

In vitro에서 길경 추출 분획물의 항당뇨 효과 조사

고병섭¹ · 권대영² · 홍상미³ · 박선민^{3,4,*}

한의학 연구원 한약품질 검사팀¹, 한국식품연구원 기능성연구부²,
호서대학교 자연과학대학 식품영양학과³, 기초과학연구소⁴

In vitro Anti-diabetic Effects of Crude Extracts of Platycodi Radix

Byoung Seob Ko¹, Dae Young Kwon², Sang Mee Hong³, and Sunmin Park^{3,4,*}

¹Herbal Quality Control Team, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, Korea

²Food Functional Research Division, Korean Food Research Institutes

³Department of Food and Nutrition, ⁴Institute of Basic Sciences, Hoseo University

Abstract Anti-diabetic effect of Platycodi radix (PR) extract fractions was determined *in vitro* by investigating insulin-like action, insulin sensitizing action, glucose-stimulated insulin secretion, gene expression related to β -cell function and mass, and α -glucoamylase suppressing action. Insulin-like activity was not promoted by the treatment of PR methanol fractions in 3T3-L1 fibroblast. However, treatment with 0, 20 and 100% PR methanol fractions along with 1 ng/mL insulin increased insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. In addition, the treatment of 0% and 100% methanol fractions along with differentiation inducers significantly increased the differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. These fractions may contain insulin sensitizer. The 20%, 80% and 100% methanol fractions enhanced glucose-stimulated insulin secretion in Min6 cells, insulin secreting cell line. This was related to the mechanism to promote glucose sensing and β -cell proliferation, which was regulated by the induction of IRS-2, glucokinase and PDX-1 genes. As expected, 20, 80 and 100% methanol fractions increased mRNA levels of IRS-2, glucokinase and PDX-1 genes. However, PR fractions did not affect the α -glucoamylase activity *in vitro*. These data suggested that PR extract fractions have anti-diabetic actions through improving insulin sensitization, glucose-stimulated insulin secretion, and β -cell proliferation. Therefore, PR extracts can be beneficial for anti-diabetic treatment in lean diabetic patients.

Key words: 3T3-L1 adipocyte, insulin sensitizer, IRS2, PDX-1, glucokinase

서 론

우리나라에서 발생하는 당뇨병의 98% 이상을 차지하는 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성과 인슐린 분비능의 조화가 깨어질 때 나타나는 질병이다. 근육, 간 그리고 지방조직에서 인슐린 작용이 저하되어 인슐린 저항성이 나타날 때 췌장의 베타세포가 인슐린 저항성을 극복할 수 있을 만큼 인슐린을 분비하여야 정상혈당을 유지할 수 있다(1,2). 반면에, 인슐린 저항성을 극복할 수 있을 만큼 인슐린이 분비되지 않을 때 당뇨병이 유발된다(1,2). 서구인은 주로 비만을 동반하며 인슐린 저항성이 나타나는 초기에는 이를 극복할 수 있을 만큼 인슐린을 분비하여 고인슐린혈증을 유발하지만 당뇨병으로 진전되지는 않는다. 인슐린 저항성이 증가한 상태가 지속적으로 유지되면 인슐린 분비가 인슐린 저항성을 따라가지 못하여 당뇨병으로 진전된다(1,3). 그러나 우리나라를 비롯한 아시아인들은 인슐린 저항성이 증가할 때 서구인에 비해 인슐린 분비를 향상시키지 못해 서구인에 비해 당뇨병으로의 진전이

빠르고 그 증세도 심한 특징을 가지고 있다(4,5). 그러므로 우리나라의 제2형 당뇨병을 치료함에 있어서 인슐린 작용력을 향상 시키고 동시에 인슐린 분비능도 증가시키는 것이 중요한 것으로 알려져 있다.

제2형 당뇨병의 치료제로 사용되고 있는 것 중에는 인슐린 작용을 향상시켜 소량의 인슐린으로 혈당을 정상화시킬 수 있도록 도와주는 것이 있는데 이것이 인슐린 민감성 약제이다. 인슐린 민감성 물질은 제2형 당뇨병의 근본적인 문제인 인슐린 저항성을 완화시켜 소량의 인슐린으로 혈당을 정상화시키고 궁극적으로 정상 혈당을 유지하는데 필요한 인슐린 양을 저하시켜 고인슐린혈증을 없애 준다. 이것은 인슐린 저항성이 증가할 때 인슐린 분비 부족을 나타내는 걸리는 기간을 지연시켜 당뇨병의 유발이나 병세의 악화를 지연시켜 준다(6,7). 더욱이, 인슐린 민감성 물질은 당뇨병 뿐 아니라 인슐린 저항성 증후군의 증세를 완화시킬 수 있다고 보고되었다(8). 결국 인슐린 저항성을 완화시킨다는 것은 인슐린이 인슐린 수용체와 결합한 후 세포내에서 일어나는 신호전달 체계가 원활하게 일어날 수 있도록 도와주어 세포에서 포도당의 이용을 향상시키는 것이다. 이러한 인슐린 민감성 약제는 rosiglitazone이 있으며, 이것은 peroxisome proliferation activated receptor- γ (PPAR- γ) agonist로서 지방세포와 근육과 같은 인슐린에 민감한 세포에 작용하여 포도당 흡수가 증가하여 혈당을 강하시킨다는 것이 알려졌다.

최근 연구 결과에 따르면(9-11) 이러한 포도당 자극에 의한 인

*Corresponding author: Sunmin Park, Department of Food and Nutrition, Institute of Basic Sciences, Hoseo University, 165 Sechul-ri Baebangl-myun Asan-si, Changchung 336-795, Korea
Tel: 82-41-540-5633
Fax: 82-41-548-0670
E-mail: smpark@office.hoseo.ac.kr

Received September 12, 2007; accepted October 23, 2007

술린 분비의 장애는 췌장의 베타세포의 양과 밀접한 관련이 있고, 인슐린을 분비할 수 있을 만큼 베타세포가 충분히 증식하지 못할 때 나타난다고 하였다. 또한, 베타세포의 인슐린/insulin-like growth factor-I(IGF-I) 신호 전달이 향상될 때 베타세포의 증식이 증가하고 세포사멸(apoptosis)이 감소하여 베타세포의 양이 증가한다는 것이 알려졌다(9,11). 베타세포의 인슐린/IGF-1 신호전달은 insulin receptor substrate(IRS)-2의 발현의 증가와 밀접한 관련이 있으며 glucagon-like peptide-1(GLP-1) receptor agonist인 exenatide는 IRS-2의 발현을 증가시켜 insulin/IGF-1 신호전달을 향상시켜 베타세포의 양을 증가시킨다는 것이 보고되었다(12).

우리나라를 비롯한 아시아의 여러나라에서는 민간요법으로 여러 가지 약초들을 당뇨병 및 여러 질병의 치료제로 사용하여 왔다. 그러나 민간요법에서 당뇨병 치료에 사용되고 있는 한약재 중에서도 아직까지 항당뇨 효과가 밝혀진 것은 많지 않고, 특히 어떤 기전으로 혈당을 낮추는지에 대한 연구는 많이 수행되지 않았다. 본 연구팀은 동의보감에서 당뇨병의 처방에 많이 사용하는 100여 종의 약초들을 중심으로 *in vitro*에서 항당뇨 특성을 가진 약재를 탐색하였다. 본 연구팀이 연구한 한약재 중에서 대황, 맥문동, 등굴레 뿌리의 분획물에는 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있는 것을 발견하였다(13-16). 이러한 탐색 연구 중 인슐린 민감성 물질을 함유하고 있을 가능성을 발견한 것이 길경이어서 이에 길경은 초롱꽃과(*Campanulaceae*)에 속하는 다년생식물인 도라지(balloon flower, *Platycodon grandiflorum*)의 뿌리로서 통상적으로 2-3년 근을 식용 또는 약용으로 사용한다. 주로 진해, 거담 등의 목적으로 사용되어 왔으며 최근 들어 중추신경억제작용(진정, 진통, 해열효과), 항염증작용, 항 궤양 및 위액분비억제작용, 항콜린작용, 혈당강화작용, 항비만 작용, 콜레스테롤 대사 개선 작용, 간 손상 억제작용, 복강 거식세포 활성 증강 및 면역 활성 증가 등 다양한 활성이 보고되어 있다(17-19). 길경의 함유성분으로는 platycodigenin, polygalacic acid 등 oleanane계 triterpene을 aglycone으로 한 20여 종의 사포닌 1-4% 정도 함유되어 있으며 이들 사포닌 성분들은 길경 추출물이 보여주는 다양한 약리작용을 나타내는 활성성분으로 주목 받고 있다. 길경은 중국산과 한국산에 함유되어 있는 사포닌들의 양에 차이가 있으며, 중국산에는 사포닌의 대부분이 platycodin D이고, 한국산에는 platycodin D, platycoside E, polygalacin D2, platycodin D3, platycodin D2 등이 많이 함유되어 있다(20). 그러므로 본 연구에서는 한국산 길경 추출물이 인슐린 작용을 향상시키는 인슐린 민감성 효과, 인슐린처럼 작용하는 인슐린성 물질로서의 효과, 포도당 자극에 의한 인슐린 분비능, 베타세포에서의 IRS-2 발현, 그리고 α -glucosylase의 억제제로의 효과가 있는 지 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 길경은 한국산 *Platycodon grandiflorum*의 뿌리(*Platycodi radix*)로 서울 경동시장에서 2003년 10월에 구입한 후 한국한의학연구원에서 엄격하게 감별하고 선정한 것을 사용하였고, 일련 번호를 붙이고 한국한의학연구원 표본실에 보관하고 있다.

시료의 조제

길경 1 kg에 70% 에탄올 10 L을 넣고 2 시간 열수로 2회 반복 추출한 후 거즈로 여과하고 450 × g로 원심분리(Megafuge 1.0R, Waltham, MA, USA)하여 상등액을 회전진공 농축기(Buchi R-114, Haverhill, MA, USA)로 35°C에서 감압농축한 후 동결건조(Ilshin

Freeze dryer, Yangju-si, Korea)하여 분말 추출시료를 만들었다. 열수분말추출시료 1 g을 증류수 10 mL에 현탁시켜 현탁액으로 만든 후, amberlite XAD-4 gel을 충전한 유지컬럼(직경: 30 mm; 길이: 300 mm)으로 정제하였다. 이때 용출액은 메탄올의 양을 증량시켜 극성을 변화시키면서 H₂O(PR1), 20% 메탄올(PR2), 40% 메탄올(PR3), 60% 메탄올(PR4), 80% 메탄올(PR5), 및 100% 메탄올(PR6)으로 나누어 분획하여 감압농축 후 동결건조하여 사용하였다. 각각의 분획층은 10% DMSO에 1 mg/mL로 녹인 후 sonicator로 20초 동안 진탕하여 침전물 없이 모두 용해시켰다. 열수분말추출물 1 g에서 PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, PR6를 각각 286, 121, 310, 118, 108, 57 mg를 획득하였다.

인슐린성 물질 탐색 실험

3T3-L1 섬유아세포(ATCC, Manassas, VA, USA) 75 cm² flask에 완전히 채워질 때까지 배양하였다. 이 세포를 trypsin처리하여 flask에서 떼어 낸 후 혈구계산기(haemocytometer)로 계산된 5 × 10³ 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 유도분화물질 중 인슐린(10 µg/mL)을 제외한 0.25 µM의 dexamethasone(DEX, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 0.5 mM의 1-methyl-3-isobutylxanthine(IBMx, Sigma-Aldrich)와 함께 길경 분획물을 각각 100 µg/mL 첨가하여 5일간 배양하였다. 이때 DMEM을 2일에 한번씩 교환하였다. 길경의 분획물에 인슐린성 물질이 함유되어 있는 지 여부는 5일 동안 배양한 후에 생성된 중성 지방 양을 측정하여 3T3-L1 섬유아세포가 지방세포로 분화되는 정도를 측정하였다. 중성지방의 농도는 중성 지방 측정 kit(Young Dong Pharm., Seoul, Korea)로 측정하였다. 대조군은 길경 분획층을 용해시킨 용매인 DMSO를 길경 분획물 대신 첨가하여 배양하였다.

지방세포내로의 포도당 흡수 실험

계대 배양한 후 3T3-L1 섬유아세포가 75 cm² flask에 완전히 채워질 때까지 배양하였다. 배양용기 바닥을 완전히 채운 지 2일 후에 유도 분화 물질을 넣어 3일 동안 배양한 후 2일에 한번씩 10% FBS를 함유한 고농도 포도당 DMEM 용액으로 교환하면서 지방세포로 완전히 전환된 10-15일 사이에 포도당 흡수 실험을 할 수 있도록 24 well plate로 옮겨 주었다. 옮길 때는 trypsin으로 세포를 떼어 낸 후 지방세포의 수를 계산하여 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 12시간 이상 지난 후에 HEPES 용액으로 37°C에서 30분 동안 배양한 후 1 µCi/mL의 [¹⁴C]2-deoxy-glucose와 1 mM 포도당을 첨가하고 22°C에서 30분 동안 배양하여 포도당의 세포내로의 흡수 정도를 [¹⁴C]이 세포내로 이동한 양으로 측정하였다. 비특이적인 포도당 흡수를 배제하기 위해서 glucose transporter-4(GLUT-4)의 작용을 억제하는 cyto B와 함께 배양하였을 때의 포도당 이동량을 빼고 세포내로 이동한 포도당의 양을 측정하였다. 세포는 10 mM 포도당이 함유한 PBS으로 세척하고 0.5 N NaOH로 세포를 분해하였다(16). 분해된 세포를 초산으로 중화시키고 함유된 [¹⁴C]의 함량을 베타 counter(Tri-Carb 2100TR, Packard Bioscience, IL, USA)로 dpm을 측정하였다. 이때 well에 함유된 세포의 양을 표준화하기 위해서 샘플당 1 well은 lysis buffer로 용해시켜 단백질 측정 kit(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 측정하였다.

길경 추출물 분획이 포도당 흡수에 미치는 영향을 조사하기 위해서 길경 추출물 분획을 DMSO에 1 mg/mL로 녹인 후 이것을 PBS에 0.5와 5 µg/mL로 희석시켜 두 가지 농도에서 포도당 흡수 정도를 측정하였다. 길경의 각 분획에 인슐린 민감성 제제가 함유되어 있는지의 여부를 조사하기 위해서 3T3-L1 지방세포에 인슐린 1 ng/mL과 함께 각 분획을 넣고 1시간 동안 배양한 후에 포도당 흡수 정도를 인슐린 50 ng/mL을 처리한 결과와 비교하였다. 대조군으로 인슐린 0, 1 그리고 50 ng/mL을 사용하였고, 모든 실험은 3회 반복하였다. 처리한 분획층이 인슐린의 작용에 관계없이 detergent로 작용하여 세포막을 파괴시켜 포도당 흡수를 증가시키는 것을 배제하기 위해서 인슐린이 0 ng/mL에서 분리한 물질과 함께 포도당 흡수를 측정하였을 때 기저(basal) 값보다 높은 것은 포도당 흡수를 증가시킨다고 해도 인슐린 민감성 제재로서의 작용이 없는 것으로 간주하였다(13,14).

포도당 자극에 의한 인슐린 분비

Min6 세포를 24 well plate로 옮긴 후 70% confluent할 때 저농도 포도당-serum free glucose DMEM 용액에서 10시간 동안 배양시킨 후 길경 분획물을 처리하고 6시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS 용액으로 세척한 후 길경 분획물을 포함한 저농도 (5 mM) 포도당 Krebs-Ringer bicarbonate(KRB) 용액에서 1시간 동안 배양시킨 후 용액을 채취하였다. 다시 PBS 용액으로 세척하고 길경 분획물과 함께 고농도(20 mM) 포도당 KRB 용액에서 1시간 동안 배양한 후 용액을 채취하였다. 채취한 용액으로부터 인슐린 농도를 RIA kit(Linco Research, Billerica, MA, USA)로 측정하였다.

IRS-2, PDX-1과 glucokinase의 mRNA levels

인슐린을 분비하는 세포인 Min6 세포에서 IRS2 발현의 증가 여부와 베타세포의 기능과 밀접한 관련이 있는 glucokinase와 베타세포의 증식에 관여하는 PDX-1의 발현을 real-time RT-PCR 방법으로 측정하였다. 길경 분획물을 Min6 세포에 8시간 동안 처리한 후 PBS로 세척하고, total RNA를 Trizol 용액(Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA)을 이용하여 분리하였다. cDNA는 분리한 total RNA에 oligo dT primer로 사용하여 RETROscript kit(Ambion Inc., Austin, TX, USA)으로 합성하였다. QuantiTect SYBR Green PCR kit(Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 사용하여 quantitative real-time PCR를 iCycler PCR instrument(Bio-Rad Laboratories)에서 수행하여 IRS2, glucokinase와 PDX-1의 발현의 변화를 조사하였다. PCR 결과로부터 각각의 유전자의 상대적인 정량분석은 internal control인 cyclophilin에 대한 조사하고자 하는 유전자의 PCR의 생성물의 비로 계산하였다.

In vitro α-glucoamylase 실험

α-glucoamylase는 50 mM sodium acetate 용액으로(pH 5.0) 5 mg/mL로 희석시키고, 기질인 맥아당 20 mg/mL로 증류수에 녹인 후 1:1의 비율로 섞었다. 약물은 동결건조한 것을 1 mg/mL의 농도로 DMSO로 녹이고 이것을 PBS로 희석하여 사용하였다. 길경 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-glucoamylase의 활성을 측정하였다. 대조군은 길경 분획층의 용매인 DMSO만을 처리한 것에서 생성되는 유리 포도당 양으로 결정하였다. 결과는 DMSO만을 처리하였을 때 생성되는 유리 포도

당 양에 비해 길경 분획층을 넣었을 때 유리 포도당의 생성이 감소되는 정도를 백분율(%)로 계산하였다.

통계 분석

모든 결과는 세 번 반복에 대한 평균과 표준편차로 계산하여 나타내었다. 다양한 parameter에서 길경 추출 분획물의 효과는 one-way ANOVA방법으로 통계적 유의성을 검증하였다. 각 군사이의 평균값의 유의적 차이는 Tukey test로 검증하였다. Positive control군은 DMSO과의 차이를 two-sample t-test로 검증하였다. 모든 통계 처리의 유의성 검증은 p < 0.05로 정하였다.

결과 및 고찰

지방세포 3T3-L1에서 인슐린의 농도에 따른 포도당 흡수 증가 Fig. 1에서 보여 준 것처럼 3T3-L1 지방세포에 처리한 인슐린 농도가 50 ng/mL까지는 인슐린 농도는 높아짐에 따라 포도당 흡수가 증가하였으나, 그 이상의 인슐린 농도에서는 포도당 흡수가 더 이상 증가하지 않았다. 즉, 50 ng/mL 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. 그러므로 저농도의 인슐린과 탐색하고자 하는 물질을 처리하였을 때 포도당의 흡수가 현저하게 증가하는 경우는 처리한 물질을 인슐린 민감성 물질로 간주할 수 있다.

본 연구에서 인슐린 민감성 물질을 탐색하는데 3T3-L1 지방세포를 사용한 이유는 3T3-L1 지방세포는 in vivo에 존재하는 대사성 피이드백 루프에 관련된 복잡한 문제와 연루되어 있지 않으면서 인슐린 수용체와 GLUT4를 세포막에 가지고 있어 인슐린에 민감하게 반응하기 때문이다. 인슐린을 처리하면 3T3-L1 지방세포의 세포막에 인슐린이 결합하고 이것은 일련의 인슐린 신호전달체계인 IRS-1 → PI3 kinase → Akt의 과정을 증폭시킨다. 이 결과로 GLUT-4가 세포막으로 translocation되는 것이 증가하게 되어 포도당의 흡수를 증가시킨다고 알려졌다(6,7,14). 그러므로 3T3-L1 지방 세포는 인슐린의 작용력을 향상시키는 물질을 탐색하거나 인슐린 신호전달체계를 연구하는 모델로 적합하다고 사료된다.

길경 추출 분획물이 포도당 흡수에 미치는 영향

본 연구에서는 3T3-L1 지방세포에 소량의 인슐린인 1 ng/mL과 길경 분획물들을 처리하였을 때 50 ng/mL 인슐린을 처리한 것과 같은 정도로 포도당의 흡수를 증가시키는 지를 조사하였다. 저농도(0.5 µg/mL)와 고농도(5 µg/mL)의 길경 분획물을 처리하였을 때

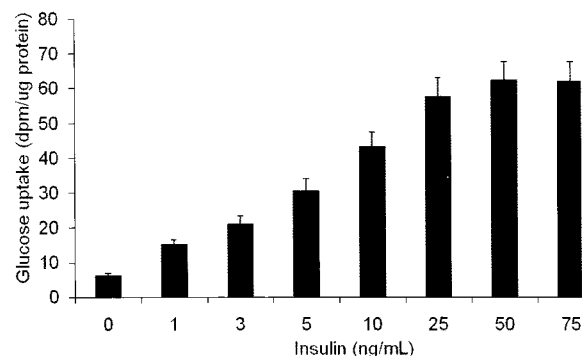


Fig. 1. Insulin-dependent glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. The data given are means ± SD of triplicate measurements.

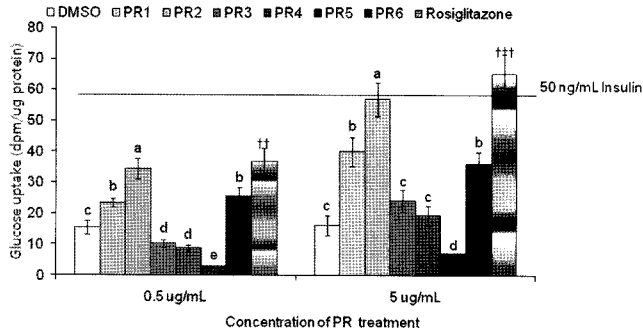


Fig. 2. Effects of Platycodi radix (PR) extract fractions on insulin-stimulated glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. The PR extract fractions were treated in 3T3-L1 adipocytes with at a level of 0.5 and 5 $\mu\text{g/mL}$ in the presence of 1 ng/mL insulin. The two levels of rosiglitazone (2 μM and 20 μM) as a positive control were treated with along with 1 ng/mL insulin. The data given are means \pm SD of triplicate measurements. PR1-PR6: 1 ng of insulin + each of PR1-PR6. DMSO: treatment of 1 ng of insulin + DMSO (solvent of PR). ^{a,b,c,d,e} Values on the bars with different superscripts (a, b, c, d) were significantly different at $p < 0.05$ by Tukey test. ^{**}Significantly different from the control (DMSO-treated) group in two-sample t-test at $p < 0.01$. ^{***} at $p < 0.001$.

모두 PR1, PR2와 PR6가 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수를 증가시켰다. 이 세 분획층에서 모두 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 분획층을 첨가하였을 때 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 를 첨가한 것에 비해 포도당 흡수를 한층 더 증가시켰다(Fig. 2). 그 중에서도 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 PR2를 처리하였을 때는 50 ng/mL의 인슐린을 처리한 것과 유사하게 증가시켰고, rosiglitazone을 처리한 것만큼 증가시켰다. 즉, 길경 분획층 중 PR1, PR2와 PR6는 인슐린의 필요량을 20-50배 감소시킨다는 것을 알 수 있었다. 메탄올 0%와 20%에서 용출된 분획층에 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있다는 것을 알 수 있었고, 인슐린 민감성 물질의 후보자들은 극성의 물질이라고 예측할 수 있다. 인슐린을 첨가하지 않고 길경 분획층만을 넣은 상태에서 포도당을 흡수하는 정도를 측정하였는데 그 값이 기저값과 유사하거나 오히려 낮아 분획물이 세포막을 투과적으로 만드는 detergent로 작용하여 비특이적으로 포도당의 흡수를 증가시키는 것은 아니라는 것을 확인하였다.

다른 연구에서도 천연물 추출물을 처리하였을 때 인슐린 작용을 증가시켜 포도당 흡수를 증가시킨다는 보고가 있었다. 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 보고하였다. 본 연구팀의 연구 결과에 따르면, 대항에 함유된 sennosides, rheins and rhaponticin는 항당뇨 효과를 가지는 것을 발표하였는데 그 기전은 rhaponticin와 rhein은 3T3-L1 지방 세포에서 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수를 증가시켰고, 특히 rhaponticin는 섬유아세포를 지방세포로의 분화를 촉진시키고, 지방 축적을 증가시키는 것으로 보아 PPAR- γ agonist인 rosiglitazone과 유사한 작용을 하였다(13). 맥문동에 함유된 homoisoflavone은 3T3-L1 지방세포에서 IRS-1 \rightarrow PI₃-kinase 신호전달을 향상시켜 지방세포에서 포도당 흡수를 증가시킨다는 것을 밝혔다(14).

인슐린성 물질로서의 효과

본 연구에서 사용한 3T3-L1 섬유아세포는 생물학적 특성이 잘

Table 1. Effects of Platycodi radix (PR) extract fractions on the differentiation of 3T3-L1 fibroblasts

Groups	With differentiation inducers except insulin ¹⁾ (μg triglyceride/mg protein)	With complete differentiation inducers (μg triglyceride/mg protein)
Control	13.6 \pm 2.2 ²⁾	21.3 \pm 3.4
PR1 ³⁾	13.5 \pm 2.3	33.0 \pm 3.9 ^a
PR2	12.8 \pm 2.8	21.5 \pm 2.6 ^b
PR3	12.6 \pm 2.9	19.8 \pm 2.3 ^b
PR4	13.8 \pm 2.6	21.6 \pm 2.9 ^b
PR5	13.5 \pm 3.8	18.5 \pm 2.1 ^b
PR6	13.3 \pm 3.5	34.9 \pm 3.8 ^a
Rosiglitazone (20 μM)	13.9 \pm 2.2	47.0 \pm 5.2 ^{**}

¹⁾Inducer is a mixture consisting of 0.25 μM dexamethasone, 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine and 10 $\mu\text{g/mL}$ insulin.

²⁾The data given are means \pm SD of triplicate measurements.

³⁾PR fractions (5 $\mu\text{g/mL}$) were administered into incubation media from starting to provide differentiation inducers.

^{a,b,c}Values on the same column with different superscripts (a, b, c) were significantly different at $p < 0.05$ by Tukey test.

^{**}Significantly different from the control (DMSO-treated) group in two-sample t-test at $p < 0.01$.

밝혀져 있고, 인슐린과 같은 유도물질의 존재하에서는 지방세포로 분화되는 특성을 갖고 있어 분화를 촉진하는 물질인 인슐린과 유사한 물질(인슐린성 물질)의 존재 여부를 탐색하는 실험에 사용하였다. 3T3-L1 섬유아세포는 인슐린, DEX와 IBMX로 조성된 분화유도물질을 첨가하였을 때 지방세포로 전환된다(6,7,13). 인슐린성 물질의 존재 여부는 3T3-L1 섬유아세포를 분화시킬 때 인슐린을 제외한 유도분화 물질과 함께 5 $\mu\text{g/mL}$ 길경 분획물을 첨가하였을 때 생성된 중성 지방량이 대조군인 DMSO를 처리한 것보다 많고, 인슐린을 포함한 분화유도 물질을 처리한 것과 유사하게 중성지방이 생성되었을 때 길경 분획물에 인슐린성 물질이 함유되어 있다고 간주하였다. 길경 분획물 중 인슐린성 물질로 작용하는 물질은 없었다(Table 1). 반면에 여러 연구에서 인슐린성 물질을 함유하는 천연물을 보고하였다. Ko 등(23)의 연구에서 분화유도물질이 첨가되지 않은 경우에는 얼마나 추출물을 1와 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 대조군에 비해 두 농도에서 모두 통계적으로 유의하게 분화를 촉진시켰다. 또한 분화유도물질과 함께 분화유도물질을 첨가하였을 때 1 $\mu\text{g/mL}$ 에서 분화를 촉진시켜 인슐린성 물질로 작용한다는 것을 알 수 있었다. 또한 Kameda 등(24)은 인슐린은 지방세포에서 지방분해를 저해하고 지방합성을 촉진하는 호르몬으로 인슐린처럼 지방합성을 촉진시키는지 지방분해를 억제하는 물질을 인슐린성 물질이라고 정의하였고, 로알제리로부터 불포화지방산 trans-10-hydroxy-2-decanoic acid와 마황의 non-pseudoephedrine이 인슐린성 물질임을 확인하였다.

한편, 인슐린을 포함한 분화유도물질과 함께 5 $\mu\text{g/mL}$ 길경 분획물을 처리하였을 때 중성 지방 생성량이 증가하면서 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수를 증가시키는 것은 PPAR- γ agonist로 작용할 가능성이 매우 높다. PPAR- γ agonist로서 혈당 강하제로 판매되고 있는 rosiglitazone은 중성 지방 생성량이 증가하면서 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수를 증가시켰다(7,13). PR1과 PR6는 분화 유도 물질인 인슐린, DEX 그리고 IBMX의 활성을 향상시켜 3T3-L1 섬유아세포가 지방세포로의 전환하는 것을 촉진시켰다. 이것은 분화 유도 물질 중 특히 인슐린 작용을 향상시키는

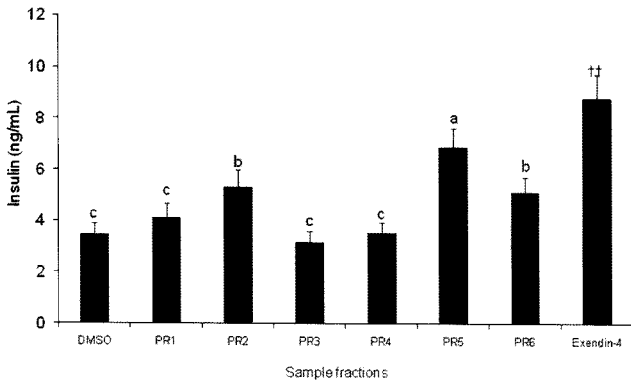


Fig. 3. Glucose-stimulated insulin secretion in Min6 cells. After 10 hour incubation in low glucose DMEM, Min6 cells were treated with vehicle (DMSO), 0.5 and 5 µg/mL extracts of *Platycode radix* (PR) extract fractions for 6 hours, and then they were incubated in high glucose (20 mM) Krebs-Ringer buffer with PR fractions for 1 hour. Exendin-4 (2.5 nM) was a positive control. These assays were repeated four times, and the results were expressed as mean ± SD. ^{a,b,c}Values on the bars with different superscripts (a, b, c) were significantly different at $p < 0.05$ by Tukey test. ^{††}Significantly different from the control (DMSO-treated) group in two-sample t-test at $p < 0.01$.

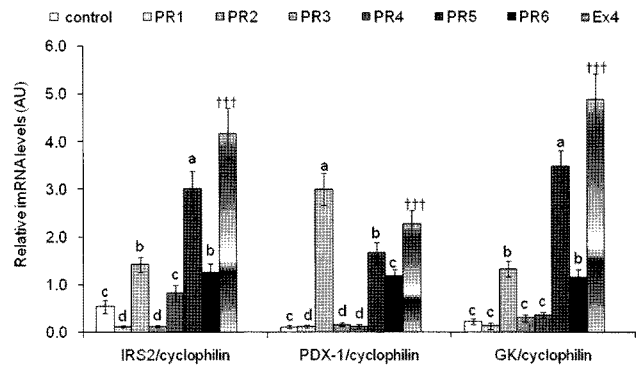


Fig. 4. Expression of IRS2, PDX-1, and glucokinase in Min6 cells. Min6 cells were administered with vehicle (DMSO), 0.5 and 5 µg/mL extracts of *Platycode radix* (PR) extract fractions, or 2.5 nM exendin-4 in high glucose DMEM media for 8 hours. Total RNA extracted from islets was reverse transcribed to make cDNA, and mRNA levels of IRS2, PDX-1, glucokinase and cyclophilin were measured using primer sets for full length of IRS2, PDX-1, glucokinase and cyclophilin genes by realtime PCR. The results represented the ratio of mRNA levels of gene of interest (IRS2, PDX-1 and glucokinase) and those of housekeeping gene (cyclophilin). ^{a,b,c,d}Values on the bars with different superscripts (a, b, c, d) were significantly different at $p < 0.05$ by Tukey test. ^{†††}Significantly different from the control (DMSO-treated) group in two-sample t-test at $p < 0.001$.

것과 관련이 있을 것으로 예측된다. 이 분획은 앞에서 언급한 것처럼 인슐린 자극에 의한 포도당흡수를 증가시키는 분획층으로 아직까지 확실하지는 않지만 PPAR-γ의 활성을 향상시키는 것과 관련이 있을 것으로 사료된다. 나머지 분획층을 처리한 경우는 DMSO만을 처리한 대조군에 비해 지방 세포로의 전환을 촉진하거나 억제 하지 않았다. 즉, 길경은 지방의 생성을 향상시키는 물질을 함유되어 있는 것을 알 수 있었고, 어떤 기전에 의해서 지방 합성이 향상되는 지에 대한 연구를 수행할 것이다(Table 1).

지방세포로의 분화는 지방 조직세포에 특징적으로 발현되는 유전자들의 조절부위에 작용하는 transcription factor들이 섬유아세포가 지방세포로 분화되는 과정에 발현되는 것과 관련이 있다고 한다. 이 과정에 관여하는 transcription factor는 PPAR-γ, CCAAT/enhancing binding protein(C/EBP), adipocyte differentiation, determinant factor 1(ADD1) 그리고 sterol regulatory element binding protein 1c(SREBP1c) 등이 있다. 유도 분화물질은 열거한 transcription factor들의 발현을 촉진시킴으로 섬유아세포를 지방 세포로 전환시키는 것으로 알려졌다(25,26). 그러므로 PR1과 PR6분획층은 PPAR-γ activator를 포함할 가능성이 높다.

포도당 자극에 의한 인슐린 분비

5 mM 포도당 KRB 용액에서는 길경 분획물이 대조군인 DMSO를 첨가한 것에 비해 Min6 세포에서 인슐린 분비를 증가시키지 않았고, 또한 positive control로 사용한 2.5 nM exendin-4를 처리한 것도 DMSO군과 인슐린 분비에 차이가 없었다(data not shown). 이것이 저농도 포도당에서는 길경 분획물이나 exendin-4가 인슐린 분비를 증가시키지 않아서 surfonylurea와는 달리 저혈당을 유발하지는 않을 것으로 사료되었다. 한편, 20 mM 포도당 KRB용액에서는 Min6 세포에 길경을 5 µg/mL 처리하였을 때 PR2, PR5와 PR6 분획층이 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 증가시켰다(Fig. 3). PR5 분획층이 인슐린 분비를 가장 촉진시켰지만, 2.5 nM의 exendin-4 보다는 촉진시키지 않았다. 이러한 포도당 자극에 의한 인슐린 분비가 증가하는 것은 혈당 강하 효과가 높은

수 있고, 본 연구에서 positive control로 사용한 exendin-4는 2007년 초에 미국 FDA로부터 Exenatide의 이름으로 혈당 강하제로 판매 허가를 받았다. 그러므로 길경 분획층에는 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 증가시키는 물질이 함유되어 있는 것으로 사료된다.

Min6 세포에서 IRS2, pancreas duodenum homeobox-1 (PDX-1)와 glucokinase mRNA 발현

포도당 자극에 의한 인슐린 분비의 장에는 포도당(혈당)을 감지하는 능력이 떨어지고, 췌장의 베타세포의 증식이 충분히 이루어지지 않을 때 나타난다는 것이 알려졌다(9,10). Glucokinase는 베타세포에서 포도당 감지(glucose sensing)를 조절하는 효소로 알려졌다으며, glucokinase의 양과 활성이 증가할 때 포도당 감지를 향상시켜 포도당 자극에 의한 인슐린 분비 효율적으로 촉진시킨다는 것이 보고되었다(9,11). 한편, 베타세포의 인슐린/IGF-1 신호 전달이 향상될 때 증식이 증가하고 apoptosis가 감소하여 베타세포의 양이 증가한다. 베타세포에서 IRS-2 발현을 증가시키는 것이 인슐린/IGF-1 신호전달을 향상시킨다는 보고가 있었다(11,27). Insulinotropic 작용을 하는 GLP-1 receptor agonist는 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 증가와 함께 베타세포의 양을 증가시켰고, 이것은 IRS2의 발현을 증가시켜 insulin/IGF-1 신호전달을 향상시켰다(11,27). 이 신호전달의 향상이 베타세포의 양을 증가시키는 것은 베타세포의 증식에 관여하는 transcription factor인 PDX-1의 발현을 증가시키는 것과 관련이 있다(28,29).

길경의 분획물중 PR2, PR5, 그리고 PR6이 IRS2 mRNA의 발현을 증가시켰으며, 그 중에서도 PR5이 발현을 가장 현저하게 증가시켰다(Fig. 4). 이와 유사하게 포도당을 감지하는 효소로 알려진 glucokinase의 mRNA의 양도 PR2, PR5, 그리고 PR6가 증가시켰고, 이것은 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 증가시키는 분획층과 같았다(Fig. 4). 또한 베타세포의 증식을 향상시키는

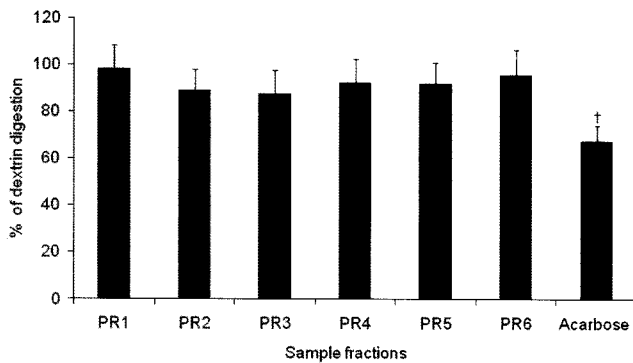


Fig. 5. Effects of Platycodi radix (PR) extract fractions on the digestion of maltose by α -glucoamylase. The values are calculated by the percentage based on the control(DMSO treatment) value. The data given are means \pm SD of triplicate measurements. PR1-PR6: treatment of each of PR1-PR6. *Significantly different from the control (DMSO-treated) group in two-sample t-test at $p < 0.05$.

transcription factor 알려진 PDX-1 mRNA의 양도 PR2, PR5, 그리고 PR6에서 증가하였다. 또한 이미 insulinotropic 작용을 하는 약물로 승인 받은 exendin-4도 IRS2, glucokinase 그리고 PDX-1의 발현을 향상시켰다. 그러므로 PR2, PR5, 그리고 PR6들은 insulinotropic 작용을 하는 물질을 함유하고 있는 것으로 사료된다. 결과적으로 IRS2, glucokinase, PDX-1의 발현 증가는 베타세포의 기능을 향상시켜 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 향상시킨 것으로 사료된다.

*In vitro*와 *In vivo*에서 길경 추출 분획물이 α -glucoamylase 활성에 미치는 영향

Fig. 5에는 길경 추출 분획물이 α -glucoamylase 활성에 작용하여 기질인 dextrin을 포도당으로 분해하는데 미치는 효과에 대한 결과를 나타내었다. 길경 분획물은 대조군에 비해 α -glucoamylase의 활성을 통계적으로 유의하게 저하시키지 않았다. 그러므로 길경 분획물은 탄수화물의 소화에는 관여하지 않았다. 본 연구에서 positive control 사용한 acarbose의 소화 억제 정도는 다른 연구의 결과와 유사하였다(30,31).

요 약

민간요법에서 항당뇨 및 항비만 효과가 있는 것으로 알려진 길경의 항당뇨 효과가 있는 지 여부를 *in vitro*에서 조사하기 위해 길경을 70% 에탄올로 추출한 후 메탄올과 물을 섞은 용액으로 단계별로 XAD-4 column으로 분획하였다. 본 연구에서는 1) 3T3-L1 섬유아세포와 지방세포에서 길경의 추출 분획물이 인슐린처럼 작용하는 인슐린성 물질이거나, 2) 인슐린 작용을 향상시키는 인슐린 민감성 물질이거나, 또는 3) 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 향상시키거나, 4) 베타세포의 기능과 양을 증가시키는데 관여하는 유전자인 IRS-2, glucokinase, PDX-1의 mRNA 발현을 향상시키거나, 5) α -glucoamylase 활성을 억제하는 물질로 작용하는 지 여부를 조사하였다. 길경 추출 분획물은 인슐린성 물질로 작용하지 않았다. 반면에 0, 20와 100% 메탄올층은 3T3-L1 지방세포에서 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수를 증가시켰다. 이 분획층 중에서 특히 0%과 100% 메탄올 분획층은 분화 유도 물질의 작용을 향상시켜 3T3-L1 섬유아세포에서 지방세포로의 분화 및 중성 지방의 축적을 증가시켰다. 그러므로 이들은 PPAR-

γ agonist로 작용하는 물질을 함유할 가능성이 매우 높다. 인슐린을 분비하는 세포인 Min6 세포에서 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 향상시키는 지 여부를 조사하였는데 20, 80 그리고 100% 메탄올층은 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 증가시켰다. 그 기전은 인슐린 분비와 베타세포의 증식에 관여하는 유전자의 IRS-2, glucokinase 그리고 PDX-1의 mRNA의 양을 증가시키는 것과 관련이 있다. 결론적으로 길경은 지방 세포의 분화를 촉진하는 물질, 인슐린 민감성을 향상시키는 물질 그리고 베타세포의 기능과 증식을 촉진시키는 물질을 함유하고 있으므로 우리나라 및 아시아의 사람들에서 많이 유발되는 비만을 동반하지 않은 당뇨병 및 인슐린 저항성의 치료와 예방에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 호서대학교의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

문 헌

- DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM: A balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-353 (1992)
- Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46: 3-19 (2003)
- Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp. Biol. Med.* 228: 1111-1117 (2003)
- Min HK. Clinical characteristics of Korean diabetic patients. *Korean J. Diabetes* 16: 163-170 (1992)
- 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)
- 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)
- 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)
- Kurtz TW. New treatment strategies for patients with hypertension and insulin resistance. *Am. J. Med.* 119: S24-30 (2006)
- Hennige AM, Burks DJ, Ozcan U, Kulkarni RN, Ye J, Park S, Schubert M, Fisher TL, Dow MA, Leshan R, White MF. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes. *J. Clin. Invest.* 112: 1521-1532 (2003)
- Weir GC, Bonner-Weir S. Five stages of evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53: S16-S21 (2004)
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391: 900-904 (1998)
- Park S, Dong X, Fisher TL, Dunn S, Omer AK, Weir G, White MF. Exendin-4 promotes IRS2 signaling to mediate pancreatic beta-cell growth and function. *J. Biol. Chem.* 281: 1159-1168 (2005)
- Choi SB, Ko BS, Park SK, Jang JS, Park S. Insulin sensitizing and α -glycoamylase inhibitory action of sennosides, rheins, and rhaponticin in *Rhei Rhizoma*. *Life Sci.* 78: 934-942 (2006)
- Choi SB, Jun DW, Park S. The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI₃-kinase pathway. *Life Sci.* 75: 2653-2664 (2004)
- Choi SB, Park S. The effects of water extract of Polygonatum Odoratum (Mill) Druce on insulin resistance in 90% pancreatec-

- tomized rats. *J. Food Sci.* 67: 2375-2379 (2002)
16. 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. Bioch.* 66: 2036-2043 (2002)
 17. Kim YP, Lee EB, Kim SY, Li D, Ban HS, Lim SS, Shin KH, Ohuchi K. Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *Platycodon grandiflorum*. *Planta Med.* 67: 362-364 (2001)
 18. Lee KJ, You HJ, Park SJ, Kim YS, Chung YC, Jeong TC, Jeong HG. Hepatoprotective effects of *Platycodon grandiflorum* on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Cancer Lett.* 174: 73-81 (2001)
 19. Choi CY, Kim JY, Kim YS, Chung YC, Seo JK, Jeong HG. Aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum* elicits the release of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from murine macrophages. *Int. Immunopharm.* 1: 1141-1151 (2001)
 20. Kim HK, Choi JS, Yoo DS, Choi YH, Yon GH, Hong KS, Lee BH, Kim HJ, Kim EU, Roh SH, Jeong YC, Kim YS, Ryu SY. HPLC analysis of saponins in *Platycodi Radix*. *Korean J. Pharmacogn.* 38: 18-25 (2007)
 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. Ko BS, Kim HK, Park S. Insulin sensitizing and insulin-like effects of water extracts from *Kalopanax pictus* NAKA fractions in 3T3-L1 adipocytes. *J. Korean Soc. Agr. Chem. Biotechnol.* 45: 42-46 (2002)
 24. 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)
 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/EBP-beta and C/EBP-delta-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J. Cell Sci.* 115: 3601-3607 (2002)
 27. Jhala US, Canettieri G, Sreanion RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White MF, Montminy M. cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev.* 17: 1575-1580 (2003)
 28. Wang X, Cahill CM, Pineyro MA, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology* 140: 4904-4907 (1999)
 29. Movassat J, Beattie GM, Lopez AD, Hayek A. Exendin 4 up-regulates expression of PDX 1 and hastens differentiation and maturation of human fetal pancreatic cells. *J. Clin. Endocr. Metab.* 87: 4775-4781 (2002)
 30. Hayakawa T, Kondo T, Okumura N, Nagai K, Shibata T, Kitagawa M. Enteroglucagon release in disaccharide malabsorption induced by intestinal alpha-glucosidase inhibition. *Am. J. Gastroenterol.* 84: 523-526 (1989)
 31. 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)