하지 않은 인슐린 무자극 glucose uptake을 모두 촉진시키는 작용을 관찰할 수 있었다. 이러한 황백의 촉진작용은 PI 3-kinase의 저해제인 wortmannin 처리에 의해 완전히 억제되었으며, p38 MAPK의 저해제인 SB203580에 의해서는 영향을 받지 않았다. 한편 tyrosine kinase의 저해제인 genistein에 의해서는 인슐린 자극 및 무자극 glucose uptake이 모두 완벽하게 억제되었으며, tyrosine phosphatase의 저해제인 vanadate와의 유의적인 시너지 효과는 관찰되지 않았다. 따라서 황백 추출물의 glucose uptake 촉진효과는 PI 3-kinase의 활성화를 촉진시킴으로써 GLUT4 translocation을 향상시키며 또한 그 신호전달 과정 상에서 tyrosine 인산화의 촉진을 통해 그 작용을 나타내는 것으로 추정할 수 있었다. 황백 추출물의 탁월한 glucose uptake 촉진활성과 인슐린 자극 여부에 관계없이 작용하는 독특한 활성기전에 근거하여, 항당뇨 소재로 응용함에 있어 높은 가능성이 기대된다. 이를 위해서는 황백 추출물의 처리에 의한 신호전달 단백질들의 변화를 분자 수준에서 분석함으로써 그 작용기전을 보다 명확히 규명하는 것이 필요하다. 또한 황백 추출물이 보여준 인슐린 무자극 조건에서의 촉진작용이 지방 또는 근육조직 등 인슐린 감수성 조직에서 특이적으로 일어나는 현상인지 조사함으로써 인슐린 비감수성 조직에서의 부작용 가능성에 대해서도 검토가 필요하다 하겠다.

## 사 사

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었습니다(KRF-2004-002-F00084). 또한 본 연구에서의 glucose transport assay 실험에 도움을 주신 포항공과대학교 생명과학과 김경태 교수님 실험실에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Bailey, C. J. (1999) Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **58**: 1511-1520.
- Zhang, B. B. and Moller, D. E. (2000) New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**: 461-467.
- 임중인 (2003) 당뇨병 치료제의 최근 연구동향. *보건산업기술동향* **2003 봄**: 28-38.
- 김정원 (2002) 미국 당뇨병 환자용 기능성 식품시장동향. *보건산업기술동향* **2002 겨울**: 113-117.
- 食品と開發 編輯部 (2003) 健康食品の市場動向と素材技術研究. *食品と開發* **38**: 20-46.

6. Liu, F., Kim, J., Li, Y., Liu, X., Li, J. and Chen, X. (2001) An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *J. Nutr.* **131**: 2242-2247.
7. Xie, J.T., Wang, A., Mehendale, S., Wu, J., Aung, H.H., Dey, L., Qiu, S. and Yuan, C.S. (2003) Anti-diabetic effects of *Gymnema yunnanense* extract. *Pharmacol. Res.* **47**: 323-329.
8. Oh, W.K., Lee, C.H., Lee, M.S., Bae, E.Y., Sohn, C.B., Oh, H., Kim, B.Y. and Ahn, J.S. (2005) Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. *J. Ethnopharmacol.* **96**: 411-415.
9. 김형균, 김형민, 송복근, 이연정, 정헌택 (2000) 한약의 약리, pp.332-333, 고려의학
10. Li, W.L., Zheng, H.C., Bukuru, J., De. and Kimpe, N. (2004) Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* **92**: 1-21.
11. 김옥경, 이은방, 강삼식 (1993) 두릅나무 근피의 혈당강하 성분과 관련 연구(II) -유효성분의 분리 및 작용. *생약학회지* **24**: 219-222.
12. 이주선, 최명현, 정성현 (1995) 상엽의 혈당강하 활성. *약학회지* **39**: 367-372.
13. 정기화, 김박광, 조술연, 이재신, 한혜경, 박만기, 정춘식, 박정일 (1997) 수종 생약의 혈당강하작용. *생약학회지* **28**: 72-74.
14. 김윤영, 조여원, 정성현, 구성자 (1999) db/db 마우스에서 상백피의 혈당강하효과. *한국식품과학회지* **31**: 1057-1064.
15. Lee, Y. G. and Kim, S. D. (2000) Effect of Palmiwon on diabetes-prone BB rats. *Food Sci. Biotechnol.* **9**: 157-162.
16. 최혁재, 김남재, 김동현 (2000) 석이에서 분리한 GE974의 혈당상승억제효과. *생약학회지* **31**: 268-272.
17. 김철영, 강시현, 정기화, 정춘식, 김박광, 허훈 (2000) 혈당강하효과를 나타내는 상엽의 당지질 성분. *생약학회지* **31**: 95-100.
18. 임숙자, 박지은 (2002) 택사 H<sub>2</sub>O 분획물과 Chromium의 투여가 streptozotocin 유발 당뇨 흰쥐의 혈당 및 혈중 지질함량에 미치는 영향. *한국식품과학회지* **34**: 725-731.
19. Oh, J.E., Yoon, H.K. and Koo, S.J. (2002) Effects of drink containing Mori folium extract on blood glucose and lipid composition in db/db mice. *Food Sci. Biotechnol.* **11**: 110-116.
20. Choi, S.B. and Park, S. (2002) A steroidal glycoside from *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce. improves insulin resistance but does not alter insulin secretion in 90% pancreatectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 2036-2043.
21. Choi, S.B. and Park, S. (2002) The effects of water extract of *Polygonatum Odoratum* (Mill) Druce on insulin resistance in 90% pancreatectomized rats. *J. Food Sci.* **67**: 2375-2379.
22. Choi, S.B., Park, C.H., Choi, M.K., Jun, D.W. and Park, S. (2004) Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 2257-2264.
23. 고병섭, 김호경, 박선민 (2002) 엄나무 추출물이 3T3-L1 지방세포에서 인슐린 민감성과 인슐린 유사성 작용에 미치는 영향. *한국농화학회지* **45**: 42-46.
24. 박선민, 진동화, 박춘희, 장진선, 박성규, 고병섭, 김보중, 최수봉 (2004) 목단피 추출물의 혈당 강하 효과. *한국식품과학회지* **36**: 472-477.
25. Choi, S.B., Wha, J.D. and Park, S. (2004) The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriodendron platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway. *Life Sci.* **75**: 2653-2664.
26. Ko, B.S., Choi, S.B., Park, S.K., Jang, J.S., Kim, Y.E. and Park, S. (2005) Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from *Coptidis rhizoma*. *Biol Pharm Bull.* **28**: 1431-1437.
27. Nystrom, F.H. and Quon, M.J. (1999) Insulin signaling: metabolic pathways and mechanism of specificity. *Cell Signal.* **11**: 563-574.
28. Bevan, P.(2001) Insulin signaling. *J. Cell Sci.* **114**: 1429-1430.
29. Baumann, C.A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P.E., Pessin, J.E. and Saltiel, A.R. (2001) CAP defines a second signaling pathway required for insulin stimulated glucose transport. *Nature* **407**: 202-207.
30. Kanzaki, M., Mora, S., Hwang, J.B., Saltiel, A.R. and Pessin, J.E. (2004) Atypical protein kinase C (PKC $\zeta/\lambda$ ) is a convergent downstream target of the insulin-stimulated PI 3-K and TC10 signaling pathways. *J. Cell Biol.* **164**: 279-290.
31. 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**: 1821-1831.
32. Qureshi, S.A., Ding, V., Li, Z., Szalkowski, D., Biazzo-Ashnault, D.E., Xie, D., Saperstein, R., Brady, E., Huskey, S., Shen, X., Liu, K., Xu, L., Salituro, G.M., Heck, J.V., Moller, D.E., Jones, A.B. and Zhang, B.B. (2000) Activation of insulin signal transduction pathway and anti-diabetic activity of small molecule insulin receptor activators. *J. Biol. Chem.* **275**: 36590-36595.
33. Kamei, R., Kitagawa, Y., Kadokura, M., Hattori, F., Hazeki, O., Ebina, Y., Nishihara, T. and Oikawa, S. (2002) Shikonin stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes via an insulin-independent tyrosine kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**: 642-651.
34. Moini, H., Tirosh, O., Park, Y.C., Cho, K.J. and Packer, L. (2002) R- $\alpha$ -Lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**: 384-391.
35. Konrad, D., Somwar, R., Sweeney, G., Yaworsky, K., Hayashi, M., Ramlal, T. and Klip, A. (2001) The antihyper-

- perglycemic drug  $\alpha$ -lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation. *Diabetes* **50**: 1464-1471.
36. Uchiyama, T. (1989) Anti-ulcer effects of extract from *Phellodendron cortex*. *Yakugaku Zasshi* **109**: 672-676.
  37. Kim, S.J., Kim, Y.Y., Ko, K.H., Hong, E.K., Han, Y.B., Kang, B.H. and Kim, H. (1998) Butanol extract of 1:1 mixture of *Phellodendron cortex* and *Aralia cortex* stimulates PI 3-kinase and ERK2 with increase of glycogen levels in HepG2 cells. *Phytother. Res.* **12**: 255-260.
  38. Frost, S.C. and Lane, M.D. (1985) Evidence for the involvement of vicinal sulfhydryl groups in insulin-activated hexose transport by 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **260**: 2646-2652.
  39. Thomson, M.J., Williams, M.G. and Frost, S.C. (1997) Development of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 7759-7764.
  40. Yamamoto, Y., Yoshimasa, Y., Koh, M., Suga, J., Masuzaki, H., Ogawa, Y., Hosoda, K., Nishimura, H., Watanabe, Y., Inoue, G. and Nakao, K. (2000) Constitutively active mitogen-activated protein kinase increases GLUT1 expression and recruits both GLUT1 and GLUT4 at the cell surface in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **49**: 332-339.
  41. Sweeney, G., Somwar, R., Ramlal, T., Volchuk, A., Ueyama, A. and Klip, A. (1999) An inhibitor of p38 MAP kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J. Biol. Chem.* **274**: 10071-10078.
  42. Somwar, R., Koterski, S., Sweeney, G., Sciotti, R., Djuric, S., Berg, C., Trevillyan, J., Scherer, P.E., Rondinone, C.M. and Klip, A. (2002) A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* **277**: 50386-50395.
  43. Shechter, Y. and Karlsh, S.J. (1980) Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions. *Nature* **284**: 556-558.
  44. Sakurai, H., Yasui, H. and Adachi, Y. (2003) The therapeutic potential of insulin-mimetic vanadium complexes. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **12**: 1189-1203.

(2005년 10월 7일 접수)