

## 3T3-L1 지방세포에서 녹나무 잎 추출분획물이 인슐린작용에 미치는 효과

고병섭<sup>1</sup> · 이미영<sup>1</sup> · 김호경<sup>1</sup> · 천진미<sup>1</sup> · 최수봉<sup>2</sup> · 전동화<sup>3</sup> · 장진선<sup>3</sup> · 박선민<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>한국한의학연구원

<sup>2</sup>건국대학교 의파대학

<sup>3</sup>호서대학교 식품영양학과

### Effect of *Cinnamomum camphora* Leaf Fractions on Insulin Action

Byoung-Seob Ko<sup>1</sup>, Mi Young Lee<sup>1</sup>, Ho Kyoung Kim<sup>1</sup>, Jin Mi Chun<sup>1</sup>, Soo Bong Choi<sup>2</sup>,  
Dong Wha Jun<sup>3</sup>, Jin Sun Jang<sup>3</sup> and Sunmin Park<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

<sup>2</sup>School of Medicine, Konkuk University, Chungbuk 380-701, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food and Nutrition, Hoseo University, Chungnam 336-795, Korea

#### Abstract

In the present study, we screened candidates for enhancing insulin action and secretion from *Cinnamomum camphora* (CC) fractions, in 3T3-L1 adipocytes and Min6 cells by investigating insulin-stimulated glucose uptake and glucose-stimulated insulin secretion, respectively. CC were extracted by 70% ethanol followed by XAD-4 column chromatography with serial mixture solvents of methanol and water, and the fractional extractions were utilized for determining insulin action and secretion, and  $\alpha$ -glucoamylase suppressing activity. A significant insulin-stimulated glucose uptake was observed in 3T3-L1 adipocytes, giving 0.5 or 5  $\mu$ g/mL of 40% and 60% methanol fractions plus 0.2 nM insulin, compared to the treatment of DMSO plus 0.2 nM insulin. The treatments of 40% and 60% methanol fractions plus 0.2 nM insulin reached the glucose uptake of 10 nM insulin treatment. The 40% methanol fraction increased triglyceride accumulation by stimulating differentiation and triglyceride synthesis similar to pioglitazone, PPAR- $\gamma$  agonist. No inhibition of  $\alpha$ -glucoamylase activity of CC fractions was observed. They did not modulate the insulin secretion capacity in either low or high glucose media. These results suggest that 40% methanol fraction contains a potential insulin sensitizer to have a similar function of PPAR- $\gamma$  agonist. Crude CC extract may improve glucose utilization by enhancing insulin-stimulated glucose uptake without elevating glucose stimulated insulin secretion.

**Key words:** insulin sensitizer, PPAR- $\gamma$  agonist,  $\alpha$ -glucoamylase, 3T3-L1 adipocytes, Min6 cells

#### 서 론

당뇨병은 인슐린이 분비가 되지 않거나 인슐린의 작용력이 감소하여 나타나는 것으로 전자는 제1형 당뇨병에 그리고 후자는 제2형 당뇨병에 속한다. 제2형 당뇨병은 인슐린은 분비되지만 인슐린에 민감한 조직에서 그 작용력이 낮아져 혈당이 높아져 나타난다. 인슐린 작용이 감소하면 이것을 극복하기 위해서 췌장의 베타세포에서 인슐린 분비가 증가하여 고인슐린혈증을 동반한다(1,2). 그러나 우리나라의 제2형 당뇨병은 인슐린 작용력이 낮은데 인슐린 분비도 낮아서 서구에 비해 당뇨병 증세도 심하고 비만하지 않은 특징을 가지고 있다(3,4). 그러므로 우리나라의 제2형 당뇨병을 치료함에 있어서 인슐린 작용력을 향상시키고 동시에 인슐린 분비능도 증가시키는 것이 중요한 것으로 알려져 있다. 현재

제2형 당뇨병 치료제를 살펴보면 인슐린 분비능을 증가시키는 sulfonylurea 계통의 약물이 있고, 인슐린 작용력을 향상시키는 pioglitazone 계통의 약물이 있으며 간에서 당신생합성을 감소시키는 metformin 계통의 물질도 있고 탄수화물의 소화흡수를 방해하여 식후 혈당의 상승을 방지하는 acarbose 계통의 약물도 있다(5-7).

국내를 비롯한 아시아에서는 민간요법으로 여러 가지 약초들을 당뇨병 및 여러 질병의 치료제로 사용하여 왔다(8-10). 그러나 민간요법에서 사용되고 있는 약재 중에는 당뇨병의 효과가 있다고 밝혀진 것도 있지만, 효과가 없는 것으로 판명된 것들도 많았다(8-10). 민간요법으로 사용되고 있는 많은 약초에 대해서도 아직까지 그 효과가 밝혀진 것은 많지 않고 특히 어떤 기전으로 혈당을 낮추는지에 대한 연구는 거의 없었다. 본 연구팀은 동의보감에서 당뇨병의 처방에

\*Corresponding author. E-mail: smpark@office.hoseo.ac.kr  
Phone: 82-41-540-5633. Fax: 82-41-548-0670

많이 사용하는 90 여종의 약초들을 중심으로 먼저 3T3-L1 섬유아세포와 지방세포를 사용하여 *in vitro*에서 인슐린 민감성이나 인슐린 유사성 물질을 탐색하였다(11-14). 이들 중 효과가 있는 한약재의 추출분획물은 더 분리하여 단일 물질로 분리하고 있으며, 이 물질들의 효과는 백서에 장기간 투여하였을 때 인슐린 민감성이나 인슐린 분비능의 변화를 조사하고 있다. 연구한 한약재 중에서 이미 발표한 것으로 울무, 상백피, 둥굴레 뿌리, 오미자, 목단피의 추출분획물에는 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있는 것을 발견하였다(11-14). 특히 둥굴레 뿌리 추출물은 90% 추출물을 제거한 백서에서 인슐린 민감성을 호전시킴으로써 체내 포도당 이용을 증가시켜 혈당을 강하시키는 효과를 나타내었다(13). 또한, 둥굴레 뿌리에 함유되어 있는 steroidal glycosides가 90% 추출물 제거 백서에서 인슐린 민감성 물질로 작용한다는 것을 확인하였다(15). 본 연구팀이 한약재가 혈당 강하에 대한 효과가 있는지를 조사할 때 표적(target)으로 조사한 것은 인슐린의 작용을 향상시키는 인슐린 민감성 효과, 인슐린처럼 작용하는 인슐린성 효과, 탄수화물의 소화 흡수를 방해하는  $\alpha$ -glucoamylase 억제 효과를 가지고 있는 지 여부를 탐색하는 것이었다.

녹나무는 우리나라에서 천연기념물 제162호로 지정되었으며 제주도 서귀포에서 자생한다. 녹나무(*Cinnamomum camphora* PRESL)는 녹나무과(Lauraceae)에 속한 식물로 주로 가지를 말린 것을 장뇌라고 하며 이를 약용으로 사용해 왔다. 장뇌에는 정유성분인 camphor이 주요성분이고 이외에 cineol,  $\alpha$ -pinene, l-camphene, d-limonene, safrol,  $\alpha$ -camphorene 등이 함유되어 있다고 보고되고 있다(16). 아직까지 녹나무 잎이 혈당 강하 효과에 대한 연구는 거의 없지만, 제주도에서는 민간요법으로 녹나무 잎 다린 물을 당뇨병 치료에 사용해 왔다. 본 연구에서는 녹나무 잎 추출물이 인슐린 작용을 향상시키는 인슐린 민감성 효과, 인슐린처럼 작용하는 인슐린성 물질로서의 효과 그리고  $\alpha$ -glucoamylase의 억제제로서의 효과가 있는 지 여부를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 한약재료

본 실험에 사용한 녹나무 잎은 제주도 한라수목원의 협조를 받아 직접 채취하여 사용하였고, 일련번호(2004-kiom-ko-11)를 붙이고 한국한의학연구원 표본실에 보관하고 있다.

### 시료의 조제

건조된 녹나무 잎 1 kg을 분쇄하여 증류수 10 L을 넣고 2시간 열수로 2회 반복 추출한 후 거즈로 여과하고 450×g로 원심분리(Megafuge 1.0R, USA)하여 상등액을 회전진공 농축기(Buchi R-114, USA)로 35°C에서 감압농축한 후 동결건조(Ilshin Freeze dryer, Korea)하여 분말 추출시료를 만들었다. 열수분말추출시료 1 g을 증류수 10 mL에 현탁시켜 현탁

액으로 만든 후, amberlite XAD-4 gel을 충전한 유지컬럼(직경, 30 mm; 길이, 300 mm)으로 정제하였다. 이때 용출액은 메탄올의 양을 증량시켜 극성을 변화시키면서 H<sub>2</sub>O(CC0), 20% 메탄올(CC20), 40% 메탄올(CC40), 60% 메탄올(CC60), 80% 메탄올(CC80) 및 100% 메탄올(CC100)으로 나누어 분획하여 감압농축 후 동결건조하여 사용하였다. 각각의 추출분획물은 10% DMSO에 1 mg/mL로 녹인 후 sonicator로 20초 동안 진탕하여 침전물 없이 모두 용해시켰다(12). 분리한 시료의 세포독성을 조사하기 위해서 세포의 배양액에 각각의 물질을 1  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL 그리고 1000  $\mu$ g/mL의 농도로 녹여 12시간 동안 배양하면서 MTT assay kit(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)을 사용하여 생성된 수용성의 formazan product를 ELISA reader로 광학적으로 측정하여 정량하였다.

### 3T3-L1 지방세포에 중성지방 축적을 증가시키는 추출분획물 탐색

혈구계산기(Haemacytometer)로 계산된  $5 \times 10^5$  cells/mL의 세포를 24 well plate의 각 well에 넣고 phosphate buffer saline(PBS)로 세척한 후 1% bovine serum albumin(BSA)을 함유하고 있는 고농도 포도당 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지에서 2일 동안 배양하였다. 배양한 후 새로운 DMEM배지로 교환하였다. 3T3-L1 섬유아세포에 DMSO(control), 10  $\mu$ g/mL 녹나무 잎 추출분획물 또는 20  $\mu$ M pioglitazone(positive control)과 분화유도물질인 0.25  $\mu$ M의 dexamethasone(DEX, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), 0.5 mM의 1-methyl-3-isobutylxanthine(IBMx, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), 10  $\mu$ g/mL의 인슐린(Sigma, St. Louis, MI, USA)과 함께 처리하여 4일 동안 분화시켰다. 다시 배지를 교환하고 분화유도물질 없이 DMSO 또는 pioglitazone 또는 녹나무 잎 추출분획물을 배지에 처리하고 6일 동안 배양하였다. 6일 째에 세포에 glycerol이 포함되어 있지 않은 lysis buffer(20 mM Tris, pH 7.4, 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 1% NP40, 10% glycerol, 12 mM  $\beta$ -glycerol phosphate와 protease inhibitors)로 용출한 후 측정된 triglyceride 함량을 Trinder kit(영동제약, 서울)로 측정하였다(12,14). 또한 상층액의 단백질 함량을 Bradford 방법을 응용하여 제조된 Bio-Rad's protein assay kit(Bio-Rad Laboratory, Hercules, California)을 사용하여 비색 정량으로 측정하였다.

### 3T3-L1 지방세포내로의 포도당 유입 정도 측정

계대 배양한 후 3T3-L1 섬유아세포를 75 cm<sup>2</sup> flask에 완전히 채워질 때까지 배양하였다. 위에서 언급하였듯이 배양 용기 바닥을 완전히 채운 지 2일 후에 유도 분화 물질을 넣어 3일 동안 배양한 후 2일에 한번씩 고농도 포도당 DMEM 용액으로 새로 바꾸어 주어 지방세포로 완전히 전환된 10~15일 사이에 포도당 유입 실험을 하였다. 배양용기에 있는

지방세포의 수를 세어( $5 \times 10^5$  cells/mL) 24 well plate의 well 을 빈 공간없이 완전히 채울 수 있도록 분주하였다. Well plate에 옮긴 지방세포를 PBS로 세척한 후 500  $\mu$ L의 1% BSA를 함유하고 있는 저농도의 포도당을 함유한 DMEM에서 12시간 이상 지난 후에 HEPES 용액으로 37°C에서 30분 동안 배양한 후 1  $\mu$ Ci/mL의 [ $^{14}$ C]2-deoxy-glucose 와 1 mM 포도당을 첨가하고 22°C에서 30분 동안 배양하여 포도당의 세포내로의 유입 정도를  $^{14}$ C이 세포내로 이동한 양으로 측정하였다(12,14). 비특이적인 포도당 유입을 배제하기 위해서 glucose transporter 4(GLUT4)의 작용을 억제하는 cyto B 와 함께 배양하였을 때의 포도당 이동량을 빼고 세포내로 유입된 포도당의 양을 측정하였다. 세포는 10 mM 포도당이 함유된 PBS으로 세척하고 소량의 lysis buffer로 세포를 용출시켜 일부를 취하여 단백질 함량을 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 비색정량으로 측정하였다. 나머지 lysis buffer에 0.5 N NaOH를 넣어  $^{14}$ C을 세포로부터 용출시키고 초산으로 중화시킨 후  $^{14}$ C의 함량을 베타 counter(Tri-Carb 2100TR, Packard Bioscience, IL)로 측정하였다(12,14).

녹나무 잎 추출분획물이 지방세포에서 세포내로의 포도당 유입에 미치는 영향을 조사하기 위해서 녹나무 잎 추출분획물을 DMSO에 1 mg/mL으로 녹인 후 이것을 PBS에 0.5  $\mu$ g/mL와 5  $\mu$ g/mL로 희석시켜 두 가지 농도에서 포도당 유입을 측정하였다. 녹나무 잎의 각 추출분획물에 인슐린 민감성제제가 함유되어 있는지의 여부를 조사하기 위해서 3T3-L1 지방세포에 인슐린 0.2 nM과 함께 각 추출분획물 또는 20  $\mu$ M pioglitazone(positive control)을 넣고 1시간 동안 배양한 후에 포도당 유입 정도를 인슐린 10 nM에서의 결과와 비교하였다. 대조군으로 인슐린 0, 1 nM 그리고 10 nM을 사용하였다. 분리한 물질이 인슐린의 작용에 관계없이 detergent로 작용하여 세포막을 파괴시켜 포도당 유입을 증가시키는 것을 배제하기 위해서 인슐린이 0 nM에서 분리한 물질과 함께 포도당 유입을 측정하였을 때 기저(basal) 값보다 높은 것은 포도당 유입을 증가시킨다고 해도 인슐린 민감성 제제로서의 작용이 없는 것으로 간주하였다.

#### 인슐린 분비능 탐색

녹나무 잎 추출물이 인슐린 분비능에 미치는 영향은 베타 세포라인인 Min6 세포를 24 well plate로 분주한 후 고농도 포도당 DMEM 배지에서 배양하여 70% confluent 되었을 때 저농도 포도당 DMEM 배지로 교환하여 16시간을 배양한다. 이 well들은 둘로 나누어 반은 저농도 포도당 Krebs Ringer Bicarbonate(KRB) 용액으로 교환하고, 나머지 반은 고농도 포도당 KRB 배지로 교환하였다. KRB 용액은 115 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.28 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 8.4%(w/v) NaHCO<sub>3</sub>(pH 7.4) 그리고 0.1% BSA로 제조하였다. 각각의 KRB 용액에 각각 DMSO, 5  $\mu$ g/mL 녹나무 추출분획물 또는 5 nM exendin-4(positive control)을 처리한 후 30분 동안 분비되

는 인슐린의 양을 배지에 함유된 인슐린 농도로 측정하였다. 인슐린 농도는 Linco 인슐린 kit(Linco Research, St. Charles)을 사용하여 radioimmunoassay방법으로 측정하였다(17).

#### In vitro $\alpha$ -glucoamylase inhibitor 탐색

$\alpha$ -glucoamylase는 50 mM sodium acetate 용액으로(pH 5.0) 5 mg/mL로 희석시키고, 기질인 dextrin은 증류수로 1 mM로 제조한 후 두용액을 1:1의 비율로 섞었다. 녹나무 잎 추출분획물은 동결건조한 것을 1 mg/mL의 농도로 DMSO로 녹이고 이것을 PBS로 희석하여 50  $\mu$ g/mL의 농도로 사용하였다. 이 반응 용액은 37°C에서 1시간 동안 배양시켰다. 1시간 후에 0.2 M NaOH로 반응을 종결시키고, NaOH와 동량의 0.2 M 초산 용액을 넣어 중화시켰다. 반응 후 생성되는 유리 포도당 양을 포도당 정량 kit(영동제약, 서울)로 측정하여  $\alpha$ -glucoamylase의 활성을 결정하였다(12,14). 대조군은 녹나무 잎 추출분획물의 용매인 DMSO만을 처리한 것에서 생성되는 유리 포도당 양으로 결정하였다. 결과는 1 unit의  $\alpha$ -glucoamylase가 1시간 동안 dextrin을 분해하여 생성하는 포도당의 양( $\mu$ g)으로 계산하였다(14).

#### 통계 처리

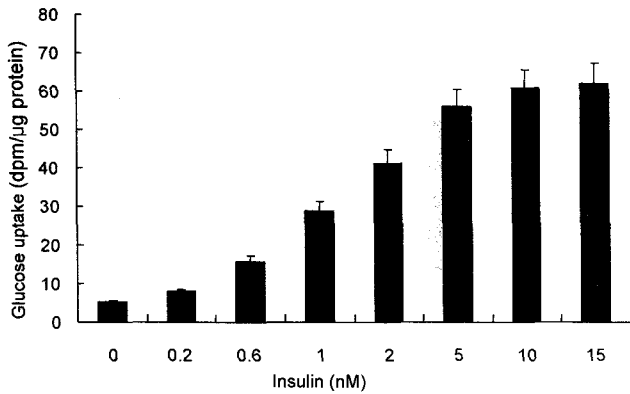
모든 결과는 네 번 반복에 대한 평균과 표준편차로 계산하여 나타내었다. 각 실험에서 녹나무 잎 추출분획물들과 대조군(control)과의 통계적 유의성은 Student *t*-test로 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 3T3-L1 지방세포에서 인슐린의 농도에 따른 포도당 유입 증가

본 연구에서 3T3-L1 지방세포에 인슐린 0 nM, 0.2 nM, 0.6 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM과 15 nM을 처리한 후 세포내로의 포도당 유입 정도를 측정하였을 때 인슐린 농도가 10 nM까지는 인슐린 농도가 증가함에 따라 포도당 유입이 증가하였고, 10 nM보다 높은 인슐린 농도에서는 인슐린 농도에 따른 세포내로의 포도당 유입에 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1). 즉, 10 nM 인슐린 농도가 인슐린 수용체를 통한 인슐린 작용을 나타내는 최대 농도로 이 농도 이하에서는 인슐린 농도에 비례하여 인슐린 작용이 증가하지만 그 이상 증가하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

최근에 제2형 당뇨병의 새로운 치료제로 등장한 것이 인슐린 작용을 향상시킴으로써 소량의 인슐린으로 혈당을 정상화할 수 있도록 도와주는 인슐린 민감성 물질들이다. 인슐린 민감성 물질은 존재하는 제2형 당뇨병의 근본적인 문제인 인슐린 저항성을 완화시켜 소량의 인슐린으로 혈당을 정상화시키고 궁극적으로 혈당에 필요한 인슐린 양을 저하시켜 고인슐린혈증을 없애 줄 수 있는 것으로 알려져 있다(1,2, 18). 즉 인슐린 민감성 물질은 당뇨병 뿐 아니라 인슐린 저항성 증후군의 증세를 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 결



**Fig. 1. Insulin-dependent glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.** After various dosages (0 nM, 0.2 nM, 0.6 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM) of insulin were treated for 30 min in 3T3-L1 adipocytes, glucose uptake was determined. The values represent the dpm of <sup>3</sup>H-glucose per mg protein of 3T3-L1 adipocytes.

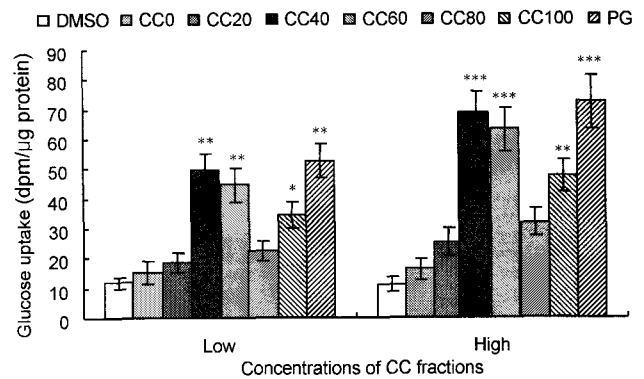
국 인슐린 저항성을 완화시킨다는 것은 인슐린이 인슐린 수용체와 결합한 후 세포내에서 일어나는 신호전달 체계가 원활하게 일어날 수 있도록 도와주어 세포에서 포도당의 이용을 향상시키는 것이다.

**녹나무 잎 추출분획물이 포도당 유입에 미치는 영향**

예비실험으로 녹나무 잎 추출분획물의 세포 독성을 조사하기 위해서 1 μg/mL~1 mg/mL의 농도에서 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 실험을 하였다. Fig. 2에서는 고농도인 1 mg/mL로 녹나무 잎 추출분획물들을 처리하였을 때 대조군인 DMSO를 처리한 것에 비해 세포 증식의 변화 정도를 퍼센트로 계산하여 녹나무 잎 추출분획물이 세포 독성을 나타내는 지에 대한 결과를 주었다(Table 1). 고농도인 1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 대조군에 비해 세포독성을 나타내지 않았다.

본 연구에서는 3T3-L1 지방세포에 소량의 인슐린인 0.2 nM과 녹나무 잎 추출분획물을 처리하였을 때 10 nM 인슐린을 처리하였을 때와 마찬가지로 포도당의 흡수를 증가시키는 지를 조사하였다. 녹나무 잎 추출분획물을 0.5 μg/mL 농도로 처리하였을 때 그 중 CC60인 60% 메탄올층에서 포도당 흡수를 효과적으로 증가시켰다. 특히 인슐린과 함께 0.5 μg/mL과 5 μg/mL의 녹나무 추출분획물을 처리하였을 때 40% 메탄올층인 CC40 그리고 60% 메탄올층인 CC60에서 포도당의 흡수를 효과적으로 증가시켰다(Fig. 2). 특히 CC40은 인슐린을 10 nM를 처리하였을 때 만큼 포도당 흡수를 증가시켰으며 인슐린 민감성 제제로 판매되고 있는 20 μM pioglitazone 정도로 인슐린-촉진에 의한 포도당 유입(insulin-stimulated glucose uptake)을 증가시켰다. 그러므로 40%와 60% 메탄올층에는 인슐린 민감성 물질을 함유할 가능성이 높음을 시사하였다.

인슐린을 첨가하지 않고 추출분획물만을 넣은 상태에서 포도당을 흡수하는 정도를 측정하였는데 그 값은 인슐린을



**Fig. 2. Effects of *Cinnamomum camphora* (CC) leaf extract fractions on glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.**

Low (0.5 μg/mL) and high levels (5 μg/mL) of fractions eluted from Amberlite XAD-4 column with 0%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100% MeOH were treated for 8 hours in 3T3-L1 adipocytes and at the end of incubation, 0.2 nM insulin were treated for 30 min to determine which fractions exhibited insulin sensitizing activity. Positive controls were pioglitazone (PG; 2 M and 20 M) plus 0.2 nM insulin. The basal state was treated with vehicle (DMSO) plus 0.2 nM insulin.

CC0~CC100: Treatment of 0.5 μg/mL and 5 μg/mL of respective 0%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100% methanol fractions of CC extracts plus 0.2 nM insulin.

PG: Treatment of 2 μM (low) and 20 μM (high) pioglitazone plus 0.2 nM insulin.

DMSO: Treatment of DMSO (solvent of CC fractions) plus 0.2 nM insulin.

\*Significantly different from DMSO treatment group at p<0.05.

\*\*Significantly different from DMSO treatment group at p<0.01.

\*\*\*Significantly different from DMSO treatment group at p<0.001.

**Table 1. Effect of *Cinnamomum camphora* (CC) leaf extract fractions on the cell proliferation of 3T3-L1 cells by MTT assay**

Sample <sup>1)</sup>	% of DMSO treatment <sup>2)</sup>
CC0	103.4±11.4 <sup>3)</sup>
CC20	98.4±13.2
CC40	101.5±10.2
CC60	97.9±11.4
CC80	105.3±11.8
CC100	98.1±11.3

<sup>1)</sup>CC0~CC100: Each of methanol 0%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100 % fractions of CC ethanol extracts by XAD-4 column.

<sup>2)</sup>The data were expressed by the percent cell proliferation in 3T3-L1 adipocytes treated with the 1 mg/mL methanol fractions based on that with the vehicle (DMSO).

<sup>3)</sup>Values are mean±SD (n=10).

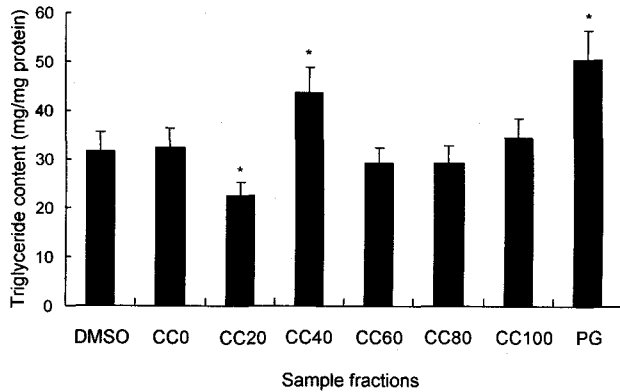
첨가하지 않고 포도당 유입을 조사한 Fig. 1의 기저값과 유사하거나 오히려 낮아 추출분획물이 세포막을 투과적으로 만드는 detergent로 작용하여 비특이적으로 포도당의 흡수를 증가시키는 것은 아니라는 것을 확인하였다. 다른 연구에서도 천연물 추출물을 처리하였을 때 인슐린 작용을 증가시켜 포도당 흡수를 증가시키는 것들이 있다고 보고하였다. Krenisky 등(19)은 페루 전통의약식물 *Otholobium pubescens*에서 bakuchiol을 분리하여 인슐린 민감성에 관여하고 있는 물질이라고 보고하였고, Hong 등(20)은 인삼, 천문동,

황금, 지골피, 황백, 맥문동으로 구성된 혼합처방이 3T3-L1 지방세포에서 포도당 흡수를 증가시켰다고 보고하고 있다.

#### 지방세포로의 분화 및 지방 축적 효과

본 연구에서는 3T3-L1 섬유아세포에서 유도 분화 물질을 첨가하여 지방세포로 분화를 유도할 때 3T3-L1 섬유아세포에 분화 유도물질과 함께 녹나무 잎 추출물을 10 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 지방세포로 분화되어 지방이 축적되는 정도를 측정하였다. 결과는 대조군인 DMSO를 처리한 것에 대한 녹나무 잎 추출분획물을 처리한 것의 백분율로 계산하여 비교하였다. 녹나무 잎 추출물 처리군 중 40% 메탄올 추출물만 대조군에 비해 지방 세포로의 전환을 증가시켰고 이것은 PPAR- $\gamma$  agonist로 알려진 pioglitazone과 유사한 정도로 증가시켰다(Fig. 3). 그러므로 녹나무 잎 추출분획물 중 40% 메탄올층은 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수도 증가시키면서 지방의 축적도 증가시키는 것으로 보아 PPAR- $\gamma$  agonist가 함유되어 있을 가능성을 시사하는 것이다. 반면에 20% 메탄올층인 CC20는 대조군에 비해 중성지방의 축적을 통계적으로 유의하게 저하시켰다(Fig. 3).

본 연구에서 사용한 3T3-L1 섬유아세포는 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있고, 인슐린과 같은 유도물질의 존재하에서는 지방세포로 분화되는 특성을 갖고 있어 분화를 촉진하는 물질인 인슐린과 유사한 물질(인슐린성 물질)의 존재 여부를 탐색하는 실험에 사용한다. 3T3-L1 섬유아세포는 인슐린, DEX와 IBMX로 조성된 분화유도물질을 첨가하였을 때 지방세포로 전환되는데(21,22), 이 기전은 아직 확실하게 알려



**Fig. 3. Effects of *Cinnamomum camphora* (CC) leaf fractions on triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes.** Fractions of *Cinnamomum camphora* (CC) leaf extracts were administered at the level of 10 µg/mL in 3T3-L1 fibroblast differentiation with differentiation inducers. After differentiation, 3T3-L1 adipocytes were continuously treated with CC fractions for 6 more days. Triglyceride contents in the adipocytes were measured at 10 days from the initiation of differentiation. PG: Pioglitazone (20 µM; commercial insulin sensitizer, PPAR- $\gamma$  agonist) was considered as a positive control. CC1~CC6: Each of methanol 0%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100% fractions of CC extracts. DMSO: Solvent of CC fractions was used as a negative control. \*Significantly different from DMSO treatment group at  $p < 0.05$ .

지지는 않았다. 알려진 기전으로는 지방세포의 분화는 지방 조직세포에 특징적으로 발현되는 유전자들의 조절부위에 작용하는 transcription factor들이 섬유아세포가 지방세포로 분화되는 과정에 발현되어 진행된다고 한다. 이 과정에 관여하는 transcription factor는 peroxisome proliferation activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), CCAAT/enhancing binding protein(C/EBP), adipocyte differentiation and determinant factor 1 그리고 sterol regulatory element binding protein 1c 등이 있다. 유도 분화물질은 이 과정에 관여하는 transcription factor들의 발현을 촉진시킴으로 섬유아세포를 지방 세포로 전환시키는 것으로 알려졌다. 특히 PPAR- $\gamma$ 는 세포의 성장을 막고 지방세포로 전환을 시작할 뿐 아니라 지방세포의 분화의 조절에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, C/EBP는 지방 조직에서 많이 발현되고 PPAR- $\gamma$ 를 도와서 전지방세포를 지방세포로 전환시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다(21-24). 그러므로 3T3-L1 fibroblast의 분화와 지방 축적을 증가시키면서 포도당 흡수를 증가시키는 물질은 PPAR- $\gamma$  agonist로 작용할 가능성이 높다고 사료된다.

#### 녹나무 잎 추출분획물의 인슐린 분비능에 미치는 영향

녹나무 잎 추출분획물이 인슐린 분비능에 미치는 영향을 조사하기 위해서 베타세포라인인 Min6 cell에 녹나무 잎 추출물을 첨가하였을 때 저농도와 고농도 포도당 배지에서 인슐린 분비 정도를 측정하였다. 녹나무 잎 추출분획물은 저농도와 고농도 포도당 배지에서 모두 인슐린 분비에 영향을 미치지 않았다(Table 2). 반면에 positive control로 5 nM exendin-4를 처리하였을 때 저농도 포도당 배지에서는 인슐린 분비를 촉진하지 않았고, 고농도포도당 배지에서는 인슐린 분비를 현저하게 증가시켰다.

인슐린 저항성이 제2형 당뇨병의 발병에 중요한 요인이자

**Table 2. Effect of *Cinnamomum camphora* (CC) leaf fractions on insulin secretion in Min6 cells** (Unit: ng/mL)

Sample <sup>1)</sup>	2 mM glucose <sup>2)</sup>	20 mM glucose
DMSO	0.54 ± 0.08 <sup>3)</sup>	3.2 ± 0.41
CC0	0.52 ± 0.09	3.6 ± 0.44
CC20	0.56 ± 0.09	3.8 ± 0.43
CC40	0.49 ± 0.08	3.4 ± 0.41
CC60	0.53 ± 0.08	4.2 ± 0.48
CC80	0.56 ± 0.08	3.8 ± 0.39
CC100	0.53 ± 0.09	3.9 ± 0.43
Exendin-4	0.59 ± 0.09	6.5 ± 0.69**

<sup>1)</sup>DMSO: The solvent of CC fractions as a negative control. CC0~CC100: Each of methanol 0%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100% fractions of CC ethanol extracts by XAD-4 column. Exendin-4: A commercially available insulinotropic agent as a positive control.

<sup>2)</sup>The data were expressed by insulin concentrations after 1 hour treatment of *Cinnamomum camphora* (CC) leaf fractions in 2 mM glucose or 20 mM glucose DMEM media.

<sup>3)</sup>Values are mean ± SD (n=10).

\*\*Significantly different from DMSO treatment group at  $p < 0.01$ .

만 인슐린 저항성이 높아지더라도 인슐린 분비가 충분하면 당뇨병으로 진전되지 않는다. 그러므로 과거에 가장 먼저 당뇨병 치료제로 사용되어 온 것이 인슐린 분비를 촉진시키는 약물들이다. 가장 먼저 사용하기 시작한 것이 sulfonyl-urea 계통의 약물로 이것은 췌장의 베타세포의 세포막에 존재하는  $K_{ATP}$  channel에 직접 작용하여 이 channel을 닫아 줌으로써 세포막의 depolarization과  $Ca^{2+}$ 이 세포내로 유입 시킴으로 인슐린의 분비를 촉진시키는 인슐린 분비 촉진제 (insulin secretagogues)이다(25,26). 그런데 이 약물의 큰 문제는 혈당 농도에 상관없이  $K_{ATP}$  channel을 닫아 줌으로써 혈당이 낮아도 인슐린의 분비시켜 저혈당을 유발시키는 단점이 있다. 그러므로 효과적인 인슐린 분비 촉진제는 고혈당에서만 인슐린 분비를 상승시키는 특성이 있어야 한다. 최근에 개발된 포도당 자극에 의한 인슐린 분비 촉진제 (glucose-stimulated insulin secretagogue)에는 glucagon like peptide-1 receptor agonist인 Exendin-4가 있는데 이것은 직접적으로  $K_{ATP}$  channel에 작용하지 않아 정상혈당에서는 인슐린 분비를 촉진시키지 않는다. Exendin-4는 세포막에 존재하는 GLP-1 receptor에 결합하여 세포내에 cAMP 농도를 상승시키고 이것은 protein kinase A(PKA)를 활성화시킨다. 활성화된 PKA만으로는 세포내로의  $Ca^{2+}$  유입을 상승시키지 못하고 혈당이 높아져 베타 세포내로 포도당이 흡수되어 glycolysis를 거쳐 ATP/ADP의 농도가 높아지면서 PKA가 활성화될 때  $Ca^{2+}$ 의 유입이 증가하여 인슐린 분비를 촉진시킨다는 것이 알려졌다(26,27). 그러므로 exendin-4는 sulfonylurea 계통의 인슐린 분비 촉진제와는 달리 고혈당에서만 인슐린 분비를 촉진시켜 혈당을 정상화시키는 효과적인 인슐린 분비 촉진제이라는 것이 보고되었다(26,27). 그러므로 본 연구에서 조사한 녹나무 잎 추출분획물은 포도당 농도에 관계 없이 인슐린 분비 촉진제로 작용하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

#### *In vitro*에서 녹나무 잎 추출분획물이 $\alpha$ -glucoamylase 활성에 미치는 영향

Table 3에는 녹나무 잎 추출분획물이  $\alpha$ -glucoamylase 활성에 작용하여 기질인 dextrin을 포도당으로 분해하는데 미치는 효과에 대한 결과를 나타내었다. 녹나무 잎의 추출분획물은 대부분 대조군과 비교하였을 때  $\alpha$ -glucoamylase의 활성에 영향을 미치지 않았다. 현재  $\alpha$ -glucoamylase 억제제로서 시판되고 있는 acarbose는 가역적으로  $\alpha$ -glucoamylase 활성을 억제시키는 약물로 주로 소장 세포의 점막에 존재하는 maltase의 활성을 억제시키는 것으로 알려졌다(28-30). Acarbose는 *in vitro*에서  $\alpha$ -glucoamylase와 maltase의 활성을 억제하는데 *in vivo*에서는 말토스 분해를 억제시키는 효과는 약하고 오히려 설탕의 분해를 강력하게 억제하는 것으로 알려졌다(28,29). 또한 경구 내당 검사를 하기 전에 acarbose를 준 후 30분 이내에 maltose나 설탕을 경구 투여

**Table 3.** The effect of *Cinnamomum camphora* (CC) leaf fractions on  $\alpha$ -glucoamylase activity

Sample <sup>1)</sup>	$\alpha$ -glucoamylase activity <sup>2)</sup> (Unit: mg glucose/unit/hr)
DMSO	5.8±0.7 <sup>3)</sup>
CC0	5.8±0.7
CC20	5.7±0.6
CC40	5.8±0.6
CC60	5.3±0.6
CC80	5.8±0.6
CC100	5.7±0.7

<sup>1)</sup>DMSO: The solvent of CC fractions as a negative control. CC0~CC100: Each of methanol 0%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100 % fractions of CC ethanol extracts by XAD-4 column.

<sup>2)</sup>The data were expressed as glucose amounts produced per a unit of  $\alpha$ -glucoamylase for 1 hour when 50  $\mu$ g/mL CC fractions were administered in the enzyme reaction of 1 mM dextrin and 0.01 unit/mL  $\alpha$ -glucoamylase.

<sup>3)</sup>Values are mean±SD (n=8).

하여 혈당을 조사하였을 때 단기간의 효과는 거의 없었고 장기간 acarbose를 공급한 후 경구 내당 검사를 한 경우는 혈당을 약 40% 감소시키는 효과가 있었다고 보고하였다(30).

결론적으로 본 연구에서 녹나무 잎 추출분획물은 인슐린 분비 촉진제와  $\alpha$ -glucoamylase 억제제로는 효과가 없었지만, 인슐린 작용을 향상시키는 인슐린 민감성제제로는 그 효과가 컸다. 특히 녹나무 잎 분획추출물을 5  $\mu$ g/mL의 농도와 인슐린 0.2 nM을 사용하였을 때 40%와 60% 메탄올 추출분획물에서 인슐린 작용을 향상시켰다. 특히 40% 메탄올 추출분획물은 3T3-L1 섬유아세포를 지방세포로 분화시켜 중성지방의 축적을 증가시키는 효과도 있는 것으로 보아 PPAR- $\gamma$  agonist가 함유되어 있을 가능성이 높다. 그러므로 녹나무 잎 추출물에는 PPAR- $\gamma$ 로 작용하는 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있어서 당뇨병 및 인슐린 저항성의 치료와 예방에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

#### 요 약

일본에서는 녹나무 줄기에서 분리한 정유의 하나인 camphor는 강심제 등 약용으로 사용하고 있지만, 녹나무 잎 추출물에 대한 연구도 적고 특히 항당뇨 효과에 대한 연구는 거의 없었다. 본 연구에서는 녹나무 잎 추출물이 *in vitro*에서 인슐린 작용, 인슐린 분비 또는 탄수화물의 소화 효과적인지를 조사함으로써 항당뇨에 효과적이지 여부를 조사하였다. 녹나무 잎을 70% 에탄올로 추출한 후 메탄올과 물을 섞은 용액으로 단계별로 XAD-4 column으로 분획하였다. 녹나무 잎 추출물은 고농도(1 mg/mL)에서도 MTT로 측정하였을 때 세포 독성을 나타내지 않았다. 녹나무 잎 추출분획물 중 40과 60% 메탄올층은 3T3-L1 지방세포에 처리하였을 때 인슐린의 작용을 향상시켜 포도당의 흡수를 증가시키는 효과가 매우 컸다. 이 추출분획물들은 3T3-L1 지방세

포에 존재하는 인슐린의 작용을 향상시켜 인슐린을 10 nM을 처리한 것보다도 효과적으로 포도당 흡수를 증가시켰다. 또한 40% 메탄올층은 3T3-L1 섬유아세포에 분화 유도물질을 처리하였을 때 PPAR- $\gamma$ 인 pioglitazone과 마찬가지로 지방 세포로의 분화를 촉진시키고 지방의 축적도 증가시켰다. 그러므로 40% 메탄올층에는 PPAR- $\gamma$  agonist로 작용하는 물질이 함유되어 있을 가능성이 높다. 배타세포라인인 Min6 세포에 녹나무 잎 추출분획물을 처리한 후 저농도와 고농도 포도당 자극시 인슐린 분비를 측정하였을 때 두 농도에서 모두 인슐린 분비에 영향을 미치지 않았다. 또한 녹나무 잎 추출분획물은 탄수화물의 소화에 작용하는 효소인  $\alpha$ -glucoamylase의 활성에 영향을 미치지 않았다. 결론적으로 녹나무 잎에는 인슐린 분비나 탄수화물의 소화에 관여하는 성분의 없지만, 인슐린 작용을 향상시키는 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있을 가능성이 높다. 특히 40% 메탄올층에는 PPAR- $\gamma$  agonist로 작용하는 인슐린 민감성 물질이 존재할 가능성이 높다.

### 감사의 글

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

### 문헌

- DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. 1992. Pathogenesis of NIDDM: A balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-353.
- Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R. 2003. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 1111-1117.
- Min HK. 1992. Clinical characteristics of Korean diabetic patients. *Korean J Diabetes* 16: 163-170.
- Kim J, Choi S, Kong B, Oh Y, Shinn S. 2001. Insulin secretion and sensitivity during oral glucose tolerance test in Korean lean elderly women. *J Korean Med Sci* 16: 592-597.
- Fineman MS, Bicsak TA, Shen LZ, Taylor K, Gaines E, Varns A, Kim D, Baron AD. 2003. Effect on glycemic control of exenatide (synthetic exendin-4) additive to existing metformin and/or sulfonylurea treatment in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26: 2370-2377.
- Tosi F, Muggeo M, Brun E, Spiazzi G, Perobelli L, Zanolin E, Gori M, Coppini A, Moghetti P. 2003. Combination treatment with metformin and glibenclamide versus single-drug therapies in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, comparative study. *Metabolism* 52: 862-867.
- Oudjeriouat N, Moreau Y, Santimone M, Svensson B, Marchis-Mouren G, Desseaux V. 2003. On the mechanism of alpha-amylase. *Eur J Biochem* 270: 3871-3879.
- Hae J. 1990. *DongEuBoGam*. NamSanDang, Seoul. p 140-142.
- Takahashi N, Kawada T, Goto T, Yamamoto T, Taimatsu A, Matsui N, Kimura K, Saito M, Hosokawa M, Miyashita K, Fushiki T. 2002. Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPARgamma and PPARalpha in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. *FEBS Lett* 514: 315-322.
- Kamei R, Kadokura M, Kitagawa Y, Hazeki O, Oikawa S. 2003. 2'-benzyloxychalcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci* 73: 2091-2099.
- Ju YS, Park S, Ko BS. 2002. Effect of insulin-like action and insulin signal transduction on 3T3-L1 adipocytes from *Coisis semen*. *Korean J Chinese Med* 23: 103-114.
- Ko BS, Kim HK, Park S. 2002. Insulin sensitizing and insulin-like effects of water extracts from *Kalopanax pictus* NAKA fractions in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J Agri Chem Biotech* 45: 42-46.
- Choi SB, 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.
- Park S, Jun DW, Park CH, Jang JS, Park SK, Ko BS, Kim BJ, Choi SB. 2004. Hypoglycemic effects of crude extracts of *Moutan Radicis Cortex*. *Korean J Food Sci* 36: 472-477.
- Choi BS, 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 Biotech Biochem* 66: 2036-2043.
- Stubbs BJ, Specht A, Brushett D. 2004. Essential oil of *Cinnamomum camphora* (L.) Nees and Eberm.-variation in oil composition throughout the tree in two chemotypes from Eastern Australia. *J Essential Oil Res* 16: 155-159.
- Ball AJ, Flatt PR, McClenaghan NH. 2000. Stimulation of insulin secretion in clonal BRIN-BD11 cells by the imidazoline derivatives KU14r and RX801080. *Pharmacol Res* 42: 575-579.
- Ciaraldi TP, Kong AP, Chu NV, Kim DD, Baxi S, Loviscach M, Plodkowski R, Reitz R, Caulfield M, Mudaliar S, Henry RR. 2002. Regulation of glucose transport and insulin signaling by troglitazone or metformin in adipose tissue of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 51: 30-36.
- Krenisky JM, Luo J, Carney JR. 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.
- Hong SJ, Fong JC, Hwang JH. 2000. Effect of crude drugs on glucose uptake in 3T3-L1 adipocyte. *Gaxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi* 16: 445-451.
- Huo H, Guo X, Hong S, Jiang M, Liu X, Liao K. 2003. Lipid rafts/caveolae are essential for insulin-like growth factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction. *J Biol Chem* 278: 11561-11569.
- Gerhold DL, Liu F, Jiang G, Li Z, Xu J, Lu M, Sachs JR, Bagchi A, Fridman A, Holder DJ, Doebber TW, Berger J, Elbrecht A, Moller DE, Zhang BB. 2002. Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferation-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology* 143: 2106-2118.
- Miki H, Yamauchi T, Suzuki R, Komeda K, Tsuchida A, Kubota N, Terauchi Y, Kamon J, Kaburagi Y, Matsui J, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kadowaki T. 2001. Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 21: 2521-2532.
- Yamamoto H, Kurebayashi S, Hirose T, Kouhara H, Kasayama S. 2002. Reduced IRS-2 and GLUT4 expression in PPAR gamma 2-induced adipocytes derived from C/EBPbeta and C/EBPdelta-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Cell Sci* 115: 3601-3607.
- Krentz AJ, Bailey CJ. 2005. Oral antidiabetic agents: current

- role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 65: 385-411.
26. Quesada I, Soria B. 2004. Intracellular location of KATP channels and sulphonylurea receptors in the pancreatic beta-cell: new targets for oral antidiabetic agents. *Curr Med Chem* 11: 2707-2716.
27. Drucker DJ. 2001. Development of glucagon-like peptide-1-based pharmaceuticals as therapeutic agents for the treatment of diabetes. *Curr Pharm Res* 7: 1399-1412.
28. Herrmann BL, Schatz H, Pfeiffer A. 1998. Continuous blood glucose monitoring: the acute effect of acarbose on blood glucose variations. *Med Klin* 93: 651-655.
29. Carrascosa JM, Molero JC, Fermin Y, Martinez C, Andres A, Satrustegui, J. 2001. Effects of chronic treatment with acarbose on glucose and lipid metabolism in obese diabetic Wistar rats. *Diabetes Obes Metab* 3: 240-248.
30. Scheen AJ. 1998. Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials. *Diabetes Metab* 24: 311-320.

(2005년 8월 18일 접수; 2005년 11월 1일 채택)