

3T3-L1 Adipocyte와 C57BL/KsJ-db/db Mice에서 KOCAT-D1의 항당뇨 활성

양지희¹ · 원혜진¹ · 박호영¹ · 남미현¹ · 이현순² · 이종구³ · 김종탁⁴ · 이광원^{1*}

¹고려대학교 식품과학부, ²고려대학교 식품영양학과
³생명공학연구원, ⁴(주)KOCAT

Anti-diabetic Activities of Kocat-D1 in 3T3-L1 Adipocytes and C57BL/KsJ-db/db Mice

Ji-Hee Yang¹, Hye-Jin Won¹, Ho-Young Park¹, Mi-Hyun Nam¹, Hyun-Sun Lee²,
Joongku Lee³, Jong-Tak Kim⁴, and Kwang-Won Lee^{1*}

¹Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Sciences and Biotechnology,

²Institute of Health Science, Korea University, Seoul 136-703, Korea

³Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

⁴KOCAT Inc., Seoul 153-782, Korea

Abstract

This study investigated anti-diabetic activity of Kocat-D1, which is a currently used traditional medicine for treatment of diabetes in Shandong, China. Insulin sensitizing activity was observed in a cell-based glucose uptake assay using 3T3-L1 adipocytes. The treatment of 0.2 mg/mL of hot water extract of Kocat-D1 with 0.2 nM insulin was associated with a significant increasing in glucose uptake (165.0±0.7%) over the treatment of 0.2 nM insulin. C57BL/KsJ-db/db mice (8 weeks of age) were separated into 3 groups: normal control (control, db/+ mice untreated), diabetic control (DM control, db/db mice untreated), Kocat-D1 (db/db mice treated with Kocat-D1 extract 350 mg/kg/day). After 16 weeks of treatment, body weight and total diet intake of Kocat-D1 group were significantly lower than DM control groups. Blood glucose levels of the Kocat-D1 group (14.7±1.4 mmol/L) were significantly lower compared to the DM control group (27.1±0.2 mmol/L). Furthermore, insulin level was significantly increased in the Kocat-D1 group (0.17±0.02 ng/mL) compared with the DM control group (0.05±0.02 ng/mL). The glomeruli in kidney was stained using periodic acid-shiff base (PAS) for confirming collagen accumulation. The glomeruli in kidney of Kocat-D1 group had significantly reduced PAS-positive compared with that of DM control.

Key words: Kocat-D1, anti-diabetes, 3T3-L1, C57BL/KsJ-db/db mice, insulin

서 론

전 세계적으로 “luxury disease”라고 불리는 당뇨가 급증하면서 2008년 세계당뇨병학회에서는 당뇨와의 전쟁을 선포하고 매년 당뇨의 위험성을 경고하고 있다(1). 당뇨병은 과거 40~50세에 집중적으로 발생하는 성인병으로 취급되었으나, 근래에는 경제의 발전, 식생활의 서구화 또는 유전적인 요인과 함께 비만, 식생활, 운동부족, 스트레스 등이 발병에 영향을 주어 발병 연령층도 점점 낮아지고 있으며 소아 당뇨 환자도 증가하고 있는 추세이다(2). 세계보건기구에 따르면 전 세계 인구의 최소 20명당 1명이 당뇨병으로 사망하고 있다고 보고하고 있으며 국내에서도 당뇨병 인구가 급격히 증가하고 있는 실정이다(3,4).

제2형 당뇨병(non insulin-dependent diabetes)은 성인 발

병 당뇨병으로 명명되고, 전체 당뇨 환자의 90% 이상을 차지하며 연령 및 비만 정도가 증가함에 따라 발병률이 높아진다(5). 최근 제2형 당뇨는 과도한 식품 섭취 및 운동부족으로 인한 비만에서 비롯된 생활습관성질환(lifestyle disease)으로 정의되고 있다(6). 인슐린 비의존형인 제2형 당뇨의 경우에도 진단 당시에는 50% 정도 베타세포의 기능이 남아있더라도 유병기간이 길어질수록 과도한 인슐린 생산으로 점차 베타세포의 파괴가 진행되면서 제1형 당뇨 환자처럼 혈액 내 인슐린이 부족하게 된다(7). 현재 국내에서 진단 확정된 제2형 당뇨 환자의 약 35% 정도가 일차 선택 약물로 인슐린 분비를 유도하는 약물을 사용하고 있다(8). 제2형 당뇨의 치료제로 많이 사용되는 설폰요소제(sulfonylurea drug)의 경우(9) 일차적으로는 췌장 β-세포의 ATP-sensitive K⁺ (KATP) channel의 감극(depolarization)을 유도하고 volt-

*Corresponding author. E-mail: kwangwon@korea.ac.kr
Phone: 82-2-3290-3027, Fax: 82-2-927-1970

age-dependent Ca^{2+} channels를 열어 세포 내 Ca^{2+} 농도를 증가시켜 인슐린 분비를 촉진하며(10), 이차적으로는 근육이나 지방의 인슐린 수용체 수를 늘려 포도당의 세포 내 전달을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(9,11). 즉 인슐린 분비 촉진과 인슐린 저항성을 개선시키는 약물 중 이러한 강력한 작용으로 인해 유병 기간이 긴 당뇨병 환자나 알코올 중독, 간이나 신장 질환을 동반한 당뇨병 환자의 경우 저혈당을 유발시킬 가능성이 있는 것으로 보고되고 있다(12).

최근 이러한 약물과 유사한 효능을 가지고 있으면서도 안전하게 혈당을 조절하는 천연 기능성 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 대표적으로 마루라(*Sclerocarya birrea*) 껍질 추출물(13), 흑겨자(*Brassica nigra*) 추출물(14), 인도에서 자생하는 님나무(neem tree) (*Azadirachta indica*) 잎 추출물(15)이 있으며, 특히 동의보감에도 그 효능이 나와있는 황련(*Cortidis Rhizoma*)으로부터 추출한 berberine은 지방세포의 인슐린 저항성과 베타세포의 인슐린 분비능을 증가시킨다고 알려져 있다(16).

본 연구진은 중국 광둥지역에서 당뇨에 민간요법으로 쓰이는 식물의 열수 추출물을 type 1 당뇨 실험모델에 1 g/kg/day로 투여한 결과 투여군에서 혈액 중 insulin 농도가 유의적인 수준으로 증가한 것을 선행연구에서 확인하였다(17). 따라서 본 연구는 3T3-L1 adipocyte를 이용하여 낮은 insulin 농도에서 insulin에 대한 감수성(insulin sensitivity)을 증가시켜 포도당 흡수를 증가시키는 효과와 제2형 당뇨병 질환 모델인 C57BL/KsJ-db/db mice를 이용하여 그 식물의 항당뇨 효능을 과학적으로 검증하고자 한다.

재료 및 방법

시약

Isobutyl-3-methyl-xanthin(IBMX), human insulin, dimethylsulfoxide(DMSO), 2-deoxy-D-[1,2- 3H]glucose(2-DG)은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였고, 세포배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), antibiotics(100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin)는 Gibco Life Technologies Inc.(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 기타 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다.

시료의 조제

본 연구에서 사용한 시료는 중국 광둥지역에서 고고람으로 불리는 박과(Cucurbitaceae) 고고람(絞股藍)속의 덩굴성 다년생 식물로, 채취 즉시 중국에서 감압 건조하여 국내로 들여온 것을 (주)KOCAT으로부터 제공받아 사용하였다. 현재까지 정확한 학명이 규명되지 못하여 Kocat-D1으로 가칭하여 사용하였으며 본 식물은 현재 한국생명공학연구원 해

외생물소재허브센터 이중구 박사팀에서 학명을 규명하고 있다. Kocat-D1은 분말로 분쇄한 뒤 추출 전까지 $-70^{\circ}C$ 에서 보관하였다. 시료의 조제는 분쇄한 가루를 증류수를 이용하여 $25^{\circ}C$, $70^{\circ}C$ 및 $100^{\circ}C$ 에서 추출하였으며 추출시간은 $25^{\circ}C$ 의 경우 24시간, $70^{\circ}C$ 및 $100^{\circ}C$ 의 경우 2시간 동안 추출하고 각각 여과(No 41, Whatman, Maidstone, England)한 뒤 농축 및 동결건조 하여 사용하였다.

세포 배양 및 지방 분화

섬유아세포인 3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 6 well plate에 세포를 분주하여 high-glucose DMEM에 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 공급하여 $37^{\circ}C$, 5% CO_2 배양 조건 하에서 세포가 85% 될 때까지 배양하였다. 3T3-L1을 지방구 세포로 유도하는 방법은 Liu 등의 방법에 따라 실시하였다(5). 방법을 간략히 기술하면, 세포가 85% 배양되었을 때 유도 분화물질인 세포에 공급하게 되는 데 이때 분화 유도 물질로 50 μ M dexamethasone, 0.8 mM IBMX 및 1 μ g/mL insulin을 10% FBS가 포함된 DMEM에 첨가하여 세포에 처리하였다. 처리 2일 후 10% FBS와 1 μ g/mL insulin 배양액으로 추가 배양을 실시하였으며, 매 2일 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 배양하였다. 분화 유도 물질을 세포에 공급한지 10일 후 섬유아세포의 형태를 지니던 3T3-L1은 구형 모양의 지방세포로 분화된 것을 확인하고 실험에 사용하였다.

2-deoxy-D- 3H -glucose를 이용한 포도당 흡수능 측정

배양 10일 후 지방세포로 전환된 3T3-L1을 이용하여 포도당 흡수능 실험을 진행하였다(18). 분화된 3T3-L1을 low glucose DMEM으로 2시간 동안 배양한 후 Krebs-Ringer-HEPES(KRH, 25 mM HEPES, 5 mM KCl, 0.96 mM NaH_2PO_4 , 4.1 mM $MgSO_4$, 2 mM $CaCl_2$, 5 mM glucose)로 세척한 뒤 KRH로 30분간 배양했다. 농도를 달리한 insulin과 시료를 KRH에 녹여 처리하고 30분간 더 배양한 후, well 당 각각 0.1 μ Ci/mL의 2-deoxy-D- 3H -glucose(2-DG)와 1 mM glucose를 첨가하고 15분간 추가 배양하였다. 배양 후 차가운 PBS로 여러 번 세척한 뒤 1% Triton X-100을 이용하여 세포를 용해시킨 다음 흡수된 2-DG를 scintillation counter(LS 6000, Beckman, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

실험동물

본 실험에 사용된 제2형 당뇨 동물모델은 8주령 수컷 C57BL/KsJ-db/db 마우스와 그의 이형접합체인 C57BL/KsJ-db/+ 마우스를 (주)중앙실험동물(Ansan, Korea)에서 분양받아 일주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회 승인을 받은 후(승인번호 KUIACUC-2009-106) '실험동물 관리 및 이용에 관한 지침(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NRC)'에 따라 진행하

였다. 실험동물의 사육은 특정병원균 부재(specific pathogen free, SPF) 상태를 유지하기 위하여 ventilation unit가 장착된 barrier system에서 cage에 1마리씩 분리 사육하였으며, 사육실의 조건은 20~22°C, 습도 50±1%, 명암주기 12시간 간격을 유지하였다.

동물실험용 시료의 조제 및 실험군 구성

동물실험에 사용한 시료는 100°C에서 2시간 추출한 시료를 여과, 농축 및 동결건조 하여 사용하였으며 이때 수율은 35%(w/w)였다.

실험군은 정상군(Normal group: C57BL/KsJ-db/+, n=6), 당뇨병대조군(DM group: C57BL/KsJ-db/db, n=6), Kocat-D1 군(Kocat-D1: C57BL/KsJ-db/db에 Kocat-D1 추출물을 1 g DM/kg/day 투여한 군, n=6)으로 나누었다. 시료의 투여는 시료 1 g/kg에 해당하는 추출물 350 mg/kg을 자유급식 방식으로 음용수(일일 섭취량 20 mL)에 혼합하여 투여하였으며 체중은 2주마다 관찰하여 투여기간 중 투여량이 350 mg/kg이 유지되도록 하였으며, 시료는 48시간 주기로 교체하였고 추출물 원액은 -70°C에 보관하였다.

체중, 식이 섭취량 및 혈당 측정

대조군과 실험군의 체중, 식이량 및 음수량은 16주 동안 측정하여 실험동물의 사료 섭취량(g/day), 음수량(mL/day) 및 체중변화를 측정하였다. 혈당측정은 매주 1회 16주 동안 실시하였다. 혈당측정은 측정 전 12시간 절식 후, 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당측정기(Medisense Optium Blood Glucose Electrodes, Alameda, CA, USA)를 사용하여 실시하였다.

조직 검사 측정

간, 신장, 심장, 비장, 췌장의 무게를 측정하고 각 group 별 차이를 비교하였다. 그중 간과 신장, 췌장을 적출하여 4%의 파라포름알데히드(paraformaldehyde, pH 7.4)를 이용하여 24시간 동안 고정 후 파라핀(paraffin)으로 포매한 다음 microtome을 사용하여 5 µm 두께로 박절 후 간은 hematoxylin & eosin(H&E)으로 신장은 periodic acid schiff(PAS) 염색(19) 후 광학현미경(CX-40, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

통계처리

본 실험에서 측정된 모든 수치는 평균±표준편차(standard error of mean)로 나타내었다. 실험군간의 통계학적 분석은 Sigma-Stat 3.5(Jandal Co., San Rafael, CA, USA)를 이용하여 one-way analysis of variance(ANOVA) 분석을 실시하였으며 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 통계학적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

3T3-L1 지방세포 내 포도당 흡수능 측정

3T3-L1 세포는 섬유아세포가 지방세포로 분화되면서 인

슐린 수용체와 GLUT4가 세포막에서 발현되고, 인슐린의 타겟세포로 전환되어 인슐린 신호 전달 체계를 연구하는 모델이 된다. 뿐만 아니라 3T3-L1 지방세포는 소량으로 단시간에 많은 분획층에 대한 활성을 조사할 수 있을 뿐 아니라 생체에 존재하는 지방조직과는 달리 대사성 피드백 루프와 같은 복잡한 대사와 연관되어 있지 않아서 인슐린 민감성 물질을 탐색 연구를 하기에 적합하다(20). 3T3-L1 지방세포는 인슐린의 농도에 따라 포도당의 흡수를 증가시키고 인슐린 유사물질을 처리하였을 때 인슐린을 도와서 포도당 흡수에 가장 영향을 미치는 phosphatidylinositol 3-kinase(PI3 kinase)의 활성을 증가시켜 인슐린 작용력을 향상시킨다고 보고되고 있다. 따라서 본 포도당 흡수능의 인슐린 농도를 선정하기 위하여 농도를 달리한 인슐린(0~20 nM)을 처리한 후 포도당의 흡수를 측정하였다. 그 결과 인슐린 농도가 증가함에 따라 포도당의 흡수가 꾸준히 증가하였으며 인슐린 농도 10 nM 이상에서는 증가하지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이러한 결과는 많은 선행 연구자들의 결과와 일치하였다(16,21). 그러므로 선행 연구자들과 동일한 조건인 0.2 nM 인슐린에서 포도당 흡수능을 측정하며 10 nM의 인슐린에서의 포도당 흡수능을 최대 포도당 흡수능으로 정하였다. 추출온도를 달리한 Kocat-D1 추출물을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하여 세포독성을 측정된 결과(data 생략) 독성을 보이지 않는 최대농도인 200 µg/mL의 농도에서 실험을 진행하였으며, 포도당 흡수능을 추출온도에 따라 측정된 결과 100°C에서 추출한 추출물의 포도당 흡수율이 1100±10 cpm으로 0.2 nM 인슐린 처리군보다 2.1배 증가하였다. 이 정도의 활성은 10 nM 인슐린에서의 포도당 흡수능을 최대 포도당 흡수능으로 하였을 때의 45%에 해당하는 흡수능이다(Fig. 2). 따라서 Kocat-D1을 100°C에서 추출한 열수 추출물

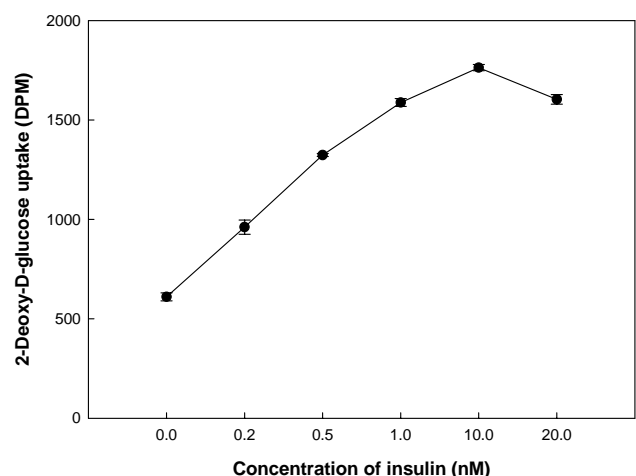


Fig. 1. Effects of insulin on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Differentiated 3T3-L1 cells were incubated with various concentration of insulin for 15 minutes and then assayed for glucose uptake activities.

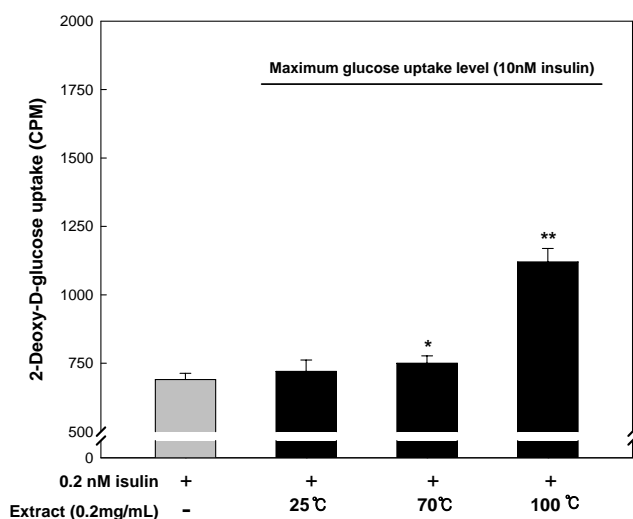


Fig. 2. Effects of Kocat-D1 on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Various extracts of Kocat-D1 were prepared as described in the Materials and Methods. Differentiated 3T3-L1 cells were incubated with extract of various extraction conditions for 15 minutes and then assayed for glucose uptake activities. Values are mean \pm SEM. Asterisks indicate a difference from DM control, * p <0.05; ** p <0.001.

은 인슐린에 대한 감수성을 증가시켜 지방구 세포의 포도당 흡수능을 향상시키는 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

체중, 식이 섭취량 측정

Kocat-D1을 100°C에서 추출한 열수추출물의 추출수율이 35%이었으므로 시료 1 g/kg에 해당하는 추출물 350 mg/kg/day로 제2형 당뇨 동물모델인 C57BL/KsJ-db/db mice에 16주간 자유급수 방식으로 투여한 결과 시료를 투여하지 않은 C57BL/KsJ-db/db mice(DM control)과 Kocat-D1 투여군에서 체중이 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다(Table 1).

혈당의 변화

C57BL/KsJ-db/db mice는 제2형 당뇨인 인슐린 비의존성 당뇨의 질환모델로 생후 5주령에서는 그의 이형접합체인 C57BL/KsJ-db/+ mice와 혈당의 차이가 없으나 생후 8주부터 체내 인슐린 저항성이 증가하면서 생후 12주령에서는 혈당이 30 mmol/L까지 증가하는 것으로 알려져 있다. 이 시기(생후 5~12주 사이)에는 db/+ mice와 비교 시 db/db mice는 인슐린 결합능이 22~50% 정도 감소되어 체내의 인슐린 농도는 증가하다 점차 췌장의 기능이 파괴되면서 인슐린 부족이 관찰된다고 알려져 있다(22). Kocat-D1 추출물을 자유급수 방식으로 공급하면서 생후 9주령부터 시작하여 16주간 관찰한 결과 DM 대조군인 db/db mice는 투여시작 4주 후(생후 13주령)부터는 혈당이 30 mmol/L이 넘는 것이 관찰되었다(Fig. 3). 그러나 Kocat-D1 투여군에서는 투여 8주부터 유의적인 수준으로 DM 대조군보다 혈당이 낮아짐이 관찰되었으며 투여를 종료하는 시점에는 DM 대조군의 혈당

Table 1. Body weight, food intake, and organs weights of each group

Parameter	Normal control	DM control	Kocat-D1
Number of animal	6	6	6
Initial body weight (g)	19.5 \pm 0.4	39.0 \pm 0.8	40.5 \pm 1.0
Final body weight (g)	32.1 \pm 1.8	39.5 \pm 6.6	33.0 \pm 3.5
Food intake (g/day)	3.9 \pm 0.1	7.4 \pm 0.3	6.6 \pm 0.4*
Liver (%/B.W.)	4.7 \pm 0.4	7.3 \pm 0.1	6.1 \pm 0.2
Kidney (%/B.W.)	7.4 \pm 0.5	15.6 \pm 2.3	15.2 \pm 1.5

Physiologic parameters for each groups for 16 weeks. Normal control: db/+ mice untreated, DM control: db/db mice untreated, Kocat-D1: db/db mice treated with hot water extract at 100°C of Kocat-D1 (350 mg/kg/day). Values are mean \pm SEM. Means in the same row bearing different superscript are significantly different compared with DM control by Duncan's multiple range tests. Asterisks indicate a difference from DM control in same parameter, * p <0.05.

이 27.1 \pm 0.2 mmol/L인데 비해 투여군은 14.7 \pm 1.4 mmol/L로 낮아져있는 것이 확인되었다.

장기의 변화

투여를 종료한 다음 각 장기의 무게를 측정해 본 결과 DM 대조군에 비해 투여군에서 간, 신장, 췌장의 무게가 감소한 것이 관찰되었으나, 췌장의 무게 변화를 제외하고는 그룹간 유의적 차이는 없었다(Table 1).

인슐린은 지방산 합성, 중성지방의 합성과 분해, 그리고 케톤체의 생성과 이용에 중요한 역할을 하고 있다. 인슐린은 지방산 합성을 촉진시키는데, 만약 인슐린이 결핍될 시에는 지방산 합성이 감소하게 된다. 간에서 합성된 지방산은 중성지방을 형성하여 초저밀도 지단백질(very-low-density lipoprotein, VLDL)의 형태로 혈액으로 분비되는데, 체내 인슐

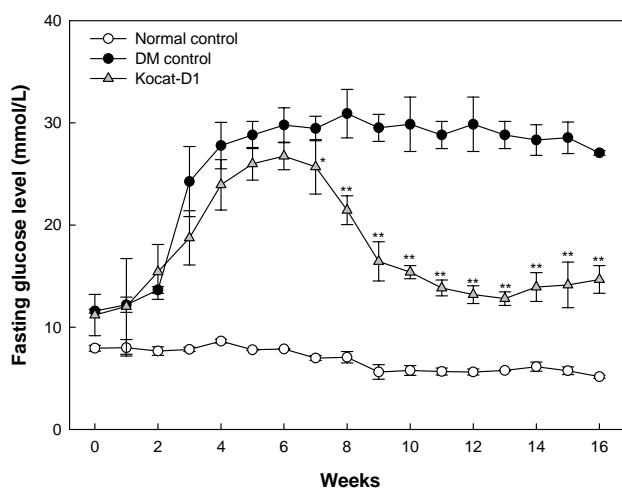


Fig. 3. Change of fasting glucose level of C57BL/KsJ-db/db mice rat for 16 weeks. Normal control: db/+ mice untreated, DM control: db/db mice untreated, Kocat-D1: db/db mice treated with hot water extract at 100°C of Kocat-D1 (350 mg/kg/day). Values are mean \pm SEM. Asterisks indicate a difference from DM control, * p <0.05; ** p <0.001.

린 부족은 체지방 분해와 식사 등에 의한 지방산의 유입과 아포지단백질의 부족으로 간에서 VLDL과 cholestylerster 합성이 촉진된다. 그리하여 간에서 비정상적으로 많은 양의 중성지방이 축적되어 지방간을 유발하게 되며(23), 이러한 과정에서 간의 무게가 비대하게 된다고 알려져 있다. Table 1의 결과에서도 DM 대조군의 간 조직 무게가 정상군에 비해 증가되어있는 것이 관찰되었으며 Kocat-D1의 투여로 유의적 차이는 없었지만 감소하는 경향이 있음을 확인하였다. 본 연구진의 선행연구에서도 Kocat-D1을 strptozotocin으로 유도한 당뇨쥐에서 비알콜성 지방간이 억제되는 것을 확인하였다(17).

혈액 중 인슐린 농도

인슐린은 췌장의 베타세포에서 분비되는 호르몬으로, 혈당의 조절뿐만 아니라 지질과 단백질 대사에도 중요한 역할을 수행한다. 제2형 당뇨의 경우 인슐린이 초기에는 조직의 인슐린 저항성에 의해 체내 혈당 조직으로 이행되지 못하지만 유병기간이 길어질수록 점차 베타세포의 기능이 저하되어 결국에는 인슐린 농도가 낮아지게 된다(7). 따라서 많은 2형 당뇨 환자의 경우에도 인슐린 치료가 수행되고 있다(8). 각 실험군의 혈액 중 인슐린 농도를 측정된 결과 정상대조군 0.12 ± 0.03 ng/mL인데 비해 장기간의 인슐린 저항성에 의한 베타세포의 기능저하가 유발된 DM 대조군은 0.05 ± 0.02 ng/mL로 낮아졌다. Db/db mice에 Kocat-D1을 투여한 군은 0.17 ± 0.02 로 DM 대조군보다 유의적인 수준으로 증가하였다(Fig. 4). 본 연구진의 제1형 당뇨모델을 대상으로 연구한 선행연구(17)의 결과와 유사하게 본 연구에서도 Kocat-D1은 혈액 내 인슐린 생성의 농도를 증가시켰다. 선행연구에서는 베타세포의 용적을 증가시켜 인슐린 분비를 증가시켰다.

광학현미경 관찰

제2형 당뇨병은 혈당조절이 잘 되고 있으면 정상인과 같은 지질농도를 보이고 심지어 어떤 경우는 중성지방이 저하되

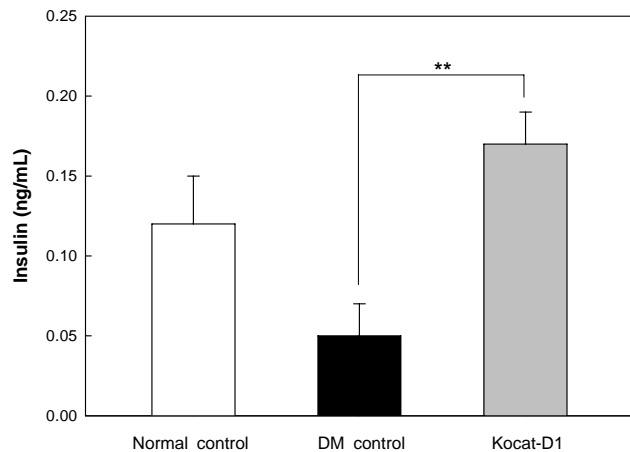


Fig. 4. The insulin level of C57BL/KsJ-db/db mice rat after 16 weeks. Each group and treated conditions were described in the legend of Fig. 3.

고 high density lipoprotein(HDL)-콜레스테롤이 상승되기도 한다. 그러나 혈당이 잘 조절되지 않는 경우 중성지방이 증가하며 특히 당뇨병성 신증(nephropathy)이 합병될 경우 HDL-콜레스테롤이 현저하게 감소한다고 알려져 있다. 이러한 중성지방의 증가는 인슐린 부족이 중성지방의 상승을 유도하고 중성지방이 체내에서 대사되는 것을 억제하기 때문이며, 이러한 증가 원인은 인슐린 저항성에 의해 인슐린이 작용하는 곳에서 그 작용을 방해하는 성질이 있기 때문이다(24). Table 1의 결과와 유사하게 정상군의 간조직 H&E 염색에서는 핵포가 뚜렷이 보이는 반면에, DM 대조군에서는 핵의 불규칙하게 흐트러진 모양과 막 틈새도 다수 관찰되었다. Kocat-D1의 경우 정상군과 유사한 간세포의 조직을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 또한 신장의 조직병리학적 PAS염색 결과에서도 Kosugi 등(25)이나 Siragy와 Xue(26)의 결과와 유사하게 장기간 고혈당이 유지된 db/db의 신장조직에서는 붉게 염색된 collagen이 뚜렷하게 관찰되었다. Collagen이 다량 축적된 상태는 당뇨병성 신증이 진행되고 있음을 의미한다. 그러나 Kocat-D1 처리군의 경우 collagen의 축적이 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

지금까지의 연구 결과를 종합해 볼 때 중국 광둥지역에서 자생하며 교고랍(絞股藍)이라고도 불리는 Kocat-D1은 3T3-L1 지방세포에서 인슐린 민감도를 증가시켜 포도당 흡수능을 증가시키는 활성을 가지고 있었다. 또한, 제2형 당뇨모델인 C57BL/KsJ-db/db mice에 Kocat-D1 추출물을 350 mg/kg/day(생시료 1 g/kg/day)로 16주간 자유급식 방식으로 투여한 결과 혈당이 유의적인 수준으로 낮아지는 것을 확인하였으며, 혈액 내 인슐린 농도는 증가되었다. Kocat-D1의 투여는 간이나 신장에서 고혈당으로 인한 여러 가지 당뇨병성 합병증을 억제하는 효과를 가지고 있는 것을 확인하였다.

현재까지 Kocat-D1은 박과(Cucurbitaceae)의 덩굴성 다년생 식물임을 확인하였다. 따라서 본 연구에 이어 Kocat-

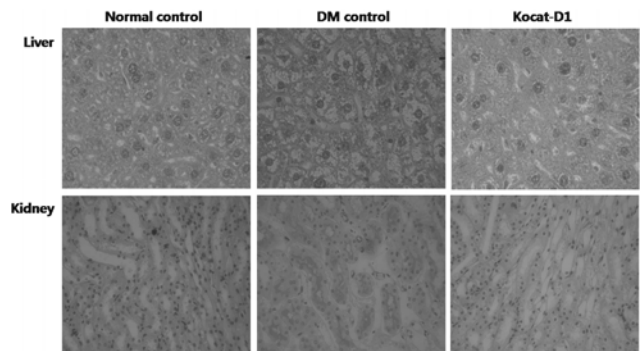


Fig. 5. Histological finding with H&E staining and PAS of C57BL/KsJ-db/db mice. Each group and treated conditions were described in the legend of Fig. 3. The livers and kidneys were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in cold polymerizing resin, and 5-μm sections were stained liver with hematoxylin and eosin and kidney with periodic acid-shiff base (PAS). Magnification ×400.

D1을 새로운 항당뇨 소재로 활용하기 위해서는 정확한 학명 규명 및 활성의 지표물질에 대한 연구와 그 작용 기전에 대한 심도 있는 연구가 필요하며, 이런 추가적인 부분이 진행 된다면 Kocat-D1은 당뇨병에 대한 기능성식품 및 의약품 소재로 활용가능하다고 판단된다.

요 약

본 연구는 중국 광둥지방에서 민간에서 널리 사용되는 Kocat-D1의 항당뇨 효능을 확인하기 위하여 진행하였다. Kocat-D1의 포도당 흡수능 증가 활성을 지방구세포인 3T3-L1을 이용하여 측정해본 결과, 0.2 nM 인슐린(낮은 인슐린 농도)만 투여한 대조군보다 0.2 nM 인슐린과 100°C 열수 추출물을 0.2 mg/mL의 농도로 같이 처리하였을 때 대조군보다 포도당 흡수능이 $165.0 \pm 0.7\%$ 로 증가하였다. 8주령의 C57BL/KsJ-db/db mice를 정상대조군(normal control, db/+ mice 비처리군), 당뇨대조군(DM control, db/db mice 비처리군) 및 Kocat-D1군(db/db mice에 Kocat-D1 100°C 열수 추출물을 350 mg/kg/day로 투여한 군)으로 나누었다. 16주간의 처리 후 체중과 식이 섭취량은 Kocat-D1군이 당뇨대조군보다 감소하였다. Kocat-D1군의 혈당은 14.7 ± 1.4 mmol/L였으며 당뇨대조군(27.1 ± 0.2 mmol/L)보다 유의적 수준으로 감소하였다. 인슐린 농도는 Kocat-D1 투여군이 0.17 ± 0.02 ng/mL로 당뇨대조군의 0.05 ± 0.02 ng/mL보다 증가하였다. 신장의 glomeruli 부분의 collagen 축적을 확인하기 위하여 periodic acid-shiff base(PAS)로 염색한 결과 Kocat-D1에서 PAS로 염색된 collagen 부분이 감소한 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린사업(200804010340490 090200)의 지원으로 수행하였으며, 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. IDF. 2008. 7th International Diabetes Federation-Western Pacific Region Congress. *Diabetes Res Clin Pract* 79: S1-S1.
2. Zhang W, Xu YC, Guo FJ, Meng Y, Li ML. 2008. Anti-diabetic effects of cinnamaldehyde and berberine and their impacts on retinol-binding protein 4 expression in rats with type 2 diabetes mellitus. *Chin Med J (Engl)* 121: 2124-2128.
3. King H, Aubert RE, Herman WH. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21: 1414-1431.
4. Han CK, Kim SS, Choi SY, Park JH, Lee BH. 2009. Effects of rice added with mulberry leaves and fruit on blood glucose, body fat and serum lipid levels in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1336-1341.
5. Liu F, Kim J, Li Y, Liu X, Li J, 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.
6. Aronne LJ, Nelinson DS, Lillo JL. 2009. Obesity as a disease state: a new paradigm for diagnosis and treatment. *Clin Cornerstone* 9: 9-25.
7. Fonseca V. 2006. The role of basal insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Insulin* 1: 51-60.
8. Lee HT, Lee KH, Park SY, Park HG, Kim RY, Kwon HY, Shin US. 2007. Analysis of oral antidiabetic agents prescribing in the outpatients of community hospital. *J Kor Soc Health-Syst Pharm* 24: 17-29.
9. Muller G, Wied S. 1993. The sulfonylurea drug, glibenclamide, stimulates glucose transport, glucose transporter translocation, and dephosphorylation in insulin-resistant rat adipocytes *in vitro*. *Diabetes* 42: 1852-1867.
10. Toyota T. 1999. Sulfonylurea drug—a new sulfonylurea drug for type 2 diabetes. *Nippon Rinsho* 57: 695-701.
11. Yale JF, Valiquett TR, Ghazzi MN, Owens-Grillo JK, Whitcomb RW, Foyt HL. 2001. The effect of a thiazolidinedione drug, troglitazone, on glycemia in patients with type 2 diabetes mellitus poorly controlled with sulfonylurea and metformin. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 134: 737-745.
12. Chang JH, Tseng CF, Wang JY. 2007. Hypoglycemia-induced myocardial infarction: an unusual adverse effect of sulfonylureas. *Int J Cardiol* 115: 414-416.
13. Makom Ndifossap IG, Frigerio F, Casimir M, Tsosok FN, Dongo E, Kamtchouing P, Dimo T, Maechler P. 2010. *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) stem-bark extract corrects glycaemia in diabetic rats and acts on beta-cells by enhancing glucose-stimulated insulin secretion. *J Endocrinol* 205: 79-86.
14. Anand P, Murali YK, Tandon V, Murthy PS, Chandra R. 2009. Insulinotropic effect of aqueous extract of *Brassica nigra* improves glucose homeostasis in streptozotocin induced diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117: 251-256.
15. Chattopadhyay RR. 1999. Possible mechanism of antihyperglycemic effect of *Azadirachta indica* leaf extract: part V. *J Ethnopharmacol* 67: 373-376.
16. Ko BS, Choi SB, Park SK, Jang JS, Kim YE, Park S. 2005. Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from *Cortidis rhizoma*. *Biol Pharm Bull* 28: 1431-1437.
17. Won HJ, Lee HS, Kim JT, Hong CH, Koo YC, Lee KW. 2010. The anti-diabetic effects of Kocat-D1 on streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food Sci Technol* 42: 204-209.
18. Roffey BW, Atwal AS, Johns T, Kubow S. 2007. Water extracts from *Momordica charantia* increase glucose uptake and adiponectin secretion in 3T3-L1 adipose cells. *J Ethnopharmacol* 112: 77-84.
19. Kim DY, Ryu SY, Lim JE, Lee YS, Ro JY. 2007. Anti-inflammatory mechanism of simvastatin in mouse allergic asthma model. *Eur J Pharmacol* 557: 76-86.
20. 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 PPAR gamma and PPAR alpha in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. *FEBS Lett* 514: 315-322.
21. Kwon DY, Jang JS, Lee JE, Kim YS, Shin DH, Park S. 2006. The isoflavonoid aglycone-rich fractions of Chungkookjang, fermented unsalted soybeans, enhance insulin signaling and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity *in vitro*. *Biofactors* 26: 245-258.

22. Kodama H, Fujita M, Yamaguchi I. 1994. Development of hyperglycaemia and insulin resistance in conscious genetically diabetic (C57BL/KsJ-db/db) mice. *Diabetologia* 37: 739-744.
23. Capeau J. 2008. Insulin resistance and steatosis in humans. *Diabetes Metab* 34: 649-657.
24. Kantartzis K, Peter A, Machicao F, Machann J, Wagner S, Konigsrainer I, Konigsrainer A, Schick F, Fritsche A, Haring HU, Stefan N. 2009. Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. *Diabetes* 58: 2616-2623.
25. Kosugi T, Nakayama T, Heinig M, Zhang L, Yuzawa Y, Sanchez-Lozada LG, Roncal C, Johnson RJ, Nakagawa T. 2009. Effect of lowering uric acid on renal disease in the type 2 diabetic db/db mice. *Am J Physiol-Renal* 297: F481-F488.
26. Siragy HM, Xue C. 2008. Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats. *Exp Physiol* 93: 817-824.

(2010년 1월 21일 접수; 2010년 2월 9일 채택)