

## 팔미트 지방산으로 자극된 혈관내피세포에서 대황 및 목단피가 염증 및 인슐린 저항성에 미치는 효과

이준서 · 이재철 · 윤용갑\*  
원광대학교 한의과대학 방제학교실

### Effects of *Rhei Rhizoma* and *Moutan Cortex* on Inflammation and Insulin Resistance in Endothelial Cells Stimulated with Palmitic Acid

Joon Suh Lee, Jae-Cheol Lee and Yong-Gab Yun\*

Department of Oriental Medicine Prescription, Wonkwang University

**Abstract** – *Rhei Rhizoma* (RR) and *Moutan cortex* (MC) have been reported to have anti-inflammatory effects. However, little is known about the effects of RR and MC on endothelial inflammation and insulin resistance (IR). This study aims to investigate whether the water extracts of RR and MC could exert protection against palmitic acid (PA)-induced inflammation and IR in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). HUVECs were pretreated for 6 h with RR or MC, and then exposed to PA for 24 h. The levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were determined by enzyme-linked immunosorbant assay kits. Western blot analysis was performed for activation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and insulin receptor substrate-1 (IRS-1). In HUVECs stimulated with PA, both RR and MC significantly inhibited the production of TNF- $\alpha$  and IL-6 and the activation of NF- $\kappa$ B. At the same concentrations, the inhibitory effects of RR were more potent than those of MC. PA reduced insulin-induced phosphorylation of IRS-1, which was reversed by RR and MC. The results suggest that RR and MC are effective in inhibiting PA-associated endothelial inflammation and ameliorating IR by beneficial regulation of NF- $\kappa$ B and IRS-1 activation.

**Key words** – Anti-inflammation, *Rhei Rhizoma*, *Moutan cortex*, Palmitic acid, Insulin resistance

대황(*Rhei Rhizoma*; RR)과 목단피(*Moutan Cortex*; MC)는 항염증 효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>1,9)</sup> 특히, RR는 종양괴사인자(tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ )로 자극된 인간 혈관내피세포(human umbilical vein endothelial cells; HUVECs)에서 염증성 부착분자의 발현을 억제하였고,<sup>1,2)</sup> 박테리아 내독소 lipopolysaccharide(LPS)에 자극된 대식세포에서 염증성 매개 분자 nitric oxide의 생성을 억제하였다.<sup>3)</sup> 또한 MC는 LPS로 유도된 급성 폐 질환 및 ovalbumin으로 유도된 천식 실험동물 모델에서 항염증 효과를 보였다.<sup>8,9)</sup>

인슐린은 췌장의 베타세포에서 식후에 분비되어, 근육으로 포도당 섭취를 촉진하거나 또는 간에서 포도당 생성을 억제하여, 혈당을 일정한 수준으로 조절한다. 또한 인슐린은 근육에서는 단백질 분해를 억제하고, 간과 지방 조직에서는 지방산 분해를 억제하여, 섭취된 포도당을 지방으로

저장한다. 이러한 인슐린 작용이 생리적 인슐린 농도에서 정상보다 저하된 상태를 인슐린 저항성(insulin resistance)으로 정의한다.<sup>10)</sup> 인슐린 저항성은 제2형 당뇨병을 가진 일부 환자에서 인슐린 치료에 대한 반응이 떨어지는 것이 관찰됨으로써 처음 기술되었다.<sup>11)</sup> 따라서 인슐린 저항성 발생은 제2형 당뇨병의 발병과 관련이 있으며, 또한 강력한 예측 인자로 이해되고 있다. 말초조직의 세포내 포도당 흡수의 속도조절단계는 당수송체에 의한 세포내 포도당 유입과정이며, 이 과정은 인슐린 신호전달계에 의해서 조절된다.<sup>12)</sup> 인슐린 수용체에 인슐린이 결합한 후 결합 단백질인 인슐린 수용체 기질부위(insulin receptor substrate-1; IRS-1)의 타이르신 인산화가 증가하고, 순차적으로 인산화된 IRS-1에 여러 단백질이 결합하여 활성화된다. 결합되어 활성화된 단백질들의 상호작용에 의해서 당수송체가 세포질에서 세포막으로 이동하여 인슐린 자극에 의한 포도당 유입을 매개한다.<sup>13)</sup> 따라서 IRS-1 타이르신 인산화가 감소하거나 또는

\*교신저자(E-mail): yunyg@wku.ac.kr  
(Tel): +82-63-850-6834

유전적인 원인에 의해서 당수송체 기능에 이상이 발생할 경우에 인슐린 저항성이 발생한다. IRS-1 타이르신 인산화 감소는 여러 가지 원인에 의해서 발생하며, 비만은 중요한 원인 중에 하나이다.<sup>14)</sup> 즉, 비만은 인슐린 저항성의 발생과 밀접한 관련이 있다. 비만에서 인슐린 저항성이 발생하는 기전에서 혈중에 과량으로 존재하는 유리 지방산은 중요한 역할을 수행한다.<sup>15)</sup> 비만에 의해서 증가된 과량의 유리 지방산은 인슐린에 의존하는 여러 세포에서 포도당 운반을 억제하여 인슐린 활성도를 저하시킨다.<sup>15)</sup> 또한 유리 지방산은 혈관 벽을 형성하는 혈관내피세포 등을 자극하여 염증반응을 유발한다.<sup>15)</sup> 이러한 염증반응은 인슐린 저항성 발생을 가속시키는 것으로 알려져 있다. 혈액 내에 존재하는 유리 지방산 중에서 가장 많은 양으로 존재하는 대표적인 유리 지방산은 16개의 포화탄소로 구성된 palmitic acid(PA)이다.<sup>16)</sup> PA는 과량으로 존재할 경우 인슐린에 의존하는 특정 세포에 대하여 낮은 수준의 염증반응, 산화 스트레스, 인슐린 저항성, 세포사멸 등을 유발한다.<sup>17)</sup> 특히, PA는 심근세포, 평활근세포 및 혈관내피세포에서 염증반응 및 인슐린 저항성을 유발시킨다.<sup>18-21)</sup> 그러나 이러한 세포들에서 PA가 어떤 생물학적 기전으로 염증반응 및 인슐린 저항성을 유발하는지, 현재 활발히 연구 중에 있다. 여러 연구에 의하면, PA는 대부분의 세포에 존재하는 Toll-like receptor-4(TLR4)에 결합한 다음, 여러 신호전달 체계를 순차적으로 작동시킴으로써, 최종적으로는 유전자 조절 단백질 nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)를 활성화한다.<sup>17)</sup> 혈관내피세포에서 NF- $\kappa$ B의 활성화 결과에 의해서 생성되는 대표적인 염증성 사이토카인은 TNF- $\alpha$ 와 interleukin-6(IL-6)이 있다.

본 연구는 혈관내피세포 HUVECs에 대표적인 유리 지방산 PA를 높은 농도로 처리하여 염증반응(TNF- $\alpha$  및 IL-6 생성) 및 인슐린 저항성(IRS-1 타이르신 인산화 억제)을 유도하여, RR 및 MC 수용성 추출물의 항염증 효과 및 인슐린 저항성 개선 효과를 비교하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - PA, bovine serum albumin(BSA), fetal bovine serum(FBS), 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 및 DMSO는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. EBM-2 배지는 Clonetics(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 인간 TNF- $\alpha$  및 IL-6 enzyme-linked immunosorbant assay(ELISA) 키트는 모두 R&D system(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. Phospho(p)-IRS-1 및 IRS-1 항체는 Bioworld Technology(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase가 부착된 토끼 및 생쥐 IgG 항체, p-NF- $\kappa$ B/p65, NF- $\kappa$ B/p65 그리고  $\beta$ -actin 항체는 Cell Signaling Technology

(Beverly, MA, USA). 기타 모든 시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 정제하지 않고 사용하였다.

**세포 배양** - 인간 제대정맥 혈관내피세포(human umbilical vein endothelial cells; HUVECs)를 Clonetics에서 구입하여, 10% FBS이 포함된 EBM-2(Clonetics) 배지에서 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub>, 습기가 충분한 37°C에서 배양하였다. 세포는 10 cm 배양접시에 2×10<sup>6</sup>개가 되도록 2~3일에 한 번씩 분주하여 배양하였고, 계대수(passage)는 3~6번까지 사용하였다.

**추출물 제조** - 본 연구에 사용된 약제 장엽대황(*Rheum palmatum* L.) 및 목단피(*Paeonia suffruticosa* Andrews)는 원광대학교 익산 한방병원에서 구입하였다. 두 약제는 원광대학교 전통의학연구소에서 형태학적 평가를 통하여 동정하였고, 대황 표본시료(DH-2012-12-03-34)와 목단피 표본시료(MC-2012-12-03-35)는 원광대학교 한의과대학 방제학교실에 보관하였다. 각각의 약제 100 g와 3차 증류수 0.9 L을 둥근바닥 플라스크에 넣고 냉각기를 부착한 다음 3시간 동안 전전한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후에 상층 액을 취해서 회전 진공 농축기로 감압 농축하였다. 농축된 시료는 동결 건조기에서 건조하여 RR 추출물은 9.13 g와 MC 추출물은 8.37 g를 각각 얻었다.

**PA 조제** - PA는 70°C 0.1 M NaOH 용해시킨 다음 55°C에서 10% BSA와 10분간 반응시켜 복합체를 형성시키고, 최종 농도가 5 mM인 저장용액을 만들었다. 실험에 사용하기 1일 전에 저장용액을 희석하여 사용하였고, 사용하기 전에 LPS 오염 여부를 판정하였다.

**세포생존율 측정** - 혈관내피세포의 세포생존율은 밀집 세포의 미토콘드리아 탈수소화 효소에 의해 자줏빛 포르마잔(formazan) 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 하는 MTT 분석법을 이용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, 세포를 2×10<sup>5</sup> cells/well 농도로 배양하여 여러 가지 농도로 시료를 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후에 5 mg/ml MTT 용액을 100 ml을 첨가하고, 다시 30분 동안 배양하였다. 포르마잔 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. 포르마잔의 양은 용해액을 96-well plate에 loading한 후에 540 nm에 흡수되는 흡광도 값을 측정함으로써 결정했다.

**사이토카인 측정** - PA에 자극된 혈관내피세포에서 분비되는 TNF- $\alpha$  및 IL-6 양을 측정하기 위하여 ELISA 키트를 이용하여 분석하였다. 모든 분석과정은 지침서의 순서에 따라 수행하였다. 간단히 설명하면, 혈관내피세포에 RR 또는 MC를 농도별로 6시간 전처리한 후에 PA로 18시간 자극하였다. 각각의 처리군에서 동일한 양의 상층 액을 취하여 ELISA 분석을 수행하였다.

**Western Blotting** - 혈관내피세포를 60 mm dish에 3×10<sup>5</sup> cells/well 농도로 24시간 배양한 후에 각각의 시료를 농도별로 처리하였다. 세포에 RIPA 완충용액을 첨가한 다음, 4°C, 14,000 g에서 25분간 원심분리하고 상층 액을 튜브에

올렸다. 단백질 정량은 Bradford(Bio-Rad, USA)를 이용하였고 각각의 시료를 12% SDS 폴리아크릴아마이드 (polyacrylamide) 겔(gel)에서 전기영동하고 나이트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 전사하였다. 전사된 나이트로셀룰로스 막을 5% 무지방유가 포함된 신선한 고정 완충용액(blocking buffer)에서 고정한 후에, 1차 항체들(p-IRS, p-65 NF- $\kappa$ B, p65 NF- $\kappa$ B, IRS, actin)을 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 2차 항체를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, ECL 용액에 반응시켜 단백질 발현 정도를 Chemidoc image analyzer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하였다.

**통계** - 실험결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 실험군들 사이의 비교는 Prism software(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 이용하여 one-way ANOVA로 분석하였고, 사후 검정은 Bonferroni multiple range *t*-test를 이용하였다. 통계적 유의성은  $P < 0.05$ 로 정하였다.

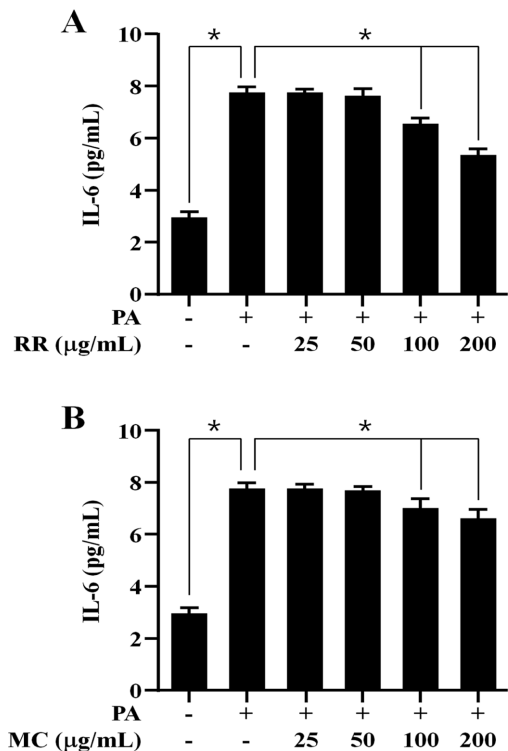
## 결 과

PA로 자극된 HUVECs에서 RR 및 MC가 IL-6 및 TNF- $\alpha$  사이토카인 생성에 미치는 효과 - 혈관내피세포 HUVECs에서 RR 및 MC의 처리에 의해서 유발될 수 있는 세포독성을 MTT 방법으로 조사하였다. RR의 농도가 200  $\mu$ g/mL까지 유의할만한 세포독성이 관찰되지 않았다. 그러나 RR의 농도가 200  $\mu$ g/mL보다 높은 400  $\mu$ g/mL에서는  $11.1 \pm 2.0\%$  ( $p < 0.05$ )의 세포독성이 관찰되었다. 따라서 실험에 사용되는 RR의 최대 처리 농도를 세포독성이 발견되지 않는 200  $\mu$ g/mL로 유지하였다. MC의 세포독성을 관찰한 결과, RR와 유사하게 200  $\mu$ g/mL까지 유의할만한 세포독성 관찰되지 않았다. 따라서 MC도 최대 처리 농도를 200  $\mu$ g/mL로 유지하였다.

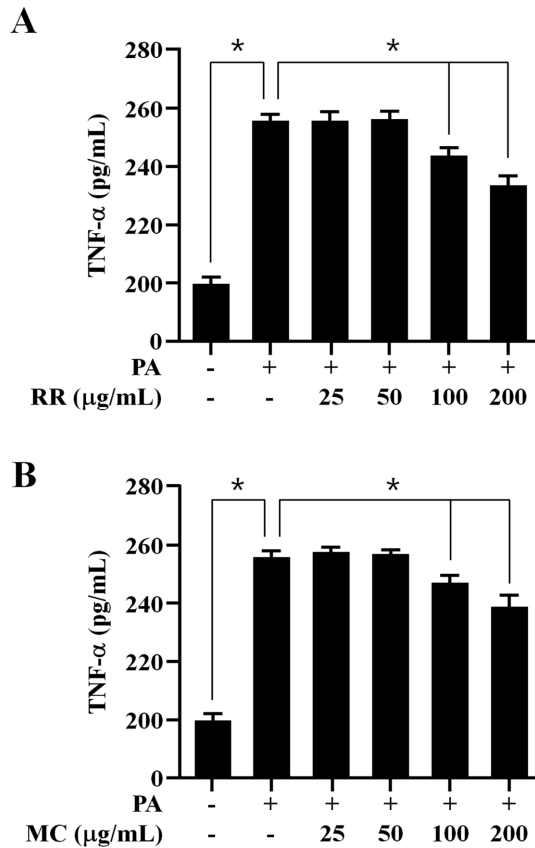
혈관에서 염증반응은 제2형 당뇨병의 발병에 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 제2형 당뇨병이 아직 발병하지 않은 비만에서 염증성 스트레스가 자주 발견되고 있으며, 이러한 염증성 스트레스는 혈관을 순환하는 유리 지방산과 염증성 사이토카인에 의해서 유발되는 것으로 알려져 있다.<sup>15)</sup> 이들은 직접적으로 제2형 당뇨병을 유발하지 않지만, 간접적으로 인슐린 저항성을 유발하여 제2형 당뇨병의 발병에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>15-17)</sup> 대표적인 유리 지방산에는 PA가 있고, IL-6과 TNF- $\alpha$ 는 혈관을 순환하는 대표적인 염증성 사이토카인으로 알려졌다.<sup>18)</sup> 비만에서 IL-6과 TNF- $\alpha$ 는 지방세포(adipocyte), 지방조직(adipose tissue)에 존재하는 대식세포(macrophage)와 같은 염증세포, 혈관내피세포 등에 의해서 혈액으로 유출되어, 혈관을 통해서 특정 조직에 도달하고, 이어서 조직에 있는 사이토카인

수용체와 결합한 다음 인슐린 작용을 저해하는 것으로 알려져 있다.<sup>17)</sup> 그러나 비만에서 어떤 원인에 의해서 IL-6과 TNF- $\alpha$ 가 생성되는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 최근 연구 결과에 의하면, PA는 혈관내피세포의 TLR-4와 결합하여 IL-6과 TNF- $\alpha$  생성을 유도한다는 사실이 밝혀졌다.<sup>17)</sup> 이 사실을 바탕으로, 본 연구는 먼저 RR 및 MC가 PA로 유도된 IL-6 생성에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. Fig. 1A에 나타난 바와 같이, RR는 PA로 유도된 IL-6을 유의하게 감소시켰다. RR에 의한 IL-6 생성의 유의성이 있는 감소는 RR의 농도 100  $\mu$ g/mL부터 관찰되었다. Fig. 1B에서 볼 수 있는 바와 같이, MC도 PA로 유도된 IL-6을 유의하게 감소시켰다. 그러나 IL-6 생성 감소 정도는 RR가 MC보다 우수하게 관찰되었다.

혈관을 순환하는 TNF- $\alpha$ 는 IL-6과 더불어 특정 세포에서 인슐린 저항성을 유발할 수 있는 대표적인 염증성 사이토카인이다.<sup>15-18)</sup> PA가 혈액에 과량으로 존재할 경우, 이것은 혈관내피세포를 자극하여 TNF- $\alpha$ 를 생성할 수 있다.<sup>17)</sup> 본 연구는 두 번째로 RR 및 MC가 PA로 유도된 TNF- $\alpha$  생성



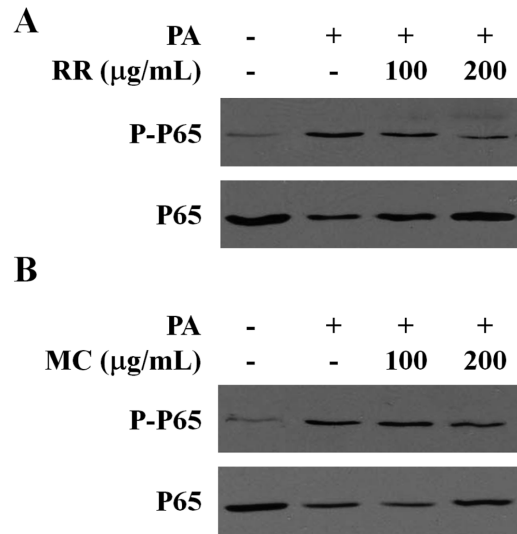
**Fig. 1.** Effects of RR and MC on PA-induced IL-6 production. A) HUVECs were pre-incubated with indicated doses of RR for 6 h, and then exposed to 100  $\mu$ M of PA for 18 h. B) Cells were pretreated with indicated doses of MC for 6 h, and then exposed to 100  $\mu$ M of PA for 18 h. ELISA assay for IL-6 production was performed as described in the section of Materials and Methods. Data are expressed as means  $\pm$  SD from 3 and 4 experiments. \* $p < 0.05$ .



**Fig. 2.** Effects of RR and MC on PA-induced TNF- $\alpha$  production. A) HUVECs were pre-incubated with indicated doses of RR for 6 h, and then exposed to 100  $\mu$ M of PA for 18 h. B). Cells were pretreated with indicated doses of MC for 6 h, and then exposed to 100  $\mu$ M of PA for 18 h. ELISA assay for TNF- $\alpha$  production was performed as described in the section of Materials and Methods. Data are expressed as means  $\pm$  SD from 3 and 4 experiments. \* $p$ <0.05.

에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이, RR는 PA로 유도된 TNF- $\alpha$ 을 유의하게 감소시켰다. RR에 의한 TNF- $\alpha$  생성의 유의성이 있는 감소는 RR의 농도 100  $\mu$ g/mL부터 관찰되었다. Fig. 2B에서 볼 수 있는 바와 같이, MC도 PA로 유도된 TNF- $\alpha$ 을 유의하게 감소시켰다. 그러나 TNF- $\alpha$  생성 감소 정도는 RR가 MC보다 우수하게 관찰되었다.

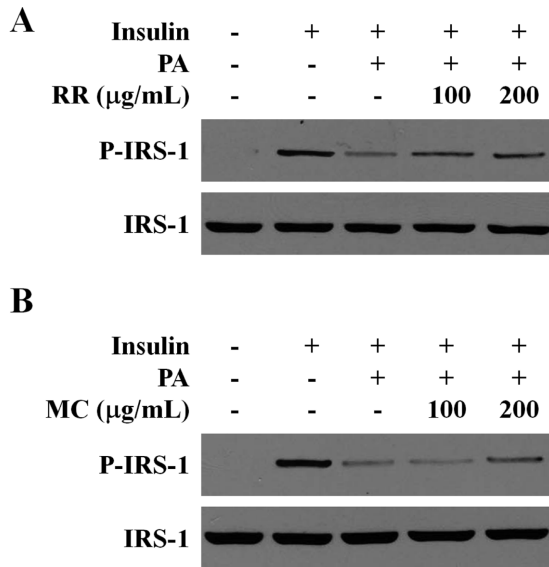
**PA로 자극된 HUVECs에서 RR 및 MC가 NF- $\kappa$ B 활성화에 미치는 효과** - 세포막에 있는 TLR4 수용체의 신호는 여러 단계의 신호전달 경로를 통해서 세포질에 존재하는 NF- $\kappa$ B를 활성화시킨다. 활성화된 NF- $\kappa$ B는 핵 내부로 이동하여 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 를 전사할 수 있는 DNA 활성부위에 결합하여, IL-6 mRNA 및 TNF- $\alpha$  mRNA 합성을 유도한다. 세포질에서 NF- $\kappa$ B는 p65 단백질, p50 단백질 및 이것들의 활성을 억제하는 I-B와 복합체를 형성한다.<sup>22,23</sup> NF- $\kappa$ B 활



**Fig. 3.** Effects of RR and MC on PA-induced p65 phosphorylation. A) HUVECs were pre-incubated with indicated doses of RR for 6 h, and then exposed to 100  $\mu$ M of PA for 2 h. B). Cells were pretreated with indicated doses of MC for 6 h, and then exposed to 100  $\mu$ M of PA for 2 h. Western blot analysis for p-p65 and p65 expression was performed as described in the section of Materials and Methods.

성은 I-B가 분리되거나 또는 p65 단백질이 인산화되어, p65 단백질 및 p50 단백질이 핵 내부로 이동할 수 있는 상태를 말한다. 즉, p65 단백질의 인산화된 형태 p-p65 단백질 발현 정도는 NF- $\kappa$ B 활성 정도를 의미한다. 본 연구는 RR 및 MC가 PA로 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. RR 및 MC의 농도는 IL-6 및 TNF- $\alpha$  생성을 유의성 있게 감소시키는 100  $\mu$ g/mL과 200  $\mu$ g/mL를 선택하였다. Fig. 3A에 나타난 바와 같이, RR는 PA로 유도된 p-p65 발현을 유의성 있게 감소시켰다. Fig. 3B에서 볼 수 있는 바와 같이, MC도 PA로 유도된 p-p65 단백질 발현을 감소시켰으나, p-p65 단백질 발현 감소 정도는 RR가 MC보다 우수하게 관찰되었다.

**PA로 자극된 HUVECs에서 RR 및 MC가 IRS-1 활성화에 미치는 효과** - 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ , 유리지방산 PA, 다른 염증성 물질 등에 의해서 발생하는 염증성 스트레스는 인슐린 신호를 교란시켜 인슐린 저항성을 유발시킬 수 있다.<sup>15-17</sup> 혈관내피세포 및 근세포에서 PA에 IRS-1 단백질의 타이로신 잔기의 인산화를 저해하여 인슐린 저항성을 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>18-21</sup> 그러나 PA가 어떤 생물학적 기전에 의해서 IRS-1 단백질의 타이로신 잔기 인산화를 저해하는지 명확하지 않다. 본 연구는 HUVECs에서 인슐린에 의한 IRS-1 단백질의 타이로신 잔기 인산화가 PA에 의해서 저해되는지 조사하고, RR 및 MC가 이러한 PA의 효과에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 혈관내피세포



**Fig. 4.** Effects of RR and MC on insulin-induced IRS-1 phosphorylation in HUVECs stimulated with PA. A) HUVECs were pre-incubated with indicated doses of RR for 6 h and exposed to 100  $\mu\text{M}$  of PA for 2 h. Then cells were stimulated with or without insulin (0.1  $\mu\text{M}$ ) for 20 min. B) Cells were pretreated with indicated doses of MC for 6 h and exposed to 100  $\mu\text{M}$  of PA for 2 h. Then cells were stimulated with or without insulin (0.1  $\mu\text{M}$ ) for 20 min. Western blot analysis for p-IRS-1 and IRS-1 expression was performed as described in the section of Materials and Methods.

HUVECs에서 인슐린은 IRS-1 단백질의 타이로신 잔기 인산화를 유도하였다(Fig. 4). RR 및 MC의 농도는 IL-6 및 TNF- $\alpha$  생성을 유의성 있게 감소시키는 100  $\mu\text{g/mL}$ 과 200  $\mu\text{g/mL}$ 를 선택하였다. Fig. 4A에 나타난 바와 같이, RR는 PA에 의해서 감소된 IRS-1 단백질의 타이로신 잔기의 인산화를 유의성 있게 증가시켰다. Fig. 4B에서 볼 수 있는 바와 같이, MC도 PA에 의해서 감소된 IRS-1 단백질의 타이로신 잔기 인산화를 증가시켰으나, 효과적인 면에서 RR가 MC보다 우수하게 관찰되었다.

## 고 찰

최근 폭발적인 증가를 보이는 제2형 당뇨병 및 대사증후군은 비만인구의 증가와 밀접한 상관관계를 보이며, 비만에서 동반되는 인슐린 저항성은 제2형 당뇨병의 가장 중요한 선행요인인 동시에 대사증후군 발생의 핵심인자로 생각되고 있다.<sup>10,11)</sup> 최근의 보고에 의하면, 비만인 사람의 혈중에 많이 존재하는 유리 지방산, 여러 염증성 사이토카인 등이 인슐린 신호전달 기능을 저해하여 인슐린 저항성을 일으키는 것으로 알려지고 있다.<sup>17)</sup> 본 연구결과에 의하면, 혈관내피세포 HUVECs에서 대표적 지방산 PA는 염증성 사이토

카인 TNF- $\alpha$  및 IL-6 생성을 증가시켰고, IRS-1 타이로신 잔기들의 인산화를 저해하였다. 일반적으로, 인슐린 신호전달은 타이로신 키나제(tyrosine kinase) 활성을 갖는 인슐린 수용체가 IRS-1 단백질의 타이로신 잔기들을 인산화하여 활성화시킴으로써 시작된다.<sup>10,13)</sup> 인산화된 IRS-1에 여러 단백질 키나제들이 순차적으로 결합하여 활성화됨으로써 포도당흡수, 글리코겐합성, 단백질 합성, 세포성장 등의 다양한 세포활동을 촉진하게 된다.<sup>10,13)</sup> PA가 어떤 생물학적 기전에 의해서 TNF- $\alpha$  및 IL-6 생성을 증가시키고, IRS-1 단백질의 타이로신 잔기 인산화를 저해하는지 확실하지 않다. 전통적으로 TLR4는 내독소 LPS의 수용체로 LPS-TLR4 결합에 의해서 활성화되면, 여러 단계의 신호전달 경로를 통해서 세린/트레오닌 키나제(serine/threonine kinase)를 인산화시키고, 최종적으로는 NF- $\kappa\text{B}$ 를 활성화시킨다.<sup>22,23)</sup> 활성화된 NF- $\kappa\text{B}$ 는 핵 내로 이동하여 특정 DNA 부위에 결합하여, TNF- $\alpha$  및 IL-6과 같은 염증성 매개 인자들을 전사한다.<sup>22,23)</sup> 또한 인산화된 세린/트레오닌 키나제 중에서 c-Jun N-terminal kinase는 IRS-1 세린 잔기를 인산화하여, IRS-1 타이로신 잔기의 인산화를 저해한다.<sup>17)</sup> 본 연구결과에 의하면, 혈관내피세포에서 LPS와 유사하게 PA는 NF- $\kappa\text{B}$  활성을 유도하고, TNF- $\alpha$  및 IL-6 생성을 증가시켰다. 이러한 결과로부터, PA가 TLR4와 결합하고, 이러한 PA-TLR4 결합의 결과가 TNF- $\alpha$  및 IL-6 생성을 증가시키고, 또한 IRS-1 단백질의 타이로신 잔기 인산화를 저해시킨 것으로 판단된다.

혈관내피세포에서 RR와 MC는 PA에 의한 TNF- $\alpha$  및 IL-6 생성 유의하게 감소시키고, IRS-1 단백질의 타이로신 잔기 인산화 감소를 유의하게 회복시켰다. RR와 MC의 이러한 효과를 비교해보면, RR가 MC보다 효과적인 측면에서 우수했다. 또한 RR와 MC는 PA에 의한 NF- $\kappa\text{B}$  활성을 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 RR와 MC가 PA-TLR4 결합에 의해서 유도된 어떤 신호를 저해했을 가능성을 시사한다. RR 및 MC의 각각의 효과 작용점들에 대한 보다 자세한 연구가 더 필요하다고 생각한다.

## 결 론

비만에서 감염원의 존재와 무관하게 적은 수준의 전신성 염증(low grade systemic inflammation)이 자주 발견된다.<sup>10,11)</sup> 이러한 염증은 주로 혈관을 통해서 특정 조직으로 순환할 수 있는 염증성 사이토카인, 포화지방산 등에 의해서 발생하며, 인슐린 저항성의 원인으로 작용하는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>16,17)</sup> 인슐린 저항성이 어떤 원인에 의해서 해소되지 않을 경우, 높은 농도의 혈당을 특징하는 제2형 당뇨병이 발병할 수 있다. 따라서 비만에서 제2형 당뇨병을 예방하거나 또는 치료하기 위해서는 인슐린 저항성 및 염증반응을 감소시켜야 한다. 본 연구는 RR 및 MC 처리가 PA로

자극된 HUVECs에서 염증반응 및 인슐린 저항성에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 본 연구 결과에 의하면, RR 및 MC는 PA에 의한 IL-6 및 TNF- $\alpha$  사이토카인 생성을 저해하였다. 저해 효과 정도는 RR이 MC보다 우수하였다. PA는 인슐린 저항성을 발생시켰으며, RR 및 MC는 인슐린 저항성을 감소시켰다. 감소 효과 정도는 RR이 MC보다 우수하였다. PA는 NF- $\kappa$ B 활성을 증가시켰으며, RR 및 MC는 NF- $\kappa$ B 활성을 억제시켰다. 억제 효과 정도는 RR이 MC보다 우수하였다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 대황과 목단피를 구성 약물로 처방되는 大黃牧丹皮湯은 비만에서 나타나는 제2형 당뇨병의 예방 및 치료에 어느 정도는 효과가 있을 것으로 생각된다.

## 사 사

이 논문은 2012학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었다.

## 인용문헌

1. Moon, M. K., Kang, D. G., Lee, J. K., Kim, J. S. and Lee, H. S. (2006) Vasodilatory and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of rhubarb via a NO-cGMP pathway. *Life Sci.* **78**: 1550-1557.
2. Lee, S. W., Hwang, B. S., Kim, M. H., Park, C. S., Lee, W. S., Oh, H. M. and Rho, M. C. (2012) Inhibition of LFA-1/ICAM-1-mediated cell adhesion by stilbene derivatives from *Rheum undulatum*. *Arch. Pharm. Res.* **35**: 1763-1770.
3. Matsuda, H., Kageura, T., Morikawa, T., Toguchida, I., Harima, S. and Yoshikawa, M. (2000) Effects of stilbene constituents from rhubarb on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**: 323-327.
4. Yoo, M. Y., Oh, K. S., Lee, J. W., Seo, H. W., Yon, G. H., Kwon, D. Y., Kim, Y. S., Ryu, S. Y. and Lee, B. H. (2007) Vasorelaxant effect of stilbenes from rhizome extract of rhubarb (*Rheum undulatum*) on the contractility of rat aorta. *Phytother. Res.* **21**: 186-189.
5. Matsuda, H., Tewtrakul, S., Morikawa, T. and Yoshikawa, M. (2004) Anti-allergic activity of stilbenes from Korean rhubarb (*Rheum undulatum* L.): structure requirements for inhibition of antigen-induced degranulation and their effects on the release of TNF- $\alpha$  and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorg. Med. Chem.* **12**: 4871-4876.
6. Liu, K. Y., Hu, S., Chan, B. C., Wat, E. C., Lau, C. B., Hon, K. L., Fung, K. P., Leung, P. C., Hui, P. C., Lam, C. W. and Wong, C. K. (2013) Anti-inflammatory and anti-allergic activities of Pentaherb formula, Moutan Cortex (Danpi) and gallic acid. *Molecules* **18**: 2483-2500.
7. Yun, C. S., Choi, Y. G., Jeong, M. Y., Lee, J. H., and Lim, S. (2013) Moutan Cortex Radicis inhibits inflammatory changes of gene expression in lipopolysaccharide-stimulated gingival fibroblasts. *J. Nat. Med.* **67**: 576-589.
8. Fu, P. K., Yang, C. Y., Tsai, T. H. and Hsieh, C. L. (2012) Moutan cortex radices improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through anti-inflammation. *Phytomedicine* **19**: 1206-1215.
9. Du, Q., Feng, G. Z., Shen, L., Cui, J. and Cai, J. K. (2010) Paeonol attenuates airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of ovalbumin-induced asthma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**: 1010-1016.
10. van Greevenbroek, M. M., Schalkwijk, C. G. and Stehouwer, C. D. (2013) Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth. J. Med.* **71**: 174-187.
11. Kahn, S. E., Hull, R. L. and Utzschneider, K. M. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**: 840-846.
12. Huang, S. and Czech, M. P. (2007) The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* **5**: 237-252.
13. Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y. and Tanti, J. F. (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* **87**: 99-109.
14. Wilcox, G. (2005) Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem. Rev.* **26**: 19-39.
15. Boden, G. (2011) Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **18**: 139-143.
16. Benoit, S. C., Kemp, C. J., Elias, C. F., Abplanalp, W., Herman, J. P., Migrenne, S., Lefevre, A. L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Yu, F., Niswender, K., Irani, B. G., Holland, W. L. and Clegg, D. J. (2009) Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- $\theta$  subcellular localization in rodents. *J. Clin. Invest.* **119**: 2577-2589.
17. Funaki, M. (2009) Saturated fatty acids and insulin resistance. *J. Med. Invest.* **56**: 88-92.
18. Wang, Q., Cheng, X. L., Zhang, D. Y., Gao, X. J., Zhou, L., Qin, X. Y., Xie, G. Y., Liu, K., Qin, Y., Liu, B. L. and Qin, M. J. (2013) Tectorigenin attenuates palmitate-induced endothelial insulin resistance via targeting ROS-associated inflammation and IRS-1 pathway. *PLoS One* **8**: e66417.
19. Gorgani-Firuzjaee, S., Bakhtiyari, S., Golestani, A. and Meshkani, R. (2012) Leukocyte antigen-related inhibition attenuates palmitate-induced insulin resistance in muscle cells. *J. Endocrinol.* **215**: 71-77.
20. Lee, M. S., Choi, S. E., Ha, E. S., An, S. Y., Kim, T. H., Han, S. J., Kim, H. J., Kim, D. J., Kang, Y. and Lee, K. W. (2012) Fibroblast growth factor-21 protects human skeletal muscle myotubes from palmitate-induced insulin resistance by inhibiting stress kinase and NF- $\kappa$ B. *Metabolism* **61**: 1142-1151.

21. Deng, Y. T., Chang, T. W., Lee, M. S. and Lin, J. K. (2012) Suppression of free fatty acid-induced insulin resistance by phytopolyphenols in C2C12 mouse skeletal muscle cells. *J. Agric. Food. Chem.* **60**: 1059-1066.
22. Lu, Y. C., Yeh, W. C. and Ohashi, P. S. (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**: 145-151.
23. Pålsson-McDermott, E. M. and O'Neill, L. A. (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* **113**: 153-162.  
(2013. 12. 3 접수; 2013. 12. 10 심사; 2014. 1. 15 게재확정)