

## The Extracts from *Liriope platyphylla* Significantly Stimulated Insulin Secretion in the HIT-T15 Pancreatic $\beta$ -Cell Line

Ji Ha Kim, Ji Eun Kim, Yoen Kyung Lee, So Hee Nam, Youn Kyung Her, Seoung Wan Jee<sup>1</sup>, Sun Guen Kim<sup>2</sup>, Da Jung Park<sup>2</sup>, Young Whan Choi<sup>2</sup> and Dae Youn Hwang\*

Department of Biomaterials Science, College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

<sup>1</sup>Department of Laboratory Animal Resources, National Institute of Toxicological Research, Korean FDA, Seoul 122-704, Korea

<sup>2</sup>Department of Horticultural Bioscience, College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Received March 2, 2010 / Accepted April 15, 2010

*Liriope platyphylla* has traditionally been used in Korea and China as a therapeutic drug for the treatment of coughing, sputum, neurodegenerative disorders, obesity, and diabetes. In an effort to assess the functions of a novel extract from *Liriope platyphylla* in diabetes therapy, the insulin secretion abilities of 10 extracts were screened via measurements of insulin concentration in the culture supernatant using an Insulin ELISA kit. The results of this assay showed the highest levels of insulin in the LP9M80-H treated group, followed by the LP-H, LP-M, LP-E and LP9M80-C treated groups, whereas other extracts did not induce insulin secretion in the HIT-T15 cells. However, the extracts capable of stimulating insulin secretion simultaneously evidenced high apoptotic activity as compared with other extracts. Therefore, one of these extracts, LP9M80-H, was initially selected as the optimal candidate for a therapeutic drug and its optimal concentration was determined. The results of the ELISA and MTT assay demonstrated that a concentration of approximately 100-125  $\mu$ g/ml of LP9M80-H was optimal with regards to cell viability and insulin secretion in the HIT-T15 cells. These results suggest that LP9M80-H could be considered as an excellent candidate for a diabetes-therapeutic drug that could induce insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells.

**Key words** : *Liriope platyphylla*, insulin, MTT assay, diabetes

### 서 론

맥문동(*Liriope platyphylla*)은 북반구의 온대지방에 널리 분포하는 다년생식물로서 근경(vegetative rhizomes)과 종자를 통해 번식할 수 있는 식물로 알려져 있다. 우리나라에서는 표고가 500 m 이하의 낮은 야산에서 주로 분포하고 있으며, 잎은 연중 녹색을 유지한다[4].

오랫 동안, 맥문동은 한국과 중국에서 기침, 가래 등의 질병 치료제로 한방에서 주로 사용되어져 왔으며, 최근에는 당뇨 치료, 기억력 증진, 미생물 억제, 염증 억제 등의 기능이 알려지면서 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 효능 중에서 항미생물제와 항염증제로서의 기능은 가장 오랫동안 연구되어오고 있는 분야이다. 항미생물제는 일반적으로 sortase의 활성저해력을 관찰함으로써 평가하는데, 맥문동은 이들 효소를 강하게 저해하는 효과를 나타내었다[9]. 항염증제로서의 기능은 천식마우스 모델에서 맥문동이 airway inflammation과 hyper-responsiveness를 저해하는 효과가 있었으며, Th1/Th2 cytokine의 불균형을 조절하는 immunomodulator로서 기능이 알려져 있다[12]. 또한 맥문동은 neurotrophic factor의 분비촉진

을 통한 신경세포의 활성화를 유도한다. 맥문동의 butanol extract는 C6와 primary astrocyte cells로부터 신경세포의 분화와 성장에 중요한 nerve growth factor의 분비를 촉진시키며 [5], 맥문동에서 분리한 Spicatoside A는 PC12 cells에서 tyrosin kinase A receptor pathway를 통해 neurite outgrowth를 촉진시키는 효과가 있다[6]. 뿐만 아니라, 맥문동의 ethanol extract를 14일 동안 투여한 마우스는 BDNF나 NGF 발현증가에 의해 기억력과 학습력이 증가됨을 관찰하였다[13]. 한편 일부 연구자들은 맥문동이 당뇨와 비만에 미치는 영향에 대한 연구결과를 보고하였다. Choi 등[2]은 맥문동의 homoisoflavone-enriched fraction을 분리하여 3T3-L1 adipocytes에 처리하여 인슐린과 glucose uptake정도를 관찰하였으며, 그 결과 이러한 추출물이 인슐린 sensitizer로서 기능을 함을 보고하였다. 또한 OLEFT 비만 랫드에 8주 동안 맥문동이 첨가된 경신장증환을 투여하여 체중, leptin 농도, 먹이섭취량, PPAR $\gamma$  발현감소 현상 등을 관찰하였다[7]. 그러나 최근까지도 실제 인슐린을 분비하는 췌장베타세포를 이용하여 인슐린 분비를 촉진시키는 새로운 물질을 검색하는 연구는 수행된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 건조맥문동과 포제맥문동으로부터 10가지 추출물을 췌장베타세포에 처리하여 이들 세포에 미치는 독성과 인슐린 분비능을 측정하고자 하였다. 그 결과 인슐린 분비 유도능이 우수한 5가지 물질을 확인할 수 있었으며,

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-350-5388, Fax : +82-51-350-5389

E-mail : dyhwang@pusan.ac.kr

이들 물질은 향후 체계적인 연구를 수행하여 *in vivo* 기능을 관찰한다면 새로운 치료제로서 가능성이 높을 것으로 사료된다.

## 재료 및 방법

### 맥문동의 포제 및 추출

맥문동(*Liriope platyphylla*)은 2009년 5월에 채취하여 잘 건조하여 청결한 것을 선별하여 사용하였다. 50°C의 열풍건조기에서 5일 동안 건조한 건조맥문동 1,676.42 g을 믹서기(한일, 한국)로 완전히 분쇄한 다음, 건물중 당 각각의 용매 3배액으로 3회 추출하여 회전증발기로 농축하였다. 추출방법은 1,676.42 g에 헥산(hexane) 3배액을 가하여 1시간 동안 초음파 분해(sonication)시킨 후, Whatam No. 2 여과지로 필터하였으며, 이와 동일한 방법을 3회 반복하여 얻은 추출물을 회전증발기로 농축하여 헥산 추출물(LP-H)을 얻었다. 기타 에틸아세테이트(LP-E), 100% 메탄올(LP-M), 80% 메탄올(LP-80M), 50% 메탄올(LP-50M), 및 20% 에탄올(LP-20M)도 헥산 추출물과 유사한 방법으로 추출하였다.

맥문동의 포제는 20 kg의 생맥문동을 약 1시간 동안 전통 곡주에 완전히 잠기도록 침전시킨 후 300~400°C의 가마솥 시루에서 수증기를 이용하여 약 20~30분 동안 찌다. 찌낸 맥문동이 영키지 않도록 잘 섞은 후 일정시간 동안 음건한 다음, 다시 전통곡주를 가하여 완전히 흡수시킨 다음 가마솥에서 동일한 온도와 시간동안 찌서 말리기를 9회 반복하여 포제맥문동을 만들었다.

포제맥문동의 추출방법은 1,000 g을 믹서기로 완전히 분쇄한 다음 80% 메탄올 3 l를 첨가하여 1시간 동안 초음파 분해(sonication)하여 용액을 회수하고, 남은 찌꺼기에 80% 메탄올을 첨가하여 3회 반복하여 추출하였다. 80% 메탄올 추출물은 Whatam No. 2 여과지로 필터하였으며, 80% 메탄올 추출물과 동량의 헥산을 분획여두에 부은 다음 흔들어서 실온에 방치하였다. 일정한 시간이 지난 후 헥산층을 회수하였으며, 이와 동일한 방법을 3회 반복하여 헥산 추출물을 얻었다(LP9M80-H). CHCl<sub>3</sub>와 부탄올(BuOH) 추출물도 헥산 추출물과 동일한 방법으로 분획하여 각각의 추출물 LP9M80-C와 LP9M80-B를 얻었다. 80% 메탄올 추출물은 헥산, CHCl<sub>3</sub> 및 부탄올(BuOH) 분획으로 추출한 다음 남은 액체를 회전농축기로 농축하였다(LP9M80).

### 맥문동 추출물의 준비

맥문동에서 추출한 10가지의 추출물인 LP-H, LP-E, LP-M, LP-M80, LP-M50, LP-H20, LP9M80-H, LP9M80-C, LP9M80-B, LP9M80를 최종 농도가 200 ug/ml가 되도록 DMSO (sigma, USA)로 희석시켜 실험에 사용하였다.

### 세포배양

인슐린세포의 일종인 HIT-T15는 한국세포주은행에서 분양

받아 계대배양하면서 사용하였다. 세포는 RPMI1640 (invitrogen. Co, USA)배지에 10%인 FBS (invitrogen. Co, New Zealand 10091-148), 100 mu/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin을 첨가한 배지를 이용하여 37°C 온도와 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 조건하에서 배양하였다.

### MTT assay

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)(sigma chemical Co. USA, 042K5313)는 살아있는 세포 내 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 formazan을 형성하게 되는데, 용해액 내 보라색 formazan의 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 세포 생존률을 예측하는 실험방법으로 이용되고 있다[3]. 맥문동 추출물이 인슐린 세포주 HIT-T15 cell에 미치는 독성을 평가하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2×10<sup>4</sup> cells이 들어가도록 분주한 후 배양접시에서 70-80% 자랄때까지 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 여기에 맥문동 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하여 기존의 배지를 일부 제거고, MTT용액 50 µl을 첨가하여 formazan이 형성될 수 있도록 4시간 동안 배양하였다. 4시간 뒤, 배지 220 µl를 제거한 후 150 µl DMSO를 이용하여 formazan을 녹였다. 각 well에 나타난 색깔의 변화를 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

### 인슐린 분비량 측정을 위한 Insulin ELISA측정

맥문동추출물에 의한 인슐린 분비량은 Mercodia사의 Insulin ELISA kit (Cat.10-1113-01)를 이용하여 권장법에 따라 측정하였다. 먼저 인슐린분비세포인 HIT-T15 cell을 96 well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 분주한 후 70-80%로 자랄때까지 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에 배양하였다. 그리고 각 well에 맥문동 추출물을 200 µg씩 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 배양액을 채취하여 15,000 rpm에서 3분 동안 세포를 침전시켜 상층액을 준비하였다. ELISA kit의 각 well에 25 µl의 배양액을 넣고, 100 µl의 enzyme conjugate solution을 첨가하여 plate shaker에 1시간 동안 방치하여 항원-항체반응을 유도하였다. 1시간 후 상층액을 제거하고, wash buffer (350 µl)를 이용하여 비특이적으로 결합된 단백질이나 결합되지 않은 단백질을 세척하였다. 여기에 200 µl의 substrate (TMB)을 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤 50 µl의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였다. 반응종결에 따라 나타난 변화는 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

### 통계분석

실험군과 vehicle 처리군간의 실험 결과에 대한 유의성은

One way ANOVA를 이용하여 분석하였고,  $P$ -value<0.05를 유의성이 있는 값으로 인정하였으며, 실험 결과는 means±SD로 제시하였다.

### 결 과

#### 맥문동 추출물이 세포생존율에 미치는 영향

맥문동 추출물이 채장유래 세포주 HIT-T15 cells에 미치는 독성을 분석하기 위하여 10가지 추출물을 500 µg/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 후 MTT분석을 실시하였다. 그 결과, LP-H, LP-E LP9M80-H는 매우 강하게 세포독성을 나타내어 약 80-90%정도의 세포를 사멸시키는 것으로 관찰되었다. LP9M80-C는 약 60% 정도의 세포사멸을 유도하였으며, LP-M, LP-M80, LP9M80-B는 10-20%의 세포독성을 나타내었다. 그러나 LP-M50, LP-H20, LP9M80은 세포 독성이 거의 없거나 오히려 세포의 증식을 유도하는 것으로 관찰되었다(Fig. 1A). 또한 이러한 물질을 1/2로 희석하여 처리하여도 전체적

으로는 250 µg/ml와 매우 유사한 양상을 나타내었으나 일부 물질의 독성은 약간의 차이를 나타내었다. 특히 LP-M, LP9M80-C는 오히려 독성이 증가하는 경향을 나타내었고, LP-M80과 LP-M50은 세포독성이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 또한 MTT분석과 동시에 세포의 형태를 현미경으로 관찰하였으며, 세포의 형태도 MTT결과와 유사하게 관찰되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 맥문동 추출물 중에서 일부는 강한 세포독성을 나타내지만 일부는 오히려 세포증식을 나타내는 물질도 있음을 시사한다.

#### 맥문동 추출물이 인슐린 분비에 미치는 영향

맥문동의 10가지 추출물에 대한 세포독성시험결과를 바탕으로 채장세포주로부터 인슐린 분비 유도능을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 그 결과, HIT-T15 cells의 인슐린 분비에 영향을 주는 물질은 크게 3가지로 분류할 수 있었다. 첫째는 인슐린 분비를 강하게 자극하는 물질로서 여기에는 LP9M80-H가 해당된다. 이 물질은 약 35 mU/l까지 인슐린 농도를 증가시켜 정상수준과 비교할 때 약 8-10배까지 증가시키는 효과가 있는 것으로 관찰되었다. 두 번째 그룹은 중간수준까지 인슐린 분비를 촉진시키는 물질로서 LP-H가 해당된다. 이 물질은 19.7 mU/l까지 인슐린 분비를 촉진시키며, 정상수준의 약 6-7배의 분비를 유도하였다. 세 번째 그룹은 정상수준의 2-3배까지 인슐린 분비를 촉진시키는 물질로서 LP-E, LP-M, LP9M80-C가 포함되었다. 하지만 다른 물질을 처리한 그룹에서는 특별한 인슐린의 증가를 나타내지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과는 맥문동 추출물 중에서 인슐린 분비를 유도할 수 있는 탁월한 기능이 있는 5가지 물질이 존재함을 제시하고 있다.

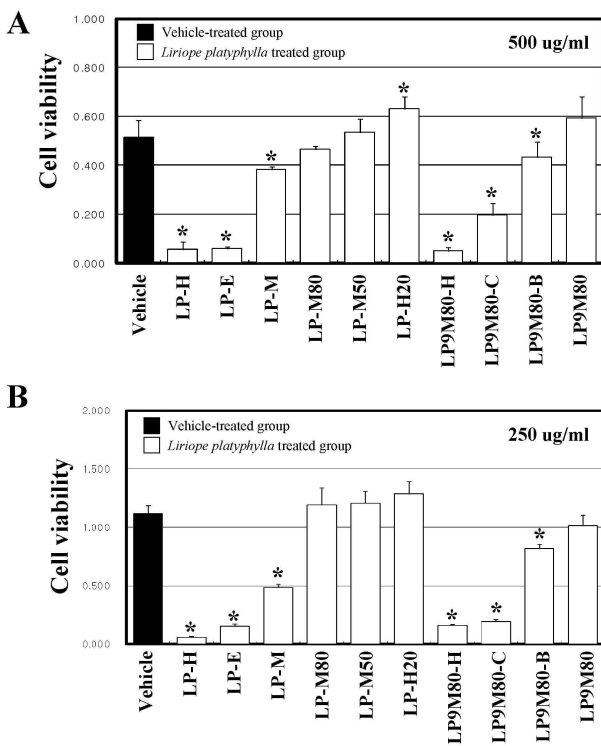


Fig. 1. Effect of ten extracts on the cell viability of HIT-T15 cell line. Cells were cultured with one of the ten extracts in DMSO at two concentrations (A; 500 µg/ml, B; 250 µg/ml) for 24 hr. Vehicle-treated cell were treated with DMSO as using the dissolving agents of ten extracts. Activity of cell viability was measured using MTT assay. The values of data represented mean±SD of three experiments. \* $p$ <0.05 is the significance level compared to the vehicle treated group.

#### LP9M80-H의 인슐린분비 적정농도의 설정

MTT 분석과 인슐린 분비능의 실험결과를 맥문동 추출물 중에서 인슐린 분비를 유도하는 물질은 동시에 500 µg/ml의 농도에서 강한 세포독성을 나타냄을 제시하고 있다. 따라서 실제로 이들을 적용하기 위해서는 세포독성을 나타내지 않는 농도를 결정할 필요가 있다. 이를 위하여 먼저 가장 강력히 인슐린 분비를 촉진시키는 물질인 LP9M80-C를 이용하여 농도 의존적인 생존율 측정실험을 실시하였다. 그 결과, 500 µg/ml 농도에서는 세포생존율이 매우 낮았으나 125 µg/ml 농도에서부터는 거의 독성이 없음을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 또한 독성이 없는 농도에서 인슐린 분비를 관찰한 결과, 인슐린은 500 µg/ml 농도에서부터 125 µg/ml 농도까지 거의 유사한 수준으로 분비됨을 관찰하였다. 그러나 62.5 µg/ml 농도에서는 30%정도 감소하고, 31.3 µg/ml 농도에서는 거의 분비를 유도하지 못함을 관찰하였다(Fig. 4B). 따라서 이러한 결과는 LP9M80-H가 100~125 µg/ml 농도에서 세포독성이 없이 인슐린 분비를 유도하도록 사용 가능할 것으로 사료된다.

또한, 실험결과에서 인슐린 분비량의 증가원인이 세포의 사멸에 따른 세포내의 프로인슐린(pro-insulin) 혹은 c-펩타이드

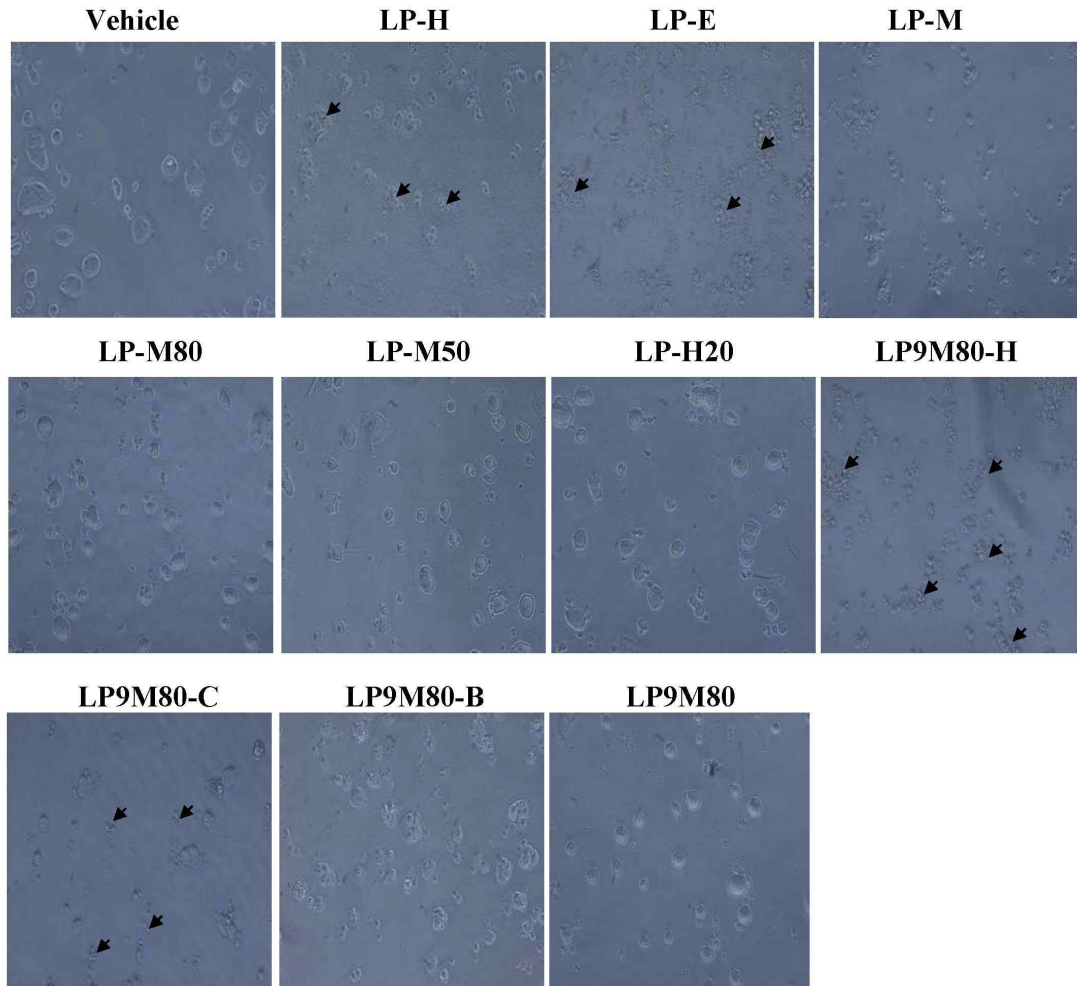


Fig. 2. Microscope images of HIT-T15 cells after 24 hrs of treatment with ten extracts at 500 µg/ml concentrations. Vehicle-treated group were treated with DMSO as using the dissolving agents of ten compounds. Cellular morphology was viewed at 20x magnification. Arrow head indicated the dead cells.

(c-peptide)와의 결합에 의해서 나타난 결과가 아님을 증명하기 위하여 세포사를 유도하는 물질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1 mM 농도로 24시간 동안 처리한 후 얻어진 배양액과 homogenizer를 이용하여 세포를 물리적으로 파괴한 후 얻어진 세포추출액을 이용하여 인슐린을 측정하는 대조실험을 실시하였다. 그 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 세포사를 유도한 후 얻어진 세포배양액과 homogenizer를 이용하여 세포를 파괴하여 얻은 추출액에서 인슐린은 매우 적은 양으로 검출되었다(Fig. 5). 따라서 이러한 결과는 본 실험에서 확인한 LP9M80-H 처리에 의한 인슐린 분비는 세포의 파괴에 의해 분비되는 프로인슐린이나 다른 단백질에 의한 반응이 아님을 제시하고 있다.

### 고 찰

당뇨병(diabetes)은 인슐린 분비의 이상, 탄수화물과 지질 대사의 이상을 나타내는 질병으로, 혈당의 증가여부를 이용하

여 진단한다. 이러한 질병은 심혈관질환 사망률와 신증(nephropathy), 신경장애(neuropathy), 망막증(retinopathy)의 발생과 관련된 사망률 증가의 원인으로 지목되는 중요한 건강관련 질병이다[17]. 당뇨병의 발병기전으로는 크게 두 가지가 알려져 있으며, 하나는 췌장베타세포가 기능을 상실하여 인슐린을 분비하지 못하게 된다. 또 다른 하나는 인슐린이 정상적으로 분비되어도 근육조직의 인슐린 수용체(receptor)가 기능을 상실하여 세포내 인슐린의 신호전달에 이상이 발생하는 것이다[1]. 당뇨병은 크게 소아형 당뇨(제1형당뇨)와 성인형 당뇨(제2형당뇨)로 나누어진다. 제1형당뇨는 선천적인 이유 혹은 바이러스 감염 등으로 인해 췌장베타세포의 파괴로 인해 인슐린이 정상적으로 분비되지 못하는 경우이며, 지금까지 인슐린을 투여함으로써 치료가 가능하여 이를 인슐린 의존성 당뇨병(Insulin dependent diabetes)이라 한다. 그러나 제2형당뇨는 췌장베타세포에서 인슐린은 정상적으로 생산되지만 이들이 분비되지 못하거나 혹은 근육조직 내에 수용체의

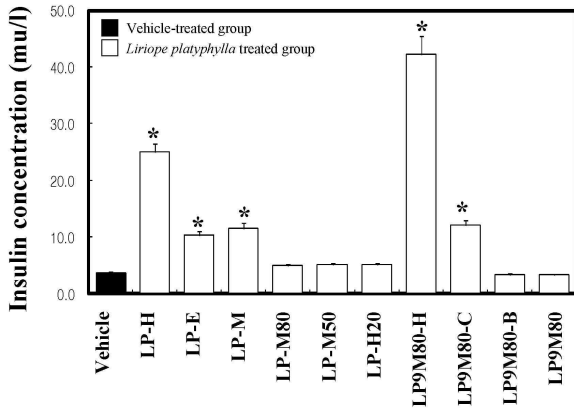


Fig. 3. Stimulation effects of extracts on the insulin secretion of HIT-T15 cells. Cells were cultured with one of the ten extracts in DMSO at 500 µg/ml concentrations for 24 hr. The culture supernatant were collected from each cells. An insulin concentration in the supernatants was measured using anti-insulin ELISA kit. The values of data represented mean±SD of three experiments. \* $p < 0.05$  is the significance level compared to the vehicle treated group.

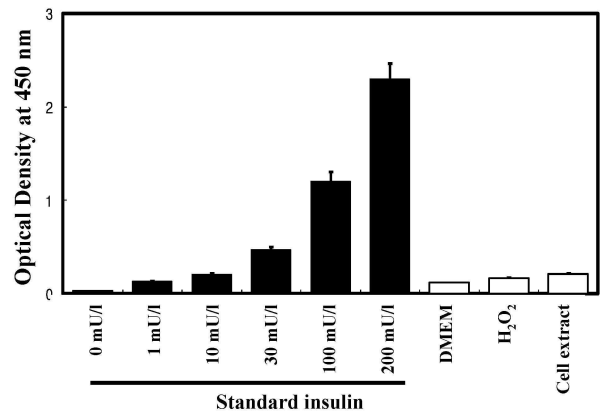


Fig. 5. Non-specific crossreaction effects on insulin ELISA kit. Samples were collected from cells supernatant cultured with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hr and homogenate mixture of HIT-T15 cells. Insulin concentration in the samples was measured using anti-insulin ELISA kit. The values of data represented mean±SD of three experiments.

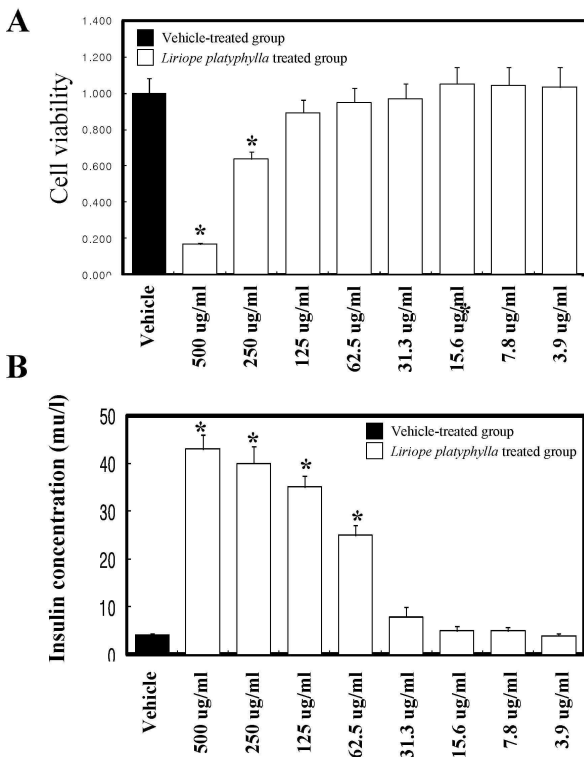


Fig. 4. Dose-dependent effects of LP9M80-H on the cell viability and insulin secretion. Cells were cultured with LP9M80-H extracts in DMSO at various concentrations for 24 hr. Cell viability was measured using MTT assay and an insulin concentration in the supernatant was measured using anti-insulin ELISA kit. The values of data represented mean±SD of three experiments. \* $p < 0.05$  is the significance level compared to the vehicle treated group.

이상으로 정상적인 신호전달과정이 발생하지 못하는 경우이며, 인슐린 비의존성당뇨(Non-insulin dependent diabetes)라 한다[17,18]. 따라서, 인슐린은 당뇨치료제의 매우 좋은 표적대상이며, 본 연구에서도 일차적으로 이러한 인슐린의 분비를 촉진시키는 새로운 물질을 검색하고자 하였다.

당뇨환자의 급속한 증가에 따라 최근까지 다양한 당뇨치료제들이 개발되어 판매되고 있다. 이들 치료제의 대부분은 경구용 혈당조절제가 가장 일반적이며, 이들은 당뇨의 여러 가지 원인 중에서 한 가지 혹은 두 가지에만 작용하도록 개발되고 있다. 이러한 경구용 혈당조절제는 설펜요소제(Sulfonylurease)계통, 비구아나이드(Biguanides)계통, 아카보즈(Acarbose)계통, 다이어자이드(Thiazide)계통 등 4가지로 분류할 수 있다[10]. 설펜요소제(Sulfonylurease)계통의 의약품들은 체장베타세포에서 인슐린 분비를 촉진시키는 역할을 하며[11], 비구아나이드(Biguanides)계통의 의약품들은 인슐린의 작용을 촉진하면서 간에서 분비되는 혈당을 줄여 혈당을 조절하는 효과를 나타낸다[15]. 그리고 아카보즈(Acarbose)계통의 의약품들은 당이 소화되는 것을 늦춰 줌으로써 식후 혈당이 급속히 증가하는 것을 막아주는 효능이 있으며[14], 다이어자이드(Thiazide)계통의 의약품들은 인슐린 수용체의 발현을 증가시켜 인슐린 내성을 개선하고, 포도당의 흡수와 저장을 증가시키며, 간세포에서 포도당의 형성을 억제하는 효과가 있다[16]. 그러나 이러한 혈당조절제들은 장기간 복용할 경우, 신장질환이나 간질환 등의 부작용이 있는 것도 알려져 있어 부작용이 없는 새로운 제품을 개발하려는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 따라서 본 연구는 이러한 문제를 고려하여 약용식물로 사용되는 맥문동을 이용하여 새로운 치료가능 물질을 선별하고 새로운 치료제로서의 가능성을 평가하고자 하였다.

본 연구에서는 건조맥문동 또는 포제맥문동으로부터 총 10

가지를 추출물을 이용하였으며, 이들이 췌장베타세포의 인슐린 분비에 미치는 영향을 분석하였다. 이들 중에서 5가지 추출물이 인슐린의 분비를 촉진시키는 효과가 있었으며, 특히 LP9M80-H는 매우 강한 효과를 나타내었다. 다음으로는 LP-H가 강한 효과를 나타내었고, LP-E, LP-M, LP9M80-C는 유사한 효능을 나타내었다. 이러한 효능은 췌장베타세포를 자극하여 인슐린 분비를 촉진하는 효과를 나타내는 설폰요소계(Sulfonylurease)계통의 의약품들과 매우 유사한 기능을 수행하는 것으로 추측된다[11]. 이들 5가지 물질 중에서 먼저 가장 효능이 좋은 LP9M80-H를 대상으로 적정농도 설정분석을 실시하였다. 이들 물질은 500 µg/ml을 처치했을 강한 독성을 나타내어 세포의 사멸을 유도하므로 점진적으로 농도를 감소시키면서 세포사멸을 유도하지 않는 농도를 확인하였고, 이러한 농도에서도 인슐린 분비능이 유지됨을 관찰하였다. 그 농도는 약 100-125 µg/ml인 것으로 확인하였다.

체내의 인슐린을 측정하기 위해서는 몇 가지 방법이 개발되어 사용되고 있다. 1960년대에 Yalow와 Berson [19]에 의해서 보고된 인간의 혈청에서 radioimmunoassay (RIA)는 미량의 인슐린까지도 확인할 수 있어 생명과학분야와 의학분야에서 지속적으로 사용되어 왔다[20]. 그러나 이러한 방법은 인체에 해롭고 엄격한 시설을 갖추어야 하는 방사선동위원소를 사용해야 하는 단점을 갖고 있어 최근에는 방사선을 사용하지 않고 항체를 이용한 ELISA방법이 많이 사용되고 있다. 그러나 새로운 ELISA방법은 RIA처럼 미량을 측정할 수 없는 단점을 갖고 있다. 본 연구에서는 Mercodia사의 인슐린 ELISA kit를 사용하여 세포 배양액내의 사람의 인슐린을 측정하였다. 사용된 ELISA kit는 solid phase two-site enzyme immunoassay로서 두 개의 monoclonal 항체가 인슐린을 인식하는 direct sandwich 기술이 적용된 것이다. 또한 이 kit는 프로인슐린과 c-펩타이드에 대한 crossreaction이 0.01% 이하이며, 랫드와 마우스 인슐린에 대해서는 각각 0.7%와 0.3%의 crossreaction이 있고, detection limit은 1 mU/l로 알려져 있다[21]. 따라서 본 실험의 결과에서 MTT에 의해 측정된 세포사와 인슐린의 분비량과의 상관성 때문에 맥문동 추출물질이 세포사를 유발하고 세포가 파괴되면서 분비된 인슐린이 관찰될 수 있다는 가정할 수 있으나 이러한 점은 다른 세포사 유발물질을 이용한 대조실험과 ELISA kit의 특성을 고려하면 가능성이 낮은 것으로 사료된다.

따라서 본 논문에서는 맥문동으로부터 새로운 치료가능 후보물질을 선별하기 위하여 췌장베타세포를 인슐린 분비능을 조사한 결과, 그 중에서 분비유도능이 우수한 LP9M80-H를 선정하여 생체적용 가능농도를 설정하였다. 향후 이들 물질을 직접 실험동물에 투여하여 *in vivo* 인슐린 분비능과 혈당조절 기능에 대한 연구가 수행된다면 새로운 치료제로서 가능성이 매우 클 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술관리센터에 의해 지원된 사업(관리번호: 20080524)이며, 세포촬영에 도움을 주신 부산대학교 정영화 교수님께 진심으로 감사드립니다.

## References

- Atalay, M. and D. E. Laaksonen. 2002. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *J. Sport Sci. Med* **1**, 1-14.
- Choi, S. B., J. D. Wha, and S. Park. 2004. The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway. *Life Sci* **75**, 2653-2664.
- Gerlier, D. and N. Thomasset. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* **94**, 57-63.
- Huh, M. K., H. W. Huh, J. S. Choi, and B. K. Lee. 2007. Genetic diversity and population structure of *Liriope platyphylla* (Liliaceae) in Korea. *J. Life Sci* **17**, 328-333.
- Hur, J., P. Lee, J. Kim, A. J. Kim, H. Kim, and S. Y. Kim. 2004. Induction of nerve growth factor by butanol fraction of *Liriope platyphylla* in C6 and primary astrocyte cells. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1257-1260.
- Hur, J., P. Lee, E. Moon, I. Kang, S. H. Kim, M. S. Oh, and S. Y. Kim. 2009. Neurite outgrowth induced by spicatoside A, a steroidal saponin, via the tyrosine kinase A receptor pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **620**, 9-15.
- Jeong, S., K. Chae, Y. S. Jung, Y. H. Rho, J. Lee, J. Ha, K. H. Yoon, G. C. Kim, K. S. Oh, S. S. Shin, and M. Yoon. 2008. The Korean traditional medicine Gyeongshingangjeehwan inhibits obesity through the regulation of leptin and PPARalpha action in OLETF rats. *J. Ethnopharmacol.* **119**, 245-251.
- Kahn, C. R. and J. Roth. 2004. Berson, Yalow, and the JCI: the agony and the ecstasy. *J. Clin. Invest.* **114**, 1051-1054.
- Katon, W., J. Russo, E. H. B. Lin, S. R. Heckbert, A. J. Karter, L. H. Williams, P. Ciechanowski, E. Ludman, and M. Von Korff. 2009. Diabetes and poor disease control: Is comorbid depression associated with poor medication adherence or lack of treatment intensification? *Psychosom. Med.* **71**, 965-972.
- Kim, S. W., I. M. Chang, and K. B. Oh. 2002. Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by medicinal plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2751-2754.
- Krentz, A. J. and C. J. Bailey. 2005. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* **65**, 385-411.
- Krentz, A. J., M. B. Patel, and C. J. Bailey. 2008. New drugs for type 2 diabetes mellitus: what is their place in therapy? *Drugs* **68**, 2131-2162.
- Lee, Y. C., J. C. Lee, Y. B. Seo, and Y. B. Kook. 2005. *Liriope* tuber inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. *J.*

- Ethnopharmacol.* **101**, 144-152.
14. Lindstrom, T., C. A. Hedman, and H. J. Arnqvist. 2002. Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* **25**, 1049-1054.
  15. Mun, J. H., S. G. Lee, D. H. Kim, J. W. Jung, S. J. Lee, B. H. Yoon, B. Y. Shin, S. H. Kim, and J. H. Ryu. 2007. Neurotrophic factors mediate memory enhancing property of ethanolic extract of *Liriope platyphylla* in mice. *J. App Pharmacol.* **15**, 83-88
  16. Oyama, T., A. Saiki, K. Endoh, N. Ban, D. Nagayama, M. Ohhira, N. Koide, Y. Miyashita, and K. Shirai. 2008. Effect of acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor, on serum lipoprotein lipase mass levels and common carotid artery intima-media thickness in type 2 diabetes mellitus treated by sulfonylurea. *J. Atheroscler. Thromb.* **15**, 154-159.
  17. Paglia, M. J. and D. R. Coustan. 2009. The use of oral anti-diabetic medications in gestational diabetes mellitus. *Curr. Diab. Rep.* **9**, 287-290.
  18. Pérez, N., J. Moisan, C. Sirois, P. Poirier, and J. P. Grégoire. 2009. Initiation of insulin therapy in elderly patients taking oral antidiabetes drugs. *CMAJ* **180**, 1310-1316.
  19. Yalow, R. S. and S. A. Berson. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* **39**, 1157-1175.
  20. Zimmet, P. and P. Lefebvre. 1996. The global NIDDM epidemic. Treating the disease and ignoring the symptom. *Diabetologia* **39**, 1247-1248.
  21. Zimmet, P. Z., D. J. McCarty, and M. P. de Courten. 1997. The global epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *J. Diabetes Complications* **11**, 60-68.

초록 : HIT-T15 췌장세포의 인슐린분비 촉진을 유도하는 맥문동(*Liriope platyphylla*) 추출물의 효능 및 독성분석

김지하 · 김지은 · 이연경 · 남소희 · 허윤경 · 지승원<sup>1</sup> · 김선건<sup>2</sup> · 박다정<sup>2</sup> · 최영환<sup>2</sup> · 황대연\*

(부산대학교 생명자원과학대학 바이오소재과학과, <sup>1</sup>식품의약품안전연구원 실험동물자원과, <sup>2</sup>부산대학교 생명자원과학대학 원예생명과학과)

맥문동(*Liriope platyphylla*)은 한국과 중국에서 전통적으로 당뇨, 비만, 뇌신경질환, 천식 등의 치료를 위해 사용 해온 치료제이다. 최근에 이들 맥문동으로부터 새로운 치료제를 개발하려는 노력이 활발히 진행 중이지만 아직도 유력한 치료후보제는 확보되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 맥문동의 새로운 추출물을 이용하여 당뇨치료제로서의 가능성을 평가하기 위하여 새로운 방법으로 10가지 후보물질을 추출하고 이들의 독성과 효능을 평가하였다. 그 결과 10가지 추출물 중에서 LP9M80-H가 인슐린 분비를 가장 많이 촉진하였고 다음으로는 LP-H, LP-M, LP-E과 LP9M80-C 등의 순서로 촉진을 하였으나 나머지는 인슐린 분비를 촉진하지 못하였다. 그러나 이들 물질은 인슐린 분비를 촉진하는 농도에서 강한 세포 독성을 나타내었다. 따라서 이들 물질 중에서 가장 효능이 좋은 LP9M80-H의 치료용 최적농도를 설정하였으며, 대략 100-25 ug/ml가 최적농도로 결정되었다. 이러한 결과는 맥문동 추출물 중에서 LP9M80-H가 췌장  $\beta$ -세포의 인슐린 분비능을 유도하는 새로운 당뇨치료 후보물질로서 향후에 사용될 가능성을 시사하고 있다.