KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 38, No. 1, pp. 114~120 (2006)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

*In vitro*에서 조릿대, 연근과 연잎이 인슐린 작용 및 분비에 미치는 영향

고병섭 · 전동화[1] · 장진선[1] · 김주호[2] · 박선민[1,*]

한의학연구원, [1]호서대학교 자연과학대학, [2]아산시농촌기술센터 특화작물과

Effect of *Sasa Borealis* and White Lotus Roots and Leaves on Insulin Action and Secretion *In Vitro*

Byoung-Seob Ko[1], Dong Wha Jun[2], Jin Sun Jang[2], Ju Ho Kim[3], and Sunmin Park[2,*]

Korea Institute of Oriental Medicine, [1]Department of Food and Nutrition, Hoseo University, [2]AsanSi Agricultural Technology Development Center

Abstract Anti-diabetic effects of extracts and fractions of *Sasa borealis* (SB), white lotus roots (LR) and leaves (LL), and their mixture were determined in 3T3-L1 adipocytes and Min6 cells by investigating insulin-sensitizing activity and glucose-stimulated insulin secretion, respectively. SB, LR, LL, and mixture of SB, LR, and LL (3 : 2 : 3) were extracted using 70% ethanol, and mixture extract was fractionated by XAD-4 column chromatography with serial mixture solvents of methanol and water. Fractional extractions were utilized for anti-diabetic effect assay. SB and LR extracts increased insulin-stimulated glucose uptake, but not as much as mixture of SB, LR, and LL. Significant insulin-sensitizing activities of 20 and 80% methanol fractions of SB, LR, and LL mixture extract were observed in 3T3-L1 adipocytes, giving 0.5 or 5 μg/mL each fraction with 0.2 nM insulin to attain glucose uptake level similar to that attained by 10 nM insulin alone. Similar to pioglitazone, peroxisome proliferators-activated receptor-γ (PPAR-γ) agonist, 20 and 80% methanol fractions increased adipocytes by stimulating differentiation from fibroblasts and triglyceride synthesis. LL extract and 20, 60, and 80% methanol fractions of the mixture suppressed α-amylase activity, but did not modulate insulin secretion capacity of Min6 cells in both low and high glucose media. These data suggest 20 and 80% methanol fractions contain potential insulin sensitizers with functions similar to that of PPAR-γ agonist. Crude extract of SB, LR, and LL mixture possibly improves glucose utilization by enhancing insulin-stimulated glucose uptake and inhibiting carbohydrate digestion without affecting insulin secretion *in vivo*.

Key words: insulin sensitizer, PPAR-γ agonist, α-amylase, 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 인슐린이 분비되지만 인슐린 작용 조직에서 그 작용력이 낮아져 정상 혈당을 유지하지 못하므로 혈당이 점점 높아지고 이에 대응하여 췌장의 베타세포에서 지속적으로 인슐린이 분비되어 고인슐린혈증을 동반 한다(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 향상시킴과 동시에 인슐린 분비능도 증가시키는 것이 중요한 것으로 알려져 있다. 현재 제2형 당뇨병 치료제를 살펴보면 인슐린 분비능을 증가시키는 sulfonylurea 계통의 약물이 있고, 인슐린 작용력을 향상시키는 peroxisome proliferator activated receptor-γ(PPAR-γ) agonist인 pioglitazone과 rosiglitazone의 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 중에서는 당뇨병의 효과가 있는 것도 있지만 없는 것도 있다고 보고되고 있다. 또한 한약재에는 효과가 있는 지 없는 지도 밝혀 지지 않은 것이 아직까지 많고 특히 어떤 기전으로 혈당을 낮추는지에 대한 연구는 거의 없다. 본 연구팀은 동의보감에서 당뇨병의 처방에 많이 사용하는 90 여종의 약초들을 중심으로 먼저 3T3-L1 섬유아세포와 지방세포를 사용하여 *in vitro*에서 인슐린 민감성이나 인슐린 유사성 물질을 탐색하였다(11-14).

본 연구에서 조사한 조릿대(*Sasa borealis*(*Hack.*) *Makino*), 백련(*Nelumbo nucifera Gaertn*) 뿌리와 백련 잎은 민간 요법에서 당뇨병, 고지혈증과 고혈압 등 대사성 질환에 사용되어 왔지만 이에 대한 연구는 거의 없었다. 조릿대는 죽엽(*Bambusae folium*)이라고도 하며 벼과(Gramineae)에 속하는 대나무 속 식물의 잎이다. 조릿대는 다양한 대나무류 가운데 우리나라에 가장 흔한 종류이다. 조릿대는 암, 고열, 위 및 십이지장염, 고혈압, 당뇨병의 증세를 완화시키는 효과가 있는 것으로 알려져 민간 약재로 사용되고 있다(15,16). 백련은 연 종류 중에서도 귀한 것으로 설사, 두

*Corresponding author: Sunmin Park, Department of Food and Nutrition, Hoseo University, 165 Sechul-ri, Baebang-myun, Asan, Chungnam 336-795, Korea
Tel: 82-41-540-5633
Fax: 82-41-548-0670
E-mail: smpark@office.hoseo.ac.kr
Received September 23, 2005; accepted December 22, 2005

통, 어지럼증, 출혈 및 해독작용에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(17,18). 연의 뿌리와 잎이 약용과 식용으로 많이 사용되고 있다. 특히 연근에는 수용성 섬유질이 많아 변비 완화작용이 있으며 혈압 강하에도 효과적이라고 알려졌다. 또한 연근에는 당단백질인 뮤신이 함유되어 있고 이것은 혈압 강하 콜레스테롤 저하 작용이 있다고 밝혀졌으며 연근에 함유된 탄닌은 강력한 수렴작용이 있어 지혈 효과가 탁월하고 항산화 작용도 크다고 알려졌다(18). 연근, 연잎과 조릿대에는 대사성 질환을 완화시키는 작용이 있다는 것은 알려져 있으나 아직까지 혈당 강하 작용에 대한 보고는 없었고, 작용기전도 알려지지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 조릿대, 백련 뿌리와 백련잎의 추출물과 그 혼합물의 분획물이 인슐린 작용, 인슐린 분비능 그리고 탄수화물 소화 흡수에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 조릿대는 아산시 마곡리에서 직접 재배하였고, 백련 뿌리와 백련 잎은 아산시 신창면에 소재한 향련원(신창면, 아산)에서 재배하여 사용하였다.

시료의 조제

건조된 백련 뿌리와 백련잎 그리고 조릿대(잎과 대)를 각각 1 kg을 분쇄하여 추출하였다. 또한, 건조된 백련 뿌리와 백련잎 그리고 조릿대를 3 : 2 : 3의 비율로 섞어 1 kg을 분쇄하여 추출에 사용하였다. 분쇄된 재료는 증류수 10 L을 넣고 2 시간 열수로 2회 반복 추출한 후 거즈로 여과하고 450 × g로 원심분리(Hanil Scientific Co., Seoul, Korea)하여 상등액을 회전진공 농축기(Buchi Lab Equipment, New Castle, USA)로 35°C에서 감압농축한 후 동결건조(Ilshin Freeze dryer, Seoul, Korea)하여 분말 추출시료를 만들었다. 백련 뿌리, 백련 잎과 조릿대의 혼합물의 열수분말추출시료 1 g을 증류수 10 mL에 현탁시켜 현탁액으로 만든 후, amberlite XAD-4 gel을 충진한 유지컬럼(직경: 30 mm; 길이: 300 mm)으로 정제하였다. 이때 용출액은 메탄올의 양을 증량시켜 극성을 변화시키면서 H_2O(M1), 20% 메탄올(M2), 40% 메탄올(M3), 60% 메탄올(M4), 80% 메탄올(M5) 및 100% 메탄올(M6)로 나누어 분획하여 감압농축 후 동결건조하여 사용하였다. 각각의 분획층은 10% dimethyl sulfoxide(DMSO)에 1 mg/mL로 녹인 후 sonicator로 20초 동안 진탕하여 침전물 없이 모두 용해시켰다(12). 분리한 시료의 세포독성을 조사하기 위해서 각각의 물질을 1, 100 그리고 1,000 μg/mL의 농도로 처리한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay kit(Roche Applied Science, Indianapolis, USA)을 사용하여 생성된 수용성의 formazan product를 ELISA reader로 광학적으로 측정하여 정량하였다.

3T3-L1 지방세포에 중성지방 축적을 증가시키는 분획물 탐색

혈구계산기(Haemacytometer)로 계산된 5×10^5 cells/mL의 세포를 24 well plate의 각 well에 넣고 phosphate buffer saline(PBS)로 세척한 후 1% bovine serum albumin(BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 을 함유하고 있는 고농도 포도당 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지에서 2일 동안 배양하였다. 배양한 후 새로운 DMEM배지로 교환하였다. 3T3-L1 섬유아세포(American Type Culture Collection, Manassas, USA)에 DMSO (control), 10 μg/mL 백련 뿌리, 백련 잎과 조릿대 물추출물이나 그 혼합물의 분획물 또는 10 μM rosiglitazone (positive control; SmithKline Beecham, Cidra, USA)과 분화유도물질인 0.25 μM의 dexamethasone(DEX; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0.5 mM의 1-methyl-3-isobutylxanthine(IBMX; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 10 μg/mL의 인슐린(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)와 함께 처리하여 4일 동안 분화시켰다. 다시 배지를 교환하고 분화유도물질 없이 DMSO 또는 rosiglitazone 또는 추출물과 분획물을 처리하고 6일동안 배양하였다. 6일 째에 세포에 glycerol 이 포함되어 있지 않은 lysis buffer로 용출한 후 축적된 triglyceride 함량을 Trinder kit(영동제약, 서울, 한국)로 측정하였다(12,14). 또한 상층액의 단백질 함량을 Bio-Rad's protein assay kit(Bio-Rad Laboratory, Hercules, USA)으로 측정하였다.

3T3-L1 지방세포내로의 포도당 섭취

계대 배양한 후 3T3-L1 섬유아세포를 75 cm^2 flask에 완전히 채워질 때까지 배양하였다. 배양용기 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 섭취 실험을 하였다. 배양용기에 있는 지방세포의 수를 세어 24 well plate의 well을 빈 공간없이 완전히 채울 수 있도록 분주하였다. Well plate에 옮긴 지방세포를 PBS로 세척한 후 500 μL의 1% BSA를 함유하고 있는 저농도의 포도당을 함유한 DMEM에서 12 시간 이상 지난 후에 HEPES 용액으로 37°C에서 30분 동안 배양한 후 1 μCi/mL의 [^{14}C]2-deoxy-glucose 와 1 mM 포도당을 첨가하고 22°C에서 30분 동안 배양하여 포도당의 세포내로의 섭취 정도를 ^{14}C이 세포내로 이동한 양으로 측정하였다(12,14). 비특이적인 포도당 섭취를 배제하기 위해서 glucose transporter 4(GLUT4)의 작용을 억제하는 cyto B(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)와 함께 배양하였을 때의 포도당 이동량을 빼고 세포내로 이동한 포도당의 양을 측정하였다. 세포는 10 mM 포도당이 함유한 PBS으로 세척하고 0.5 N NaOH로 세포를 분해하였다(12,14). 분해된 세포를 초산으로 중화시키고 함유된 ^{14}C의 함량을 베타 counter(Packard Bioscience, Downers Grove, USA)로 측정하였다. 각 well의 단백질량은 PBS로 세척하고 0.5 N NaOH를 처리하기 전에 lysis buffer로 세포를 용출시킨 후에 Bio-Rad protein assay kit로 측정하였다.

백련 뿌리, 백련잎과 조릿대의 추출물과 그 혼합물의 분획물이 포도당 섭취에 미치는 영향을 조사하기 위해서 이 추출물과 분획물을 각각 DMSO에 1 mg/mL으로 녹인 후 이것을 PBS에 0.5와 5 μg/mL로 희석시켜 두 가지 농도에서 포도당 섭취를 측정하였다. 백련 뿌리, 백련잎과 조릿대의 추출물과 그 혼합물의 분획물에 인슐린 민감성제재가 함유되어 있는 지의 여부를 조사하기 위해서 3T3-L1 지방세포에 인슐린 0.2 nM과 함께 각 분획물 또는 10 μM rosiglitazone(positive control)을 넣고 1시간 동안 배양한 후에 포도당 섭취 정도를 인슐린 10 nM에서의 결과와 비교하였다. 대조군으로 인슐린 0, 0.2 그리고 10 nM을 사용하였다. 분리한 물질이 인슐린의 작용에 관계없이 detergent로 작용하여 세포막을 파괴시켜 포도당 섭취를 증가시키는 것을 배제하기 위해서 인슐린이 0 nM에서 분리한 물질과 함께 포도당 섭취를 측정하였을 때 기저(basal) 값보다 높은 것은 포도당 섭취를 증가시킨다고 해도 인슐린 민감성 제재로서의 작용이 없는 것으로 간주하였다.

인슐린 분비능 탐색

백련 뿌리, 백련잎과 조릿대의 추출물과 그 혼합물의 분획물이 인슐린 분비능에 미치는 영향은 베타세포라인인 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 $MgSO_4$, 1.28 $CaCl_2$, 1.2 KH_2PO_4, 25 mM Hepes, 8.4%(w/v) $NaHCO_3$(pH 7.4) 그리고 0.1% BSA로 제조하였다. 각각의 KRB 용액에 각각 DMSO, 5 μg/mL백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 분획물 또는 2.5 nM exendin-4 (positive control; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 처리한 후 30분 동안 분비되는 인슐린의 양을 배지에 함유된 인슐린 농도로 측정하였다. 인슐린 농도는 radioimmunoassay방법으로 Linco 인슐린 kit(Linco Research, St. Charles, USA) 을 사용하였다(19).

In vitro α-amylase inhibitor 탐색

α-amylase(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)는 50 mM sodium phosphate 용액으로(pH 6.8) 5 mg/mL로 희석시키고, 기질인 가용성 전분(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)은 증류수로 0.5%로 제조한 후 두용액을 1 : 1의 비율로 섞었다. 약물은 동결건조한 것을 1 mg/mL의 농도로 DMSO로 녹이고 이것을 PBS로 희석하여 사용하였다. 백련 뿌리, 백련잎과 조릿대의 추출물 또는 그 혼합물의 분획물은 50 μg/mL의 농도로 사용하였다. 이 반응 용액은 37°C에서 1시간 동안 배양시켰다. 1시간 후에 150 μL의 0.2 M NaOH로 반응을 종결시키고 중화하기 위해서 150 μL의 0.2 M 초산 용액을 넣어주었다. 반응 후 생성되는 유리 포도당 양을 측정하여 α-amylase의 활성을 측정하였다. 대조군은 추출물과 분획물을 녹인 용매인 DMSO만을 처리한 것에서 생성되는 유리 포도당 양으로 결정하였다. 결과는 DMSO만을 처리하였을 때 생성되는 유리 포도당 양에 비해 백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 추출물과 혼합물의 분획물을 넣었을 때 유리 포도당의 생성이 감소되는 정도를 백분율(%)로 계산하였다(14).

통계적 처리

모든 결과는 네 번 이상 반복에 대한 평균과 표준편차로 계산하여 나타내었다. 각 실험에서 백련 뿌리, 백련잎과 조릿대의 추출물과 그 혼합물의 분획물들과 대조군(control)과의 통계적 유의성은 one-way analysis of variance로 검증하였다. 각 군들 사이의 차이는 Tukey test로 검증하였다. 모든 통계 처리의 유의성 검증은 $p < 0.05$로 정하였다.

결과 및 고찰

3T3-L1 지방세포에서 인슐린의 농도에 따른 포도당 섭취 증가

본 연구에서 3T3-L1 지방세포에 인슐린 0, 0.2, 0.6, 1, 5, 10, 15 nM을 처리한 후 포도당 섭취 정도를 측정하였을 때 인슐린 농도가 10 nM까지는 인슐린 농도가 증가함에 따라 포도당 섭취가 증가하였고, 10 nM보다 높은 인슐린 농도에서는 인슐린 농도에 따른 세포내로의 포도당 섭취에 차이가 없었다(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 향상시킴으로 소량의 인슐린으로 혈당을 정상화할 수 있도록 도와주는 인슐린 민감성 물질들이다. 인슐린 민감성 물질은

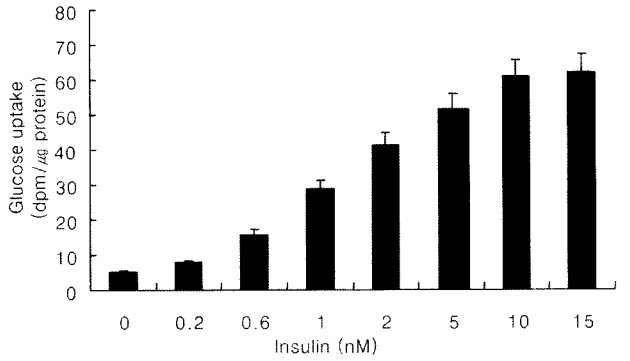

Fig. 1. Insulin-dependent glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes.

제2형 당뇨병의 근본적인 문제인 인슐린 저항성을 완화시켜 소량의 인슐린으로 혈당을 정상화시키고 궁극적으로 혈당에 필요한 인슐린 양을 저하시켜 고인슐린혈증을 없애 줄 수 있는 것으로 알려지고 있다(1,2). 즉 인슐린 민감성 물질은 당뇨병 뿐 아니라 인슐린 저항성 증후군의 증세를 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 결국 인슐린 저항성을 완화시킨다는 것은 인슐린이 인슐린 수용체와 결합한 후 세포내에서 일어나는 신호전달 체계가 원활하게 일어날 수 있도록 도와주어 세포에서 포도당의 이용을 향상시키는 것이다.

백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물과 혼합물 및 그의 분획물이 포도당 섭취에 미치는 영향

백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물과 혼합물 및 그의 분획물에 대한 세포 독성을 조사하기 위해서 1 mg/mL의 농도로 추출물과 분획물을 처리하여 MTT 실험을 하였을 때 대조군인 DMSO를 처리한 것에 비해 cell proliferation의 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2). 즉, 백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물 및 혼합물과 그 분획물은 1 mg/mL에서 세포 독성을 나타내지 않았다.

본 연구에서는 3T3-L1 지방세포에 소량의 인슐린인 0.2 nM과 백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물과 혼합물 및 그 분획물을 처리하였을 때 10 nM 인슐린을 처리하였을 때와 마찬가지로 포도당의 흡수를 증가시키는 지를 조사하였다. 이 추출물과 분획물을 0.5과 5 μg/mL 농도로 처리하였을 때 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수는 백련잎의 물 추출물은 대조군과 차이가 없었다(Fig 3A). 백련 뿌리와 조릿대 잎은 처리한 물추출물의 농도가 증가함에 따라 인슐린 촉진에 의한 포도당 흡수(insulin-stimulated glucose uptake)가 증가하였다. 조릿대 물추출물이 백련 뿌리 물

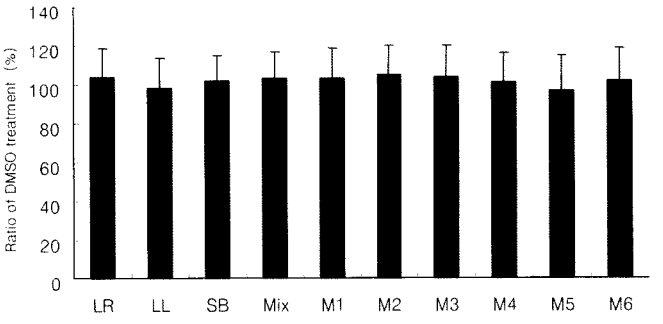

Fig. 2. Effect of *Sasa borealis* and white lotus roots and leaves extracts and the fractions of the mixture on the cell proliferation of 3T3-L1 cells by MTT assay. The data were expressed by the percent cell proliferation with the 1 mg/mL extracts and fraction treatments based on that with the vehicle (DMSO).

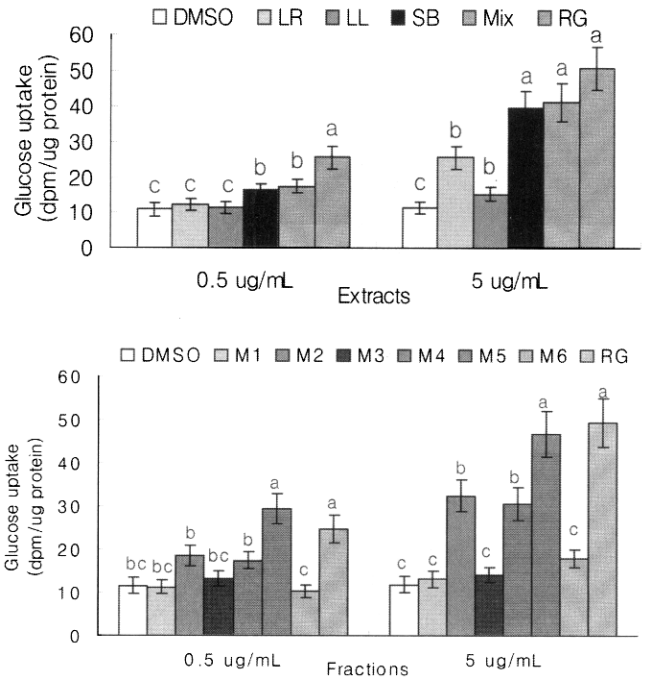

Fig. 3. Effects of *Sasa borealis* and white lotus roots and leaves extracts and the fractions of the mixture on glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. *Sasa borealis* (SB) and white lotus roots (LR) and leaves (LL) extracts and the fractions (M1-M6) of the mixture extracts (Mix) of SB, LR and LL were administered at the levels of 0.5 and 5 μg/mL in the presence of 0.2 nM insulin. Rosiglitazone (1 and 10 μM; commercial insulin sensitizer, PPAR-γ agonist) was considered as a positive control. M1-M6: 0.2 nM of insulin + each of methanol 0, 20, 40, 60, 80, and 100% fractions of the Mix. DMSO: Treatment of 0.2 nM of insulin + DMSO(solvent of M fractions). [a,b,c]Values on the same column with different superscripts (a, b, c) were significantly different at $p < 0.05$.

추출물 보다 인슐린 촉진에 의한 포도당 흡수가 현저하게 증가시켰지만, 인슐린을 10 nM 처리한 것에 비해서는 낮았다. 백련뿌리 및 백련잎과 조릿대의 혼합물의 분획물 중 M5(80% 메탄올)는 인슐린 민감성 제제로 판매되고 있는 10 μM rosiglitazone 만큼 인슐린-촉진에 의한 포도당 흡수를 증가시켰고, 이것은 인슐린 10 nM을 처리한 수준이었다. 혼합물의 분획층 중 M2(20% 메탄올)와 M4(60% 메탄올)도 포도당 흡수를 증가시켰지만, M5(80% 메탄올)의 60% 정도 수준에 머물렀다(Fig 3B). 조릿대에는 triterpene 계통의 friedelin과 glutinol과 flavonoid 계통의 isoorientin, tricine 7-O-β-D-glucopyranoside와 luteolin 6-C-α-L-arabinopyranoside가 함유되어 있다는 것이 알려져 있다(16). M5 층에는 flavonoidal glycoside인 isoorientin, tricine 7-O-β-D-glucopyranoside와 luteolin 6-C-α-L-arabinopyranoside가 함유되어 있을 가능성이 크므로 앞으로 이물질에 대한 연구를 지속할 것이다. 인슐린을 첨가하지 않고 백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 추출물이나 분획물을 처리한 상태에서 포도당의 흡수하는 정도를 측정하였는데 그 값이 기저값과 유사하거나 오히려 낮아 분획물이 세포막을 투과적으로 만드는 detergent로 작용하여 비특이적으로 포도당의 흡수를 증가시키는 것은 아니라는 것을 확인하였다(no data shown).

다른 연구에서도 천연물 추출물을 처리하였을 때 인슐린 작용을 증가시켜 포도당 흡수를 증가시키는 것들이 있다고 보고하였다. 본 연구자의 과거 연구에서한약재 중에서 율무, 상백피, 둥굴레 뿌리, 오미자, 목단피의 분획물에는 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있는 것을 발견하였다(11-14). 특히 둥굴레 뿌리 추출물은 90% 췌장을 제거한 백서에서 인슐린 민감성을 호전시킴으로 체내 포도당 이용을 증가시켜 혈당을 강하시키는 효과를 나타내었다(13). 또한, 둥굴레 뿌리에 함유되어 있는 steroidal glycosides가 90% 췌장 제거 백서에서 인슐린 민감성 물질로 작용한다는 것을 확인하였다(20). 이것은 세포 모델계에서 효과가 있는 것들 중에는 동물 실험에서도 효과적으로 인슐린 작용을 향상 시켜 포도당 흡수를 증가시키는 것들이 있다는 것을 보여 주었다. Krenisky 등(21)은 페루 전통의약식물 *Otholobium pubescens*에서 bakuchiol을 분리하여 인슐린 민감성에 관여하고 있는 물질이라고 보고하였고, Hong 등(22)은 인삼, 천문동, 황금, 지골피, 황백, 맥문동으로 구성된 혼합처방이 3T3-L1 지방세포에서 포도당 흡수를 증가시켰다고 보고하고 있다.

백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물과 혼합물의 분획물이 지방세포로의 분화와 지방 축적 효과

본 연구에서는 3T3-L1 섬유아세포에서 유도 분화 물질을 첨가하여 지방세포로 분화를 유도할 때 3T3-L1 섬유아세포에 분화유도물질과 함께 백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물이나 혼합물의 분획물을 10 μg/mL의 농도로 처리하였을 때 지방세포로의 분화되어 지방이 축적되는 정도를 측정하였다. 백련 뿌리와 조릿대 물추출물은 지방의 축적이 증가하였으나, 이것은 PPAR-γ agonist로 알려진 rosiglitazone을 처리한 것에 비해 50% 정도이었다(Fig. 4A). 혼합물의 분획층 중에서는 M2와 M5가 지방의 축적을 증가시켰고 이것은 백련 뿌리나 조릿대 물추출물에 비해서는 높았지만, rosiglitazone을 처리한 것에 비해서는 약 70% 정도이었다(Fig. 4B). M5은 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수도 증가시키면서 지방의 축적도 증가시키는 것으로 보아 이 층에는 PPAR-γ agonist가 함유되어 있을 가능성이 있다는 것을 알 수 있었다. 반면에 분획층 M4는 대조군에 비해서도 지방 축적이 낮아 M4에는 지방 축적을 저하시키는 물질이 함유되어 있다고 사료된다. 조릿대에 함유된 triterpene 계통의 friedelin과 glutinol는 M4층에는 함유되어 있을 가능성이 크므로 단일 물질에 대한 연구를 지속할 필요성이 크다고 사료된다.

본 연구에서 사용한 3T3-L1 섬유아세포는 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있고, 인슐린과 같은 유도물질의 존재하에서는 지방세포로 분화되는 특성을 갖고 있어 분화를 촉진하는 물질의 존재 여부를 탐색하는 실험에 사용된다. 3T3-L1 섬유아세포는 인슐린, DEX와 IBMX로 조성된 분화유도물질을 첨가하였을 때 지방세포로 전환되는데(23,24), 이 기전은 아직 확실하게 알려지지는 않았다. 알려진 기전으로는 지방세포의 분화는 지방 조직세포에 특징적으로 발현되는 유전자들의 조절부위에 작용하는 transcription factor들이 섬유아세포가 지방세포로 분화되는 과정에 발현되는 것이다. 이 과정에 관여하는 transcription factor는 PPAR-γ, CCAAT/enhancing binding protein(C/EBP), adipocyte differentiation and determinator factor 1(ADD1) 그리고 sterol regulatory element binding protein 1c(SREBP1c) 등이 있다. 특히 PPAR-γ는 세포의 성장을 막고 지방세포로 전환을 시작할 뿐 아니라 지방세포의 분화의 조절에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(23-26). 또한, C/EBP는 지방 조직에서 많이 발현되고 PPAR-γ를 도와서 전지방세포를 지방세포로 전환시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 이 transcription factors 중에서 인슐린 촉진 포도당 흡수를 증가시키는 동시에 지방으로의 분화를 촉진하는 transcription factor는 PPAR-γ이므로 M5에는 PPAR-γ agonist가 함유되어 있을 가능성이 있다.

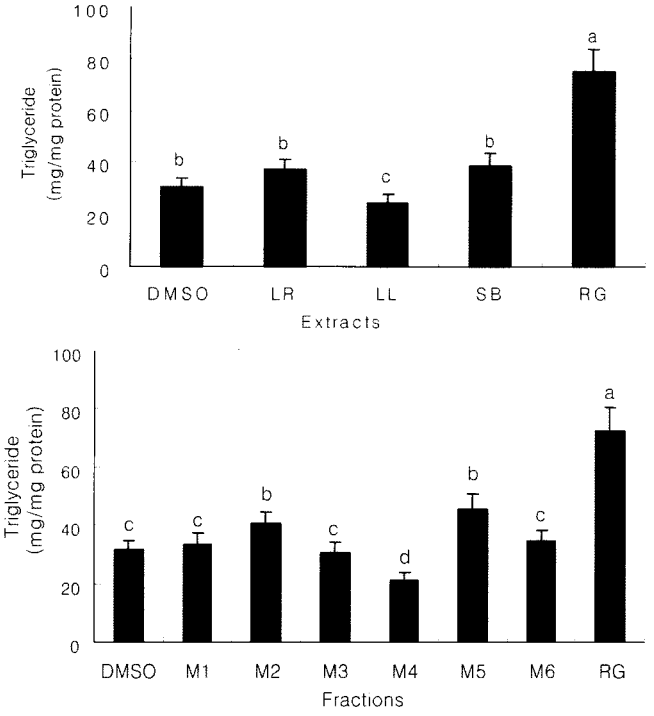

Fig. 4. Effects of *Sasa borealis* and white lotus roots and leaves extracts and the fractions of the mixture on triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *Sasa borealis* (SB) and white lotus roots (LR) and leaves (LL) extracts and the fractions (M1-M6) of the mixture extracts (Mix) of SB, LR and LL were administered at a level of 10 μg/mL in 3T3-L1 fibroblast differentiation with differentiation inducers. After differentiation, 3T3-L1 adipocytes were continuously treated with all fractions for 6 more days. Triglyceride contents in the adipocytes were measured at 10 days from the initiation of differentiation. Rosiglitazone (10 μM: commercial insulin sensitizer, PPAR-γ agonist) was considered as a positive control. M1-M6: Each of methanol 0, 20, 40, 60, 80, and 100% fraction of the Mix. DMSO: treatment of DMSO (solvent of M fractions). [a,b,c,d]Values on the same column with different superscripts (a, b, c, d) were significantly different at $p < 0.05$.

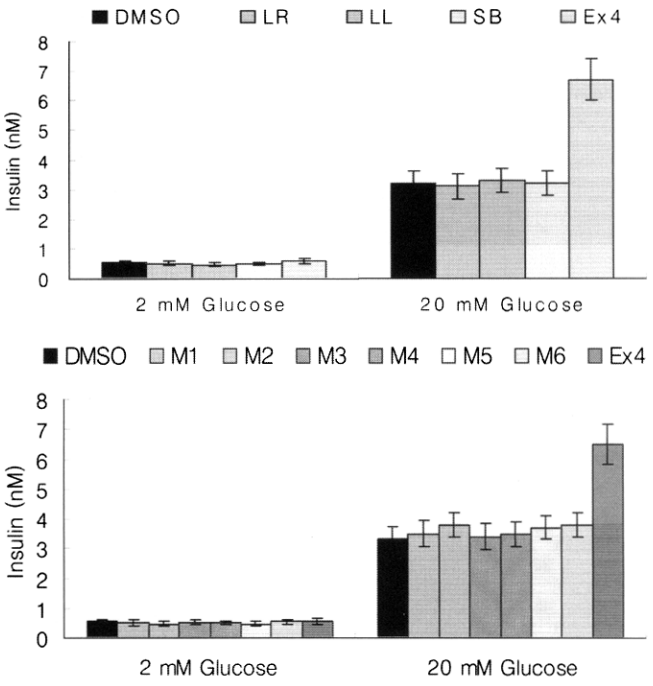

Fig. 5. Effect of *Sasa borealis* and white lotus roots and leaves extracts and the fractions of the mixture on insulin secretion in Min6 cells. *Sasa borealis* (SB) and white lotus roots (LR) and leaves (LL) extracts and the fractions of the mixture extracts (Mix) of SB, LR and LL were administered at a level of 5 μg/mL in Min6 cells in low glucose (2 mM) or high glucose (20 mM) KRB media for 1 hr. Insulin contents secreted during 1 hr incubation was determined by radioimmunoassay kit. Exendin-4 (2.5 nM; commercial insulinotropic agent) was considered as a positive control. M1-M6: Each of methanol 0, 20, 40, 60, 80, and 100% fractions of Mix extracts.

백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물과 혼합물 및 그 분획물이 인슐린 분비능에 미치는 영향

백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물과 혼합물 및 그 분획물이 인슐린 분비능에 미치는 영향을 조사하기 위해서 베타세포라인인 Min6 cell에 이 추출물과 분획물을 첨가하였을 때 저농도와 고농도 포도당 배지에서 인슐린 분비 정도를 측정하였다. 백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물(Fig. 5A)과 혼합물의 분획물(Fig. 5B)은 저농도와 고농도 포도당 배지에서 모두 인슐린 분비에 영향을 미치지 않았다. 반면에 positive control로 2.5 nM exendin-4를 처리하였을 때 저농도 포도당 배지에서는 인슐린 분비를 촉진하지 않았고, 고농도포도당 배지에서는 인슐린 분비를 현저하게 증가시켜 exendin-4가 포도당 촉진 인슐린 분비(glucose-stimulated insulin secretion)를 향상시킨다는 것을 알 수 있었다.

인슐린 저항성이 제2형 당뇨병의 발병에 중요한 요인이지만 인슐린 저항성이 높아지더라도 인슐린 분비가 충분하면 당뇨병으로 진전되지는 않는다. 그러므로 과거에 가장 먼저 당뇨병 치료제로 사용되어 온 것이 인슐린 분비를 촉진시키는 약물들이다. 가장 먼저 사용하기 시작한 것이 sulfonylurea 계통의 약물로 이것은 췌장의 베타세포의 세포막에 존재하는 K_{ATP} channel에 직접 작용하여 이 channel을 닫아 줌으로서 세포막의 depolarization과 Ca^{2+}이 세포내로 유입시킴으로 인슐린의 분비를 촉진시키는 인슐린 분비 촉진제(insulin secretagogues)이다(26,28). 그런데 이 약물의 큰 문제는 혈당 농도에 상관없이 KATP channel을 닫아 줌으로서 혈당이 낮아도 인슐린의 분비시켜 저혈당을 유발시킬 수 있다. 최근에 개발된 포도당-자극 인슐린 분비 촉진제로는 glucagon like peptide(GLP)-1 receptor agonist인 exendin-4가 있는데 이것은 직접적으로 KATP channel에 작용하지 않는다. exendin-4는 세포막에 존재하는 GLP-1 receptor에 결합하여 세포내에 cAMP 농도를 상승시키고 이것은 protein kinase A(PKA)를 활성화시킨다. 활성된 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 촉진시킨다(28,29). 그러므로 exendin-4는 혈당이 정상일 때는 인슐린 분비를 촉진시키지 않고 혈당이 상승될 때만 인슐린 분비를 촉진시키는 포도당-자극 인슐린 분비 촉진제로 작용한다.

*In vitro*에서 백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물과 혼합물 및 그 분획물이 α-amylase 활성에 미치는 영향

Fig. 6에는 백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물과 혼합물 및 그 분획물이 백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 추출물과 분획물의 추출 분획물이 α-amylase 활성에 작용하여 기질인 가용성 전분을 포도당으로 분해하는데 미치는 효과에 대한 결과를 나타내었다. 백련잎과 조릿대의 추출물은 대부분 대조군과 비교하였을 때 α-amylase의 활성을 약 11-14%를 저하시켰다. 백련 뿌리 및 백

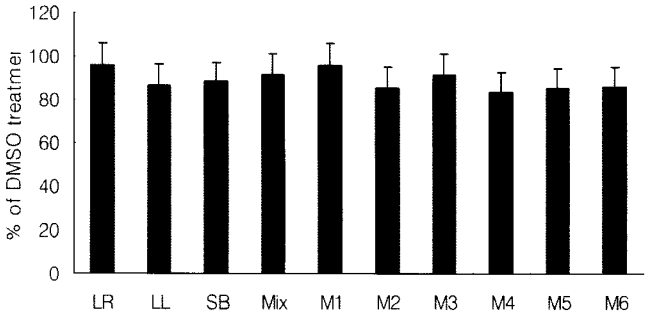

Fig. 6. The effect of *Sasa borealis* and white lotus roots and leaves extracts and the fractions of the mixture on α-amylase activity. Enzyme inhibitory activity against α-amylase was observed spectrophotometrically at pH 6.8 and 37°C using 1 mM soluble starch as a substrate and 0.01 units/mL enzyme in 50 mM phosphate saline buffer when 50 μg/mL M1-M6 fractions separated from the mixture extracts (Mix) of *Sasa borealis* (SB) and white lotus roots (LR) and leaves (LL) were administered in the enzyme reaction. The data were expressed by the percent inhibition of α-amylase by fractions based on the inhibition by the vehicle(DMSO). M1-M6: Each of methanol 0, 20, 40, 60, 80, and 100% fractions of the Mix.

련잎과 조릿대의 혼합물의 분획물 중 M2, M4, M5와 M6는 α-amylase의 활성을 약 13-17%를 감소시켰다. 현재 α-amylase 억제제로서 시판되고 있는 acarbose는 가역적으로 α-amylase 활성을 억제시키는 약물로 주로 소장 세포의 점막에 존재하는 maltase의 활성을 억제시키는 것으로 알려졌다(30-32). Acarbose는 *in vitro*에서 α-amylase와 maltase의 활성을 억제하는데 *in vivo*에서는 말토즈 분해를 억제시키는 효과는 약하고 오히려 설탕의 분해를 강력하게 억제하는 것으로 알려졌다(30,31). 또한 경구 내당 검사를 하기 전에 acarbose를 준 후 30분 이내에 maltose나 설탕을 경구 투여하여 혈당을 조사하였을 때 단기간의 효과는 거의 없었고 장기간 acarbose를 공급한 후 경구 내당 검사를 한 경우는 혈당을 약 40% 감소시키는 효과가 있었다고 보고하였다(32).

결론적으로 본 연구에서 백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 추출물과 혼합물의 분획물은 인슐린 분비 촉진제로는 효과가 없었지만, 인슐린 작용을 향상시키는 인슐린 민감성제제로는 그 효과가 컸고, 약하지만 백련잎과 혼합물은 α-amylase 억제제로 작용하는 것으로 알려졌다. 특히 백련 뿌리 및 백련잎과 조릿대의 추출물과 혼합물의 분획물을 5 μg/mL의 농도와 인슐린 0.2 nM을 사용하였을 때 백련 뿌리와 조릿대 추출물과 백련 뿌리, 백련잎과 조릿대 혼합물의 20과 80% 메탄올 분획층은 인슐린 작용을 향상시켰다. 특히 80% 메탄올 분획층은 3T3-L1 섬유아세포를 지방세포로 분화시켜 중성지방의 축적을 증가시키는 효과도 있는 것으로 보아 PPAR-γ agonist가 함유되어 있을 가능성이 높다. 그러므로 백련 뿌리와 조릿대 추출물에는 PPAR-γ agonist로 작용하는 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있어서 당뇨병 및 인슐린 저항성의 치료와 예방에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

요 약

백련 뿌리 및 잎과 조릿대는 과거부터 약용으로 사용해 왔지만 아직까지 연구도 많이 이루어지지 않았고, 항당뇨 효과에 대한 연구도 거의 없었다. 본 연구에서는 백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 추출물과 분획물이 *in vitro*에서 인슐린 작용, 인슐린 분비 또는 탄수화물의 소화에 효과적인지를 조사함으로 항당뇨에 효과적인지 여부를 조사하였다. 백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 추출물은 각각 물로 추출하여 항당뇨 효과를 조사하였다. 또한 백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 3 : 2 : 3으로 혼합하여 물로 추출한 후 이를 메탄올과 물을 섞은 용액으로 단계별로 XAD-4 column으로 분획하였다. 백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 추출물과 혼합물의 분획물은 고농도(1 mg/mL)에서도 MTT 방법으로 측정하였을 때 세포 독성을 나타내지 않았다. 백련 뿌리와 조릿대 물추출물은 인슐린 작용을 향상시키는 효능이 있었고, 백련잎 물추출물은 α-amylase를 억제하여 탄수화물의 소화 흡수를 지연시켰다. 이에 백련 뿌리 및 잎과 조릿대를 3 : 2 : 3으로 혼합하였을 때 20과 80% 메탄올층은 3T3-L1 지방세포에 처리하였을 때 인슐린의 작용을 향상시켜 포도당의 흡수를 증가시키는 효과가 인슐린을 10 nM을 처리한 것 만큼 효과적으로 포도당 흡수를 증가시켰다. 이 층에는 3T3-L1 섬유아세포에 분화 유도물질과 함께 처리하였을 때 PPAR-γ agonist인 rosiglitazone과 마찬가지로 지방 세포로의 분화를 촉진시키고 지방의 축적도 증가시켰다. 그러므로 80% 메탄올층에는 PPAR-γ agonist로 작용하는 물질이 함유되어 있을 가능성이 높다. 베타세포라인인 Min6 세포에 백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 혼합물의 분획물을 처리한 후 저농도와 고농도 포도당 자극시 인슐린 분비를 측정하였을 때 두 농도에서 모두 인슐린 분비에 영향을 미치지 않았다. 또한 백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 혼합물의 20, 60과 80% 메탄올 분획층은 탄수화물의 소화에 작용하는 효소인 α-amylase의 활성을 16% 정도를 억제하는 효과가 있었다. 결론적으로 백련 뿌리 및 잎과 조릿대의 추출물과 분획물에는 인슐린 분비나 탄수화물의 소화에 관여하는 성분의 없지만, 인슐린 작용을 향상시키는 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있을 가능성이 높다.

감사의 글

본 연구는 호서대학교 산학협력단에서 연구비를 지원하여 수행하였습니다.

문 헌

1. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM: A balanced overview. Diabetes Care 15: 318-353 (1992)
2. Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. Exp. Biol. Med. (Maywood) 228: 1111-1117 (2003)
3. Min HK. Clinical characteristics of Korean diabetic patients. Korean J. Diabetes 16: 163-170 (1992)
4. Kim J, Choi S, Kong B, Oh Y, Shinn S. Insulin secretion and sensitivity during oral glucose tolerance test in Korean lean elderly women. J. Korean Med. Sci. 16: 592-597 (2001)
5. Fineman MS, Bicsak TA, Shen LZ, Taylor K, Gaines E, Varns A, Kim D, Baron AD. 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 (2003)
6. Tosi F, Muggeo M, Brun E, Spiazzi G, Perobelli L, Zanolin E, Gori M, Coppini A, Moghetti P. 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 (2003)
7. Oudjeriouat N, Moreau Y, Santimone M, Svensson B, Marchis-Mouren G, Desseaux V. On the mechanism of alpha-amylase. Eur. J. Biochem. 270: 3871-3879 (2003)
8. Hae J. DongEuBoGam. NamSanDang, Seoul, Korea. pp. 140-142 (1990)
9. Takahashi N, Kawada T, Goto T, Yamamoto T, Taimatsu A, Mat-

sui N, Kimura K, Saito M, Hosokawa M, Miyashita K, Fushiki T. Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR-r and PPAR-a in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. FEBS Lett. 514: 315-322 (2002)
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. Ju YS, Park S, Ko BS. Effect of Insulin-like Action and Insulin Signal Transduction on 3T3-L1 Adipocytes from Coisis Semen. Korean J. Chinese Med. 23: 103-114 (2002)
12. Ko BS, Kim HK, Park S. Insulin sensitizing and insulin-like effects of water extracts from Kalopanax pictus NAKA fractions in 3T3-L1 adipocytes. Korean J. Agric. Chem. Biotech. 45: 42-46 (2002)
13. Choi SB, Park S. The effects of water extract of Polygonatum Odoratum (Mill) Druce on insulin resistance in 90% pancreatectomized rats. J. Food Sci. 67: 2375-2379 (2002)
14. Park S, Jun DW, Park CH, Jang JS, Park SK, Ko BS, Kim BJ, Choi SB. Hypoglycemic effects of crude extracts of Moutan Radicis Cortex. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 472-477 (2004)
15. Lee MJ, Moon GS. Antioxidative effects of Korean bamboo trees, Wang-dae, Som-dae, Maengjong-juk, Jolit-dae, O-juk. Korean J. Food Sci. Technol. 35:1226-1232 (2003)
16. Yoon KD, Kim CY, Huh H. The flavone glycosides of *Sasa Borealis*. Korean J. Pharmacogn. 31:224-227 (2000)
17. Xiao JH, Zhang JH, Chen HL, Feng XL, Wang JL. Inhibitory effects of isoliensinine on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Planta Med. 71: 225-230 (2005)
18. Ling ZQ, Xie BJ, Yang EL. Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of Nelumbo nucifera Gaertn. J. Agric. Food Chem. 53: 2441-2445 (2005)
19. Ball AJ, Flatt PR, McClenaghan NH. Stimulation of insulin secretion in clonal BRIN-BD11 cells by the imidazoline derivatives KU14r and RX801080. Pharmacol. Res. 42: 575-579 (2000)
20. Choi BS, Park S. 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 (2002)
21. Krenisky JM, Luo J, Carney JR. Isolation and antihyperglycemic activity of bakuchiol from Otholobium pubsecens (Fabaceae), a peruvian medicinal plant used for the treatment of diabetes. Biol. Pharm. Bull. 22: 1137-1140 (1999)
22. Hong SJ, Fong JC. Hwang JH. Effect of crude drugs on glucose uptake in 3T3-L1 adipocyte. Gaxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi 16: 445-451(2000)
23. Huo H, Guo X, Hong S, Jiang M, Liu X, Liao K. 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 (2003)
24. 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. Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferation-activated receptor-gamma agonists. Endocrinology 143: 2106-2118 (2002)
25. 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. Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. Mol. Cell Biol. 21: 2521-2532 (2001)
26. Yamamoto H, Kurebayashi S, Hirose T, Kouhara H, Kasayama S. 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 (2002)
27. Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. Drugs 65: 385-411 (2005)
28. Quesada I, Soria B. 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 (2004)
29. Drucker DJ. Development of glucagon-like peptide-1-based pharmaceuticals as therapeutic agents for the treatment of diabetes. Curr. Pharm. Res. 7: 1399-1412 (2001)
30. Herrmann BL, Schatz H, Pfeiffer A. Continuous blood glucose monitoring: the acute effect of acarbose on blood glucose variations. Med. Klin. 93: 651-655 (1998)
31. Carrascosa JM, Molero JC, Fermin Y, Martinez C, Andres A, Satrustegui, J. Effects of chronic treatment with acarbose on glucose and lipid metabolism in obese diabetic Wistar rats. Diabetes Obes. Metab. 3: 240-248 (2001)
32. Scheen AJ. Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials. Diabetes Metab. 24: 311-320 (1998)