

Baicalin이 3T3-L1 세포의 분화에 미치는 영향

은재순* · 서은실 · 소준노* · 오석홍*

전주우석대학교 약학과, *생물공학과

(Received March 15, 1994)

Effect of Baicalin on the Differentiation of 3T3-L1 Cells

Jae-Soon Eun*, Eun-Sil Suh, Joon-No So* and Suk-Heung Oh*

Department of Pharmacy, *Department of Biotechnology, Chunju Woosuk University, Seoul 520-680, Korea

Abstract—The purpose of this research was to investigate effects of baicalin on the differentiation of preadipocytes, 3T3-L1, and to characterize the action of baicalin that affect the responses of 3T3-L1 cells during differentiation. In various culture conditions, effects of baicalin and adrenoreceptor agonists such as phenylephrine(PE) and isoproterenol(IPR) on cell differentiation were examined. Also, effects of the drugs on differentiation, triglyceride(TG) contents, expression of insulin receptor, cAMP contents, the cytosolic Ca^{2+} levels, and amount of calmodulin(CaM) were examined. The results suggest that baicalin has adrenergic receptor blocking activity during the process of differentiation of 3T3-L1 cells and that in the early stage of the adipose conversion, the effect of baicalin on the adipocyte differentiation is mediated by the regulation of insulin receptor expression, but by alterations of the cAMP and the calcium metabolism in the late stage. These results also suggest that the action of baicalin may be significant in the lipid metabolism, lipogenic and lipolytic pathways, of adipose cells.

Keywords □ 3T3-L1 cell, Baicalin, Phenylephrine, Isoproterenol, Triglyceride, Insulin, cAMP, Ca^{2+} level, Calmodulin, Differentiation.

3T3-L1 세포는 3T3 세포로부터 유래된 세포주로서 Green과 Kehinde등¹⁻⁴⁾에 의해 분리되어 세포분화 과정을 연구하는데 유용한 모델로 사용되고 있으며, 적절한 조건하에서 배양하면 지방세포(adipose cell)로 분화하는 성질을 갖고 있다. 분화과정은 새로운 지방 합성 및 triglycerides대사와 관련된 효소 활성도의 급격한 증가를 수반하며,⁵⁻¹¹⁾ 이 과정 중에 지방합성 및 지방분해 유도 호르몬에 대한 감수성 또한 증가되고,^{12,13)} 지방합성 과정에 관여하는 지방세포-특이 유전자의 발현량이 증가한다고 보고되어 있다.^{14,15)} 많은 연구자들이 전지방 세포의 증식 및 지방세포로의 분화에 영향을 미치는 물질을 탐색하고, 그 작용과정을 밝히는데 3T3-L1 세포를 이용하여 실험하였다. 그 결과 retinol,¹⁶⁾ retinoic acid,¹⁷⁾ vitamin D

군,¹⁸⁾ vitamin E,¹⁹⁾ nicotinamide,²⁰⁾ phorbol ester,²¹⁾ dihydroteleocidin B,²¹⁾ lithium²²⁾ 등은 전지방 세포의 지방세포로의 분화를 억제하지만, 이와는 달리 ascorbic acid,²³⁾ hemin,²⁴⁾ cadmium,²⁵⁾ corticosterone,⁵⁾ cAMP⁶⁾ 등은 지방 세포로의 분화를 촉진시킨다는 사실이 밝혀졌다.

Baicalin은 inflammation, suppurative dermatitis, allergic disease, hyperlipemia, arteriosclerosis 등의 치료에 이용되고 있는 황금(Scutellariae Radix)으로부터 분리된 flavonoid의 일종²⁶⁻²⁸⁾으로서, 그 구조상 cAMP를 분해시키는 phosphodiesterase(PDE)를 억제하는 물질일 수 있음이 Sakamoto 등²⁹⁾의 NMR 연구결과 확인되었으며, Sekiya 등³⁰⁾에 의해 PDE의 활성이 baicalin에 의해서 억제됨이 확인되어 baicalin이 세포내 cAMP양을 증가시킬 수 있을 가능성이 제시

*본문에 관한 문의는 이 저자에게로

활성을 갖고 있음을 시사한 바 있다.

이는 baicalin이 세포내 cAMP양의 증가의 한 경로로 알려진 β -adrenergic receptor를 차단함으로써 세포내 cAMP증가를 억제할 수 있음을 의미하는 것으로, 앞서 언급한 Sakamoto 등²⁹⁾의 결과와는 다른 것이다.

본 연구에서는 세포분화에 미치는 baicalin의 작용을 검토할 목적으로, 전지방 세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여, 세포 분화능은 oil red O 염색법과 triglyceride양을 측정하여 확인하였으며, 세포질내 free Ca^{2+} 양, cAMP양, Insulin결합능 및 calmodulin (CaM)양의 변동을 관찰하여 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

실험방법

시약 및 기기—Dulbeco's modified Eagle's medium(DME, Sigma), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A, Sigma), fetal bovine serum(FBS, Gibco), dexamethasone(DEX, Sigma), 1-methyl-3-isobutylxanthine(MIX, Sigma), insulin(Sigma), trypsin(Gibco), penicillin-streptomycin(Pc-Sm, Sigma), oil red O(Sigma), biotin(Sigma), baicalin(Wako), isoproterenol(IPR, Sigma), phenylephrine(PE, Sigma), non-isotopic immunoassay kit for cAMP(Gibco), ¹²⁵I-insulin(NEN), triglyceride kit(sigma), fluo-3, AM(Molecular probes), beta-mercaptoethanol(β -ME, Sigma), 및 coomassie blue(Bio-Rad)등 이었으며, 기타 시약은 cell culture용 또는 1급 시약을 사용하였다. 기기는 inverted microscope(Nikon), liquid scintillation counter(Packard), ELISA reader(Dynatech MR 5000), interlative laser cytometer(Meridian Instrument Inc. ACAS 570) 및 UV-spectrophotometer(Simadzu Co.) 등을 사용하였다.

세포계대배양 조건—실험에 사용된 세포는 일본 Nagoya대학 생화학제어실의 Y. Kitagawa교수로부터 분양받은 3T3-L1 세포주였으며, 세포배양액은 DME를 기초배지로 하여 실험조건에 따라 다양한 농도의 FBS, penicillin(100 unit/ml), streptomycin(100 μ g/ml) 등을 첨가하였다. 3T3-L1은 배양 3~4일째 1:20의 split ratio로 계대 배양하였으며, 본 실험에는 28~31 계대수의 3T3-L1 세포가 사용되었다.³²⁾

세포 분화능 측정—배양중인 3T3-L1 세포가 밀집 배양 상태에 도달하면, DEX(0.25 μ M), MIX(0.5 mM), insulin(10 μ g/ml), d-biotin(10 μ g/ml) 등의 분화유도 물질이 포함된 DME/FBS배지(분화 유도배양액)로 배지교환을 하고 48시간 동안 처리하였다(초기배양). 48시간의 분화유도 배양액 처리후 insulin(10 μ g/ml)과 d-biotin(10 μ g/ml)만이 첨가된 세포배양액(IB 배양액)으로 교환하고 5일간 더 배양하여 3T3-L1 세포를 지방세포로 분화시켰다(후기배양).

Baicalin만을 단독 처리할 때는 5×10^{-5} M을 초기 배양시에는 2일간, 후기배양시에는 5일간 처리하였으며, phenylephrine(PE) 또는 isoproterenol(IPR) 병용처리시에는 초기배양시 baicalin과 PE 또는 IPR을 각각 또는 병용하여 3시간 동안 처리한 후 배지를 교환하고 48시간 동안 처리하였다. 48시간 후 후기 배양시 baicalin, PE 및 IPR을 각각 또는 병용하여 3시간 동안 처리한 후 배지를 교환하고 5일간 더 배양하여 3T3-L1 세포를 지방 세포로 분화시켜 세포 분화능을 oil red O로 염색하여 측정하였다.

즉 3T3-L1 세포가 성숙 지방 세포로 분화된 후 세포표면을 DPBS로 2회 씻어주고 10% formalin/DPBS로 30분간 고정하여 oil red O로 10분간 염색하였다. 염색 후 증류수로 수회 세척하여 잔여 염색액을 제거하였으며, 3T3-L1 세포의 분화정도는 세포내 지방 과립에 염색된 oil red O를 isopropyl alcohol로 1시간 동안 용출시켜 ELISA reader로 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.^{33,34)}

세포 추출액 제조—세포 1×10^5 cells/ml를 15 ml씩 petri dish(D 100 mm)에 넣고 세포 분화시와 동일하게 실험한 후, 배양액을 버리고 부착된 세포를 DPBS-A 용액으로 2번 세척한 후, trypsin을 처리하고 PBS용액 10 ml을 넣어 세포를 부유시킨 다음 원심분리(1,500 rpm, 10 min., 2회)하였다. 상정액을 버리고 밑에 남아있는 세포에 lysis buffer 100 μ l를 넣고 -60°C 로 동결하였다가 실온에서 녹이는 작업을 3회 반복한 후, sonicator로 초음파 처리하여(20초씩, 3회) 세포를 완전히 용해시켰다. 원심분리(6,500 rpm, 5 min.)하여 상정액 100 μ l를 얻어 30 μ l씩 분주하여 -60°C 에 보관하면서 사용하였다.³⁵⁾

세포 추출액중 triglyceride양 측정—세포 추출액중의 triglyceride의 양은 triglyceride(INT) reagent를 이용하여 측정하였다. 즉, 시험관에 준비된 INT혼합

시약 1 ml을 분주한 후 여기에 시료 0.01 ml을 넣고 실온에서 18분간 반응시켰다. 반응 후, spectrophotometer로 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 blank에는 같은 양의 증류수를, calibrator로는 같은 양의 glycerol용액(250 mg/dL)을 넣어 동일한 조건에서 반응시켰으며, 시료내 triglyceride양은 다음식에 준하여 계산하였다.

$$\text{Triglycerides(mg/dL)} = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{calibrator}} - A_{\text{blank}}} \times 250$$

세포질내 free Ca²⁺ 양 측정—세포 1×10⁵ cells/ml를 2 ml씩 petri dish(D 30 mm)에 분주하고 배양하여 분화유도 물질로 2일간 분화시킨 후 IB배지로 교환하여 3일간 배양하였다. 그후 4 mmol NaHCO₃가 첨가된 DME배양액 1 ml로 교환하고, 형광염료인 fluo-3, AM 50 µg을 DMSO 70 µl에 용해시켜 배양액 1 ml당 10 µl를 넣어(최종농도 6 µmol) 1시간 동안 세포를 염색하였다. 염색 후, 5×10⁻⁵ M의 baicalin과 5×10⁻⁷ M의 PE 또는 IPR을 각각 첨가하거나, baicalin으로 5분간 전처리한 후 PE 또는 IPR을 각각 첨가하여 10~20분 동안 interlative laser cytometer로 세포질내 free Ca²⁺ 양의 변동에 미치는 영향을 조사하였다.³⁶⁾

세포 추출액 중 cAMP양 측정—세포 추출액 30 µl에 0.1 M sodium acetate용액(pH 6.1) 270 µl를 가하고 cAMP 측정용 non-isotopic immunoassay kit를 사용하여 측정하였다. 시료 또는 cAMP-표준용액 100 µl를 cAMP immunoplate의 각 well에 넣고 다시 100 µl의 anti-cAMP IgG를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그후 plate를 세척하고 200 µl의 anti-IgG peroxidase conjugated secondary antibody를 부가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 다시 세척하였다. 세척된 plate의 각 well에 peroxidase 기질용액 200 µl를 넣어 10분간 발색시킨 후, 각 well의 흡광도를 ELISA reader로 490 nm에서 측정하였다. 시료의 cAMP양은 cAMP-표준곡선에 시료의 흡광도를 대입하여 계산하였다.³⁷⁾

Insulin binding assay—세포 1×10⁵ cells/ml를 2 ml씩 12 well plate에 분주하여 배양하고 3T3-L1의 표면을 4°C의 insulin binding buffer로 세척한 후 ¹²⁵I-insulin 0.5–1 m(10,000 cpm)를 각 well에 넣고 15°C에서 90분간 반응시켰다. 반응 후 1N NaOH 용

액으로 37°C에서 1시간 동안 처리하여 세포를 녹이고 세포 표면에 부착된 ¹²⁵I-insulin의 방사능을 liquid scintillation counter로 측정하였다. 이때 비특이적 결합 정도의 양은 1 µg/ml 농도의 cold insulin을 4°C에서 30분간 전처리한 후 같은 조건으로 반응시켜 측정하였다. 특이적 결합율(SB)은 다음식에 준하여 계산하였다.

$$\text{SB(\%)} = (\text{TB} - \text{NSB}) / \text{Input} / 10^6 \text{ cells} \times 100$$

세포 추출액 중 calmodulin양 측정—세포 추출액 중의 총 단백질량은 γ-globulin을 표준단백질로 사용하고 Bradford방법³⁸⁾으로 정량하였다. 즉, γ-globulin을 5~25 µg 범위에서 coomassie blue 200 µl와 3차 증류수 800 µl를 혼합하여 10분간 실온에서 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 3T3-L1 세포 추출액을 1:10으로 희석한 시료 20 µl에 coomassie blue 200 µl와 3차 증류수를 가하여 최종용적이 1 ml가 되게한 후 상기와 같이 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 시료중의 단백질량을 표준곡선으로부터 산출하였다.

세포 추출액중의 CaM량은 재조합 DNA로부터 얻은 VU-1 calmodulin을 표준단백질로 사용하고, anti-VU-1 CaM antibody와 ¹²⁵I가 labeling 된 CaM을 사용하는 competitive radioimmunoassay(RIA)에 의해서 측정하였다. 세포추출액중의 CaM농도를 측정하기 위하여 ¹²⁵I-VU-CaM(80,000 cpm)을 1.3%(v/v) normal rabbit sera, 2%(w/v) BSA, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 100 mM NaCl과 cold CaM(0.028–57.2 pmol)을 함유하고 있는 200 µl 반응액에 넣고 anti-VU-1 CaM serum과 반응시켜 cold CaM이 CaM 항체에 대해 ¹²⁵I-VU-CaM과 경쟁하게 함으로써 얻어진 표준곡선을 사용하였다. 상기의 반응액은 4°C에서 하루밤 방치시킨 후, 10 µl의 goat-rabbit IgG serum(Cappel Lab.)을 가하고 30°C에서 1시간 반응시켰다. 여기에 총 반응액과 같은 양의 6%(v/v) PEG 8000을 가하고 잘 혼합한 다음 4°C에서 30분간 방치하였다. 형성된 항원-항체 복합체는 microcentrifuge로 10분간 15,000 rpm에서 원심분리하여 얻었고, pellets를 3%(v/v) PEG 8000으로 세척한 후 liquid scintillation counter로 cpm을 측정하였다. 시료중의 CaM양은 세포 추출액 15 µl 혹은 30 µl를 표준단백질 대신 반응액에 첨가하여 얻어진 cpm값으로부터 산출하였다.³⁹⁾

통계처리—실험결과는 Student's t-test로 통계처

리 하였다.

실험결과

세포 분화에 미치는 baicalin의 효과—전지방 세포인 3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화에 미치는 baicalin의 영향을 조사하기 위하여 96 well plate의 각 well에 1×10^5 cells/ml로 분주하고 배양하여 세포 밀집상태(confluent stage)에 도달시킨 후, 세포분화 유도물질 첨가시 baicalin을 농도별로 병용 처리하고 2일 동안 배양(초기 배양 2일)한 다음, 배지를 교환하고 5일간 더 배양(후기 배양 5일)하였다. 그 결과 baicalin을 5×10^{-7} M, 5×10^{-6} M 또는 5×10^{-5} M 처리하고 대조군을 100%로 하였을 때, 각각 96.2 ± 3.5 , 92.1 ± 2.4 및 $56.6 \pm 3.8\%$ 로 baicalin을 5×10^{-5} M로 처리하였을 때 대조군에 비해 유의성있게 분화가

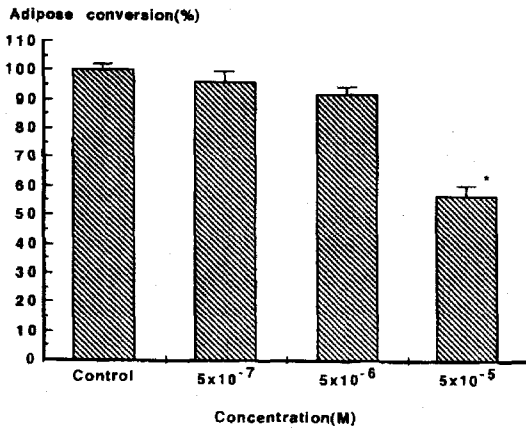


Fig. 1—Effect of baicalin on differentiation of 3T3-L1 cells.

At the confluent stage of 3T3-L1 cell, the medium was changed with induction medium (DEX, MIX, insulin, biotin)containing baicalin, and then the cells were incubated. After 2 days, the medium was changed with DME/FBS containing insulin and biotin, and the cells were incubated for further 5 days. The OD of each well was measured at 510 nm.

Each bar represents the mean \pm SE from 4 experiments

*: Significantly different from control group($p < 0.001$).

억제되었다(Fig. 1).

세포 분화에 미치는 phenylephrine, isoproterenol 및 baicalin의 효과—3T3-L1 세포의 분화에 미치는 adrenergic agonist의 영향을 조사하기 위하여, 초기 배양 및 후기배양 3시간 전에 PE와 IPR을 각각 5×10^{-9} , 5×10^{-8} , 5×10^{-7} , 5×10^{-6} 및 5×10^{-5} M을 처리하고 3시간 후에 배지를 교환하였으며, PE 또는 IPR병용 처리시에는 baicalin 5×10^{-5} M을 동시에 처리하였다. 그 결과 PE 및 IPR을 초기 배양전에 처리시에는 대조군에 비해 전 농도에서 유의성 있게 세포 분화가 증가되었으며, baicalin만 단독 처리시에는 대조군과 별 차이가 없었고, IPR병용 처리시 baicalin은 IPR 5×10^{-9} M의 작용을 차단하였다. 이 결과는 adrenergic α 및 β agonist들이 3T3-L1 세포의 분화를 촉진하고, baicalin이 β agonist의 작용의 일부를 차단하고 있음을 의미한다(Fig. 2, Fig. 3).

PE 및 IPR을 초기 및 후기 배양시 2회 처리시에는

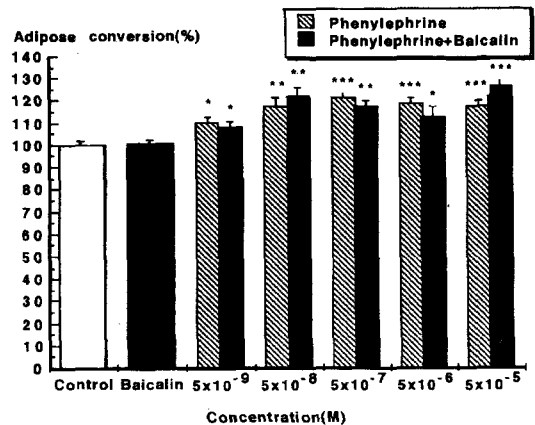


Fig. 2—Effect of baicalin(5×10^{-5} M) and phenylephrine on differentiation of 3T3-L1 cells.

At the confluent stage of 3T3-L1 cell, the medium was changed with induction medium containing baicalin and isoproterenol, and the cells were incubated. After 3 hrs, the medium was changed with induction medium, and the cells were incubated. After 2 days, the medium was changed with DME/FBS containing insulin and biotin, and the cells were incubated for 5 days. Each bar represents the mean \pm SE from 4 experiments.

: Significantly different from control group (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

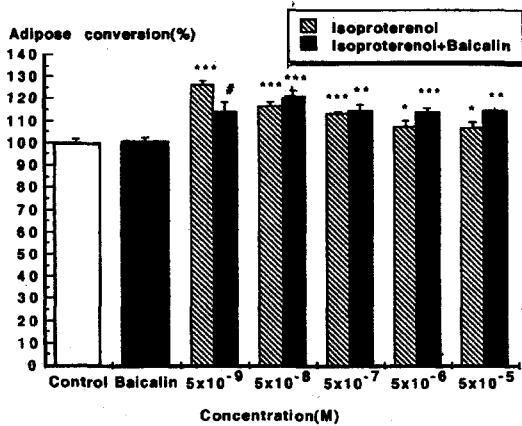


Fig. 3—Effect of baicalin(5×10^{-5} M) and isoproterenol on differentiation of 3T3-L1 cells.

At the confluent stage of 3T3-L1 cell, the medium was changed with induction medium containing baicalin and isoproterenol, and the cells were incubated. After 3 hrs, the medium was changed with induction medium, and the cells were incubated. After 2 days, the medium was changed with DME/FBS containing insulin and biotin, and the cells were incubated for 5 days. Each bar represents the mean \pm SE from 4 experiments.

: Significantly different from control group (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

#: Significantly different from isoproterenol-treated group ($p < 0.05$).

PE의 경우 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, IPR 처리시에는 고농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 세포 분화가 증가되었다. Baicalin만 처리시에는 대조군에 비해 약간 감소하였으나, PE 또는 IPR 병용 처리시에는 PE 및 IPR 전농도에서 세포분화가 유의성 있게 억제되었다. 이 결과는 3T3-L1 세포의 분화가 adrenergic α 보다는 β agonist에 의해 더욱 촉진됨을 의미하며, α 및 β agonist의 작용을 baicalin이 모두 차단함을 의미한다(Fig. 4, Fig. 5).

세포분화시 triglyceride양에 미치는 phenylephrine, isoproterenol 및 baicalin의 효과—3T3-L1 세포의 지방 세포로의 분화에 대한 작용을 확인하기 위하여 위와 동일한 방법으로 실험하여 triglyceride양을 측정하였다. 그 결과 대조군의 triglyceride양을 100%로

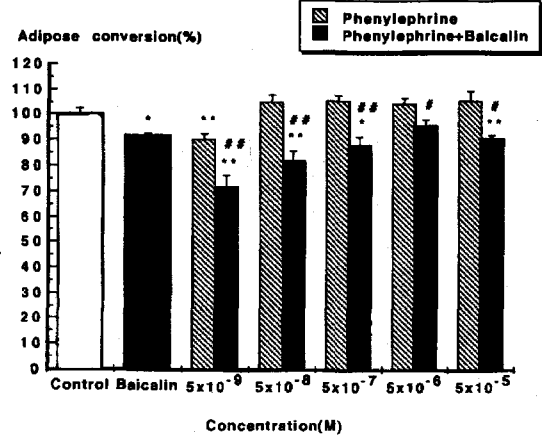


Fig. 4—Effect of baicalin(5×10^{-5} M) and phenylephrine on differentiation of 3T3-L1 cells.

At the confluent stage of 3T3-L1 cell, the medium was changed with DME/FBS containing baicalin and phenylephrine, and the cells were incubated. After 3 hrs, the medium was changed with induction medium, and the cells were incubated for 2 days, and baicalin and phenylephrine were added. After 3 hrs, the medium was changed with DME/FBS containing insulin and biotin, and the cells were incubated for 5 days.

Each bar represents the mean \pm SE from 4 experiments.

: Significantly different from control group (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

#: Significantly different from phenylephrine-treated group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

하였을 때, 초기배양시 2일간 처리한 5×10^{-5} M의 baicalin에 의한 triglyceride양은 $47.5 \pm 5.8\%$ 로 대조군에 비해 현저히 감소하였으며, 초기배양 2일 및 후기배양 5일간 처리하였을 경우에도 $32.3 \pm 4.9\%$ 로 현저히 감소하였다. 이 결과는 위의 결과와 동일한 결과로서 baicalin이 지방 세포 분화를 억제함을 시사한다(Fig. 6). PE 및 IPR 5×10^{-7} M을 각각 초기 및 후기 배양시 3시간씩 2회 처리시에는 PE의 경우 triglyceride양이 $109.8 \pm 2.7\%$ 로 대조군에 비해 증가되는 경향이였으며, IPR처리시에는 $120.1 \pm 2.3\%$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다. Triglyceride양이 PE와 baicalin병용시에는 $85.6 \pm 1.5\%$ 로, IPR과

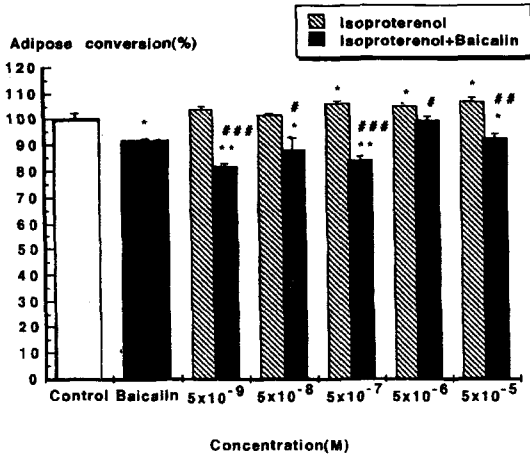


Fig. 5—Effect of baicalin(5×10^{-5} M) and isoproterenol on differentiation of 3T3-L1 cells.

At the confluent stage of 3T3-L1 cell, the medium was changed with DME/FBS containing baicalin and isoproterenol, and the cells were incubated. After 3 hrs, the medium was changed with induction medium, and the cells were incubated for 2 days, and baicalin and isoproterenol were added. After 3 hrs, the medium was changed with DME/FBS containing insulin and biotin, and the cells were incubated for 5 days.

Each bar represents the mean \pm SE from 4 experiments.

: Significantly different from control group (: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$).

#: Significantly different from isoproterenol-treated group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

baicalin 병용시에는 $77.6 \pm 4.8\%$ 로 유의성 있게 감소되었다. 이 결과는 위의 결과와 동일한 결과이다 (Fig. 7).

세포분화시 free Ca^{2+} 양에 미치는 phenylephrine, isoproterenol 및 baicalin의 효과—Baicalin 5×10^{-5} M과 PE 및 IPR 5×10^{-7} M을 첨가하고 10~20분 동안 interlative laser cytometer로 세포질내 free Ca^{2+} 양을 경시적으로 측정된 결과, baicalin만 처리시 46 unit에서 41 unit로 약간 감소하였으며 PE만 처리시에는 25 unit에서 16 unit로, IPR은 30 unit에서 23 unit로 감소하였다. Baicalin 전처리 후 PE처리시에는 세포질내 free Ca^{2+} 양이 변동하지 않았으나,

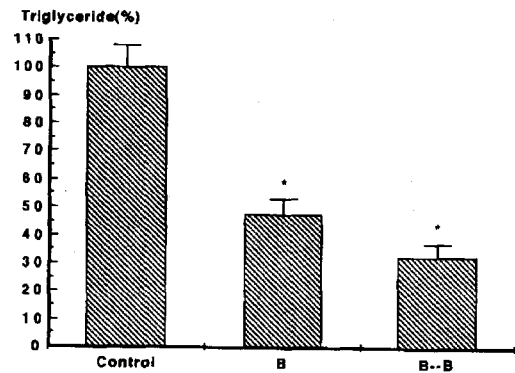


Fig. 6—Effect of baicalin(5×10^{-5} M) on the triglyceride content in differentiated 3T3-L1 cells.

At the confluent stage of 3T3-L1 cell, the medium was changed with induction medium(control) or induction medium containing baicalin(B), and the cells were incubated. After 2 day, the medium was changed with DME/FBS containing biotin, insulin and baicalin(B-B), and the cells were incubated for 5 days.

The cells(1.5×10^6 cells/petri dish) were incubated for 10 days. The triglyceride content of control was $76.2 \pm 3.0 \mu\text{g/petri dish}$. Each bar represents the mean \pm SE from 3 experiments. *: Significantly different from control group ($p < 0.001$).

IPR을 처리할 경우에는 37 unit에서 33 unit로 감소하였다. 이 결과는 각 약물이 단독 처리시에는 정도의 차이는 있지만 세포질내 free Ca^{2+} 양을 시간경과에 따라 점차 감소시키는 작용이 있으며, 원인은 불분명하지만 baicalin과 PE가 세포질내 free Ca^{2+} 양의 변동에 있어 상쇄 작용이 있음을 보여준다(Fig. 8).

세포 분화시 cAMP양에 미치는 baicalin의 효과—Baicalin을 초기 배양 2일간 처리하였을 때와 초기 배양 2일간 및 후기배양 5일간 더 처리한 경우 cAMP의 변동량을 측정하여 cAMP 표준곡선으로부터 환산하였다. 대조군의 cAMP양은 $73.3 \pm 3.7 \text{ pmol/petri dish}$ 이었고, baicalin을 초기배양 2일간만 처리한 경우에는 $64.7 \pm 4.4 \text{ pmol/petri dish}$ 로 감소하는 경향을 보였고, baicalin을 초기 배양 2일간 및 후기배양 5일간 더 처리한 경우에는 cAMP양이 $43.4 \pm 4.4 \text{ pmol/petri dish}$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

이는 baicalin을 장기처리시 세포내 cAMP양이 감소함을 의미한다(Fig. 9).

세포 분화시 Insulin결합능에 미치는 baicalin의 효과—대조군의 3T3-L1 세포의 insulin 특이적 결합은 17.5%로 분화중인 3T3-L1 세포의 insulin결합능과 비교하였을 때 유사한 결과이었다.⁴⁰⁾ 3T3-L1 세포의 초기배양 2일간 baicalin 5×10^{-5} M을 처리하였을 경우 insulin 특이적 결합능은 14.3%로 약간 감소하였다. 즉 baicalin은 분화중의 3T3-L1 세포의 insulin 수용체의 발현을 억제할 가능성이 있다(Table I).

세포 분화시 calmodulin량에 미치는 baicalin의 효과—세포 분화시의 CaM량에 미치는 baicalin의 영향을 보기 위해, baicalin을 초기 배양 2일간 처리하였을 때와 초기 배양 2일간 및 후기배양 5일간 처리한 경우

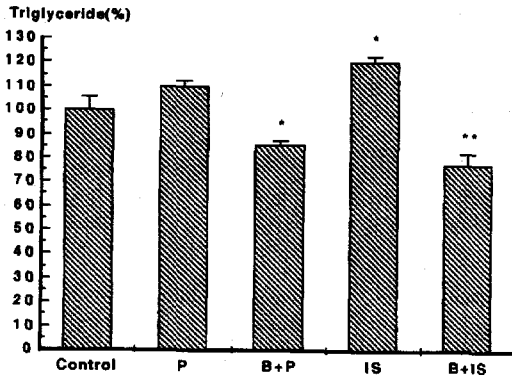


Fig. 7—Effect of baicalin, phenylephrine and isoproterenol on the triglyceride content in differentiated 3T3-L1 cells.

At the confluent stage of 3T3-L1 cell, the medium was changed with induction medium(control), induction medium containing phenylephrine(P), baicalin and phenylephrine(B+P), isoproterenol(IS), and baicalin and isoproterenol(B+IS), and the cells were incubated. After 3 hrs, the medium was changed with induction medium, and the cells were incubated for 2 days. The samples were added for 3 hrs, and then the medium was changed with DME/FBS containing insulin and biotin, and the cells were incubated for 5 days. Each bar represents the mean \pm SE from 3 experiments.

: Significantly different from control group (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

CaM의 변동량을 측정하였다. Baicalin 1회 처리시에는 0.731 pmol/mg protein으로 대조군 0.618 pmol/mg protein에 비해 별 변동이 없었다. 2회 처리시에는 대조군의 0.637 pmol/mg protein에서, 0.368 pmol/mg protein으로 CaM량이 현저히 감소하였다. 이는 baicalin이 calmodulin의 양적인 변동을 가져와 3T3-L1세포의 분화를 억제함을 시사하는 것이라 할 수 있다(Table II).

결 과

특정한 신호분자에 반응하는 수용체는 세포의 종류와 그 분화수준에 따라 세포의 증식 및 분화과정 중에 선택적으로 발현되지만, 그 수용체에 의해 활성화되는 second messenger system은 세포의 종류와 관계없이 발현된다. 즉 세포 수용체의 하나인 adrenergic receptor는 세포의 종류에 관계없이 공통적인 신호 전달계를 활성화시킨다.

baicalin이 3T3-L1 세포의 분화를 그 자체로도 크게

Table I—Effect of baicalin on specific insulin binding activity in differentiated 3T3-L1 cells.

Drugs	Specific binding(%)
Control	17.5
Baicalin	14.3

At the confluent stage of 3T3-L1 cell, the medium was changed with induction medium containing baicalin(5×10^{-5} M), and the cells were incubated. After 2 days, the medium was changed with DME/FBS, and the cells were incubated for 3 days.

Table II—Effect of baicalin on the calmodulin contents in differentiated 3T3-L1 cells.

Drugs	Calmodulin(pmol/mg protein)
Control	0.618
Baicalin A	0.731
Control	0.637
Baicalin B	0.368

At the confluent stage of 3T3-L1 cell, the medium was changed by induction medium contained baicalin(5×10^{-5} M) and then culture plate was incubated for 2 day(Baicalin A). After 2 days, the medium was changed by DME/FBS contained baicalin, and then culture plate was incubated for 5 days(Baicalin B). Cell extraction and assay method were described in Material and Method.

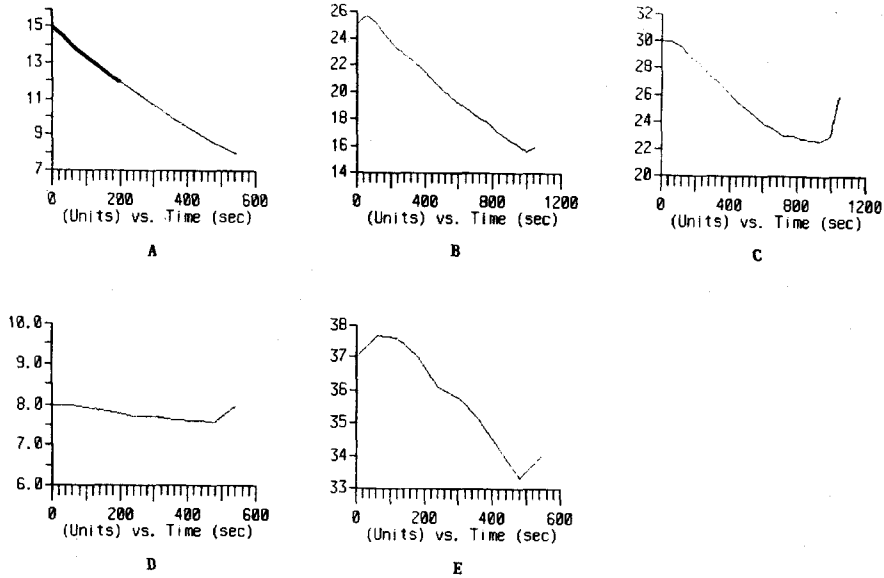


Fig. 8—Effect of baicalin on free Ca^{2+} concentration in the cytosol of differentiated 3T3-L1 cells.

The relative concentration of Ca^{2+} was detected with Interactive Laser Cytometer(ACAS 570).

A: Basicalin 5×10^{-5} M, B: Phenylephrine 5×10^{-7} M C: Isoproterenol 5×10^{-7} M D: Baicalin+Phenylephrine E: Baicalin+Isoproterenol

억제하고 adrenergic agonist인 PE, IPR 등의 3T3-L1 세포의 분화 증가작용을 억제하는 효과가 있었으며, 3T3-L1 세포내의 triglycerides 양의 변동에도 유사한 효과를 보였다. 이는 3T3-L1의 분화과정 중에 작용하는 α - 및 β -receptor 경로가 baicalin에 의해 차단되는 것임을 보여주는 결과로 해석할 수도 있으나, baicalin을 분화 유도 과정중에 1회만 처리한 경우에는 별 효과가 없었고, 분화 유도과정 후기에 1회를 더 처리한 경우에만 PE, IPR 등의 작용을 억제시키는 효과가 있었다는 점은 3T3-L1의 분화과정에서 baicalin과 α - 및 β -수용체와의 관련성은 추후 더 연구 검토되어야 할 것이다.

분화된 3T3-L1 세포는 insulin에 더욱 민감하게 반응하는 데 세포 분화와 함께 세포막에 insulin receptor가 증가되어 있는 것으로 알려져 있으며,⁴¹⁾ 이러한 사실 때문에 erythroid-type glucose transporter의 활성 및 insulin 관련 당뇨병의 연구에도 3T3-L1세포가 이용되고 있다.²⁵⁾ 분화 전단계의 3T3-L1 세포에도 적은 수의 insulin 수용체가 있기는 하지만 분화 유도에 의해서 세포당 insulin 수용체의 수가 3

5배 정도로 급격히 증가되며,⁴²⁾ 분화과정 중의 분화 변형 물질들에 의해 그 수가 변화하는 것으로 알려져 있어,⁴³⁾ 3T3-L1 세포의 glucose 흡수 및 전반적인 대사능의 변화를 측정하는 데에 insulin 결합능 측정법이 이용되고 있다.²⁵⁾ 본 실험 결과에서, 분화유도 물질에 의한 분화유도 과정 중 baicalin 처리로 세포의 insulin 결합능이 감소하였는데, 이는 baicalin에 의해 분화중인 3T3-L1 세포의 insulin수용체의 친화력이나 그 수가 감소되어 나타난 결과로 보여지며, baicalin이 3T3-L1 세포의 분화를 억제한 앞서의 결과는 3T3-L1 세포의 insulin 결합능을 감소시킨 baicalin의 직접적인 작용에 일부 관련되어 있음을 시사하는 것이다. 이러한 본 실험의 결과는 흰쥐에서 baicalin의 경구 투여는 RBC의 sorbitol level을 저하시키는 효과가 있으며 이 효과는 aldose reductase의 활성억제 및 insulin-관련 대사과정의 변조에 기인된 것으로 추정된 Zhou 등의 주장⁴⁴⁾과도 일치하는 것으로 사료된다.

동물세포의 증식 및 분화에 대한 세포내 cAMP의 작용은 증식 및 분화억제 또는 촉진 등으로 실험자에 따라 서로 다르게 보고되어 있으나 최근에 들어 일

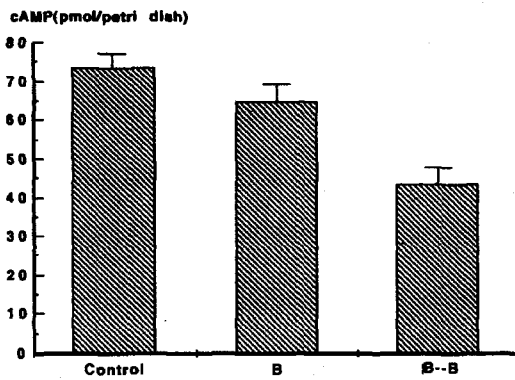


Fig. 9—Effect of baicalin(5×10^{-5} M) on the cAMP content in differentiated 3T3-L1 cells.

cAMP content was determined with non-isotopic cAMP determination ELIZA kit.

cAMP content in the samples was calculated by interpolation from the standard curve.

Each bar represents the mean \pm SE from 3 experiments.

*: Significantly different from control group ($p < 0.01$) Control: Inductive agent treated for 2 days

B: Inductive agent and baicalin treated for 2 days

B-B: Inductive agent and baicalin treated for 2 days, and then baicalin treated for 5 days

반적으로 cAMP는 세포의 증식 및 분화를 촉진하나 세포의 종류와 분화 상태에 따라 그 작용이 다를 수도 있음이 밝혀져 있다.⁴⁵⁾ 세포내 cAMP 양의 변동은 세포에 따라 다르긴 하지만 여러가지 호르몬, glucose 등의 영양원, β -adrenergic agonist 및 antagonist 등 세포 주변의 수많은 인자에 의해서 조절된다.⁴⁶⁾ Schmidt 등은⁴³⁾ 3T3-L1 세포의 분화에 미치는 corticosterone, growth factors, cAMP 등의 효과를 재검정하여 insulin의 지속적인 처리 하에는 3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화를 유도하는 물질에는 세포내 cAMP와는 무관한 경로로 작용하는 물질이 있음을 주장하였다. Baicalin이 초기 배양시의 1회 처리로는 세포내 cAMP양의 변화에 별다른 영향을 주지 못하였으나, 초기 배양에 이어 후기 배양시까지 2회 처리한 경우에는 세포내 cAMP 양을 감소시킨 본 실험 결과는, baicalin이 분화유도시 insulin에 대한 3T3-L1 세포의 반응성이 변동되지 않는 기간에는 세포내

cAMP양은 변동하지 않으나, baicalin을 후기 배양시 까지 처리하여 3T3-L1 세포의 insulin에 대한 반응성이 저하된 경우에는 baicalin이 cAMP의 양을 감소시키는 작용을 갖고 있는 것으로 해석된다. 즉, Schmit 등의 주장⁴³⁾처럼 3T3-L1 세포의 분화에 영향을 주는 물질은 물질에 따라 작용경로가 다를 뿐 아니라, baicalin과 같은 물질은 분화 단계에 따라 다른 경로로 작용할 수 있다는 것을 시사한다.

Kimura 등⁴⁷⁾은 human polymorphonuclear cell (PMN cell)에서 baicalin이 세포내로의 Ca^{2+} 유입과 세포내 Ca^{2+} 저장소인 endoplasmic reticulum으로부터의 Ca^{2+} 이동을 억제함으로써 calcium ionophore인 A23187에 의해 유도되는 leukotriene 합성과 탈과립 과정을 억제한다고 보고하였다. 본 실험에서 interlative laser microscope를 이용하여 분화중인 3T3-L1 세포의 세포내 Ca^{2+} 양의 변화를 경시적으로 조사한 결과, baicalin은 세포내 Ca^{2+} 양을 시간의 경과에 따라 감소시켰다. Baicalin에 의한 3T3-L1 세포의 세포내 Ca^{2+} 양의 감소는 앞서의 Kimura 등⁴⁷⁾의 보고 내용과도 일치하는 것이며, PMN cell에서와 마찬가지로 baicalin에 의해 세포내로의 Ca^{2+} 유입과 세포내 Ca^{2+} 저장소인 endoplasmic reticulum으로부터의 Ca^{2+} 이동이 억제되는 데 기인된 것으로 추정한다. 또한 본 실험에서 Ca^{2+} 대사와 밀접하게 관련되어 있다고 알려진 세포내 CaM의 양이 baicalin의 지속적인 처리에 의해서 감소하였다. 현재까지, 3T3-L1 세포의 분화에 있어 CaM의 관련성은 명백하게 보고되어 있지 않은 실정인긴 하지만, CaM은 기능이 확정된 CaM kinase 뿐만 아니라 다기능적인 CaM kinase의 활성을 조절함으로써 세포핵, 세포막계, 세포내 골격계 등의 기능 조절에도 관여하며, 세포의 종류와 분화정도에 따라 그 작용이 일률적이지 않고 다양한 것으로 알려져 있는 사실을 감안하면,⁴⁸⁾ baicalin에 의해 CaM 양이 감소한 본 실험결과는 baicalin이 3T3-L1세포의 분화 과정에 작용하는 한 경로로 CaM경로가 연관되어 있을 것이라는 사실을 시사한다.

본 실험 결과에 의하면, baicalin은 3T3-L1 세포에 작용하여 세포의 분화를 억제하며 분화 단계에 따라 주요 작용점이 다른 것으로 판단된다. 즉, 3T3-L1 세포의 분화 유도기에는 insulin 수용체 및 insulin 대사에 주로 관여하며 분화 후기에는 세포내 신호전달

계인 cAMP 및 Ca^{2+} /CaM계를 억제함으로써 그 작용을 보이는 것으로 사료되나 자세한 것은 추후 더 연구 검토되어야 할 것이다.

결 론

3T3-L1 세포 배양계에서 baicalin이 세포 분화에 미치는 영향에 대해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Baicalin은 3T3-L1 세포의 분화를 억제하였으며, Phenylephrine 및 isoproterenol은 세포의 분화를 촉진시켰고, phenylephrine 및 isoproterenol의 세포 분화 촉진작용은 baicalin에 의해 차단되었다.

2. Baicalin, phenylephrine 및 isoproterenol은 세포질내 free Ca^{2+} 양을 경시적으로 감소시켰으며 baicalin을 전처리하고 pheylephrine을 처리하였을 때는 세포질내 free Ca^{2+} 양이 경시적으로 변동되지 않았다.

3. Baicalin은 분화중인 3T3-L1세포의 cAMP양, insulin결합능 및 calmodulin양을 감소시켰다.

이상의 실험결과는 3T3-L1세포의 분화에 α 및 β receptor가 관여하고 있으며, baicalin은 3T3-L1 세포의 분화시 adrenergic agonist의 작용을 억제하거나 또는 분화유도 물질인 insulin의 수용체 결합능 억제, 세포내 cAMP양 감소, free Ca^{2+} 양의 감소 및 calmodulin량의 감소 등 다양한 경로에 의해 분화를 억제하고 있음을 시사한다.

문 헌

- Green, H. and Kehinde, O.: Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*. **1**, 113-116 (1974).
- Green, H. and Kehinde, O.: An established preadipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. **3**, 127-133 (1974).
- Green, H. and Kehinde, O.: An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*. **5**, 19-27 (1975).
- Green, H. and Kehinde, O.: Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell*. **7**, 105-113 (1976).
- Serrero, G. and Khoo, J. C.: An *in vitro* model to study adipose differentiation in serum free medium. *Anal. Biochem.* **120**, 351-359 (1981).
- Mackall, J. C., Student, A. K., Polakis, S. E., and Lane, M. D.: Induction of lipogenesis during differentiation in a "preadipocyte" cell line. *J. Biol. Chem.* **251**, 6462-6464 (1976).
- Coleman, R. A., Reed, B. C., Mackall, J. C., Student, A. K., Lane, M. D., and Bell, R. M.: Selective changes in microsomal enzymes of triglycerol, phosphatidylcholine, and phosphatidylethanolamine biosynthesis during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* **253**, 7256-7261 (1978).
- Wise, L. S. and Green, H.: Studies of lipoprotein lipase during the adipose conversion. *Cell*. **13**, 233-242 (1978).
- Spooner, P. M., Chernick, S. S., Garrison, M. M. and Scow, R. O.: Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **254**, 10021-10029 (1979).
- Student, A. K., Hsu, R. Y., and lane, M. D.: Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* **225**, 4745-4750 (1980).
- Kawamura, M., Jensen, D., Wancewicz, E., Joy, L., Khoo, J., and Steninberg, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 732-736 (1981).
- Rubin, C. S., Lai, E., and Rosen, O. M.: Acquisition of increased hormone sensitivity during *in vitro* adipocyte development. *J. Biol. Chem.* **252**, 3554-3557 (1977).
- Karlsson, F. A., Grunfeld, C., Khan, C. R., and Roth, J.: Regulation of insulin receptors and insulin responsiveness in 3T3-L1 fatty fibroblasts. *Endocrinol.* **104**, 1383-1392 (1979).
- Bernlohr, D. A., Angus, C. W., Lane, M. D., Bolanowski, M. A., and Kelly Jr., T. J.: Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: Identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 5468-5472 (1984).
- Spiegelman, B. M., Choy, L., Hotamisligil, G. S., Graves, R. A., and Tontonoz, P.: Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J. Biol. Chem.* **268** (10), 6823-6826 (1993).
- Sato, M., Hiragun, A. and Mitsui, H.: Preadipocytes

- possess cellular retinoid binding proteins and their differentiation is inhibited by retinoid. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **95**, 1839-1845 (1980).
- 17) Stone, R. L. and Bernlohr, D. A.: Retinoic acid inhibits the expression of adipose-specific genes during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. In abstract at the joint meet. *Am. Soc. Cell Biol. & Biochem. Mol. Biol.* (1989).
 - 18) Sato, M. and Hiragun, A.: Demonstration of 1-alpha, 25-dihydroxyvitamine D₃ receptor-like molecule in ST13 and 3T3-L1 preadipocytes and its inhibitory effects on preadipocyte differentiation. *J. Cell. Physiol.* **135**, 545-550 (1988).
 - 19) Kawada, T., Aoki, N., Kamei, Y., Maeshige, K., Nishiu, S., and Sugimoto, E.: Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from preadipocytes to adipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells. *Comp. Biochem. Physiol.* **96A(2)**, 323-326 (1990).
 - 20) Lewis, J. E., Shimizu, Y., and Shimizu, N.: Nicotinamide inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *FEBS Lett.* **146**, 37-41 (1982).
 - 21) Shimizu, Y., Shimizu, N., Fujiki, H., and Sugimura, T.: Distinct inhibitory effects of dihydroteleocidin B and the phorbol ester tumor promoters on the adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Cancer Res.* **43**, 4974-4979 (1983).
 - 22) Aratani, Y., Sugimoto, E. and Kitagawa, Y.: Lithium ion reversibly inhibits inducer-stimulated adipose conversion of 3T3-L1 cells. *FEBS, Lett.* **218**, 47-51 (1987).
 - 23) Ono, M., Aratani, Y., Kitagawa, I., and Kitagawa, Y.: Ascorbic acid phosphate stimulates type IV collagen synthesis and accelerates adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Exp. Cell Res.* **187**, 309-314 (1990).
 - 24) Chen, J. J. and London, I. M.: Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes. *Cell.* **26**, 117-122 (1981).
 - 25) Harrison, S. A., Buxton, J. M., Clancy, B. M., and Czech, M. P.: Evidence that erythroid-type glucose transporter intrinsic activity is modulated by cadmium treatment of mouse 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 19438-19449 (1991).
 - 26) Kubo, M., Matsuda, H., Tani, T., Arichi, S., Kimura, Y., and Okuda, H.: Studies on the Scutellariae Radix. XII. Anti-thrombotic actions of various flavonoids from Scutellariae Radix. *Chem. Pharm. Bull.* **33(6)**, 2411-2415 (1985).
 - 27) Imai, Y., Matsumura, H., and Aramaki, Y.: Hypocholesterolemic effect of Alisol A-24-monoacetate and its related compounds in rats. *J. Pharmacol.* **20**, 222-228 (1970).
 - 28) Nagai, T., Miyaichi, Y., Tomimory, T., Suzuki, Y., and Yamada, H.: Inhibition of influenza virus sialidase and anti-influenza virus activity by plant flavonoids. *Chem. Pharm. Bull.* **38(5)**, 1329-1332 (1990).
 - 29) Sakamoto, Y., Ohmoto, T., Nikaido, T., Koike, K., Tomimori, T., Miyaichi, Y., Shirataki, Y., Monache, F. D., Botta, B., Yokoe, I., Komatsu, M., Watanabe, S., and Ando, I.: On the relationship between the chemical structure and the cyclic AMP phosphodiesterase inhibitory activity of flavonoids as studied by ¹³C NMR. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **62**, 2450-2454 (1989).
 - 30) Sekiya, K. and Okuda, H.: Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 1090-1095 (1982).
 - 31) Fu, S., and Zhao, N.: Anti-catecholamines activity of baicalin. *J. China Med. Univ.* **16**, 6 (1987).
 - 32) Gamou, S., Shimizu, Y., and Shimizu, N.: Adipocytes. In *Methods in molecular biology*, vol. 5; Animal cell culture. 197-207 (1990).
 - 33) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55-63 (1983).
 - 34) Skaper, S. D., Facci, L., Milani, D., Leon, A., and Toffano, G.: Culture and use of primary and clonal neural cells. In *Methods in Neurosciences*, Vol. 2; Cell Culture. 17-33 (1990).
 - 35) Freshney, R. I.: *Culture of animal cells; A manual of basic technique*(2nd eds) p. 227-256. Alan R. Liss, N. Y. (1987).
 - 36) Thomas, A. P. and Delaville, F.: The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. In *Cellular calcium; A practical app-*

- roach. eds. McCormack J. G. & Cobbold, P. H., IRL Press, N. Y. pp. 1-54 (1991).
- 37) Bowen, H., Battista, P., and Hearl, W.: A nonisotopic enzyme linked immunosorbent assay for cAMP. *Focus*, **15**(2), 32-35 (1993).
- 38) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- 39) Rasmussen, C. D. and Means, A. R.: Calmodulin is involved in regulation of cell proliferation, *EMBO*, **6**, 3961-3968 (1987).
- 40) Rosen, O. M., Smith, C. J., Hirsch, A., Lai, E. and Rubain, C. S.: Recent studies of the 3T3-L1 adipocyte-like cell lines. In recent progress in hormone research. *Academic Press. Inc.* **35**, 477-499 (1979).
- 41) Rubin, C. S., Hirsch, A., Fung, C., and Rosen, O. M.: Development of hormone receptors and hormone responsiveness *in vitro*. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* **253**, 7570-7578 (1978).
- 42) Rosen, O. M., Smith, C. J., Fung, C., and Rubin, C. S.: Development of hormone receptors and hormone responsiveness *in vitro*. Effect of prolonged insulin treatment on hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **253**, 7579-7583 (1978).
- 43) Schmidt, W., Poll-Jordan, G., and Loffler, G.: Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* **265**, 15489-15495 (1990).
- 44) Zhou, Y., and Zhang, J.: Oral baicalin and liquid extract of licorice reduce sorbitol levels in red blood cell of diabetic rats. *Chinese Med. J.* **102**(3), 203-206 (1989).
- 45) Dumont, J. E., Jauniaux, J., and Roger, P. P.: The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trend. Biochem. Sci.* **14**(2), 67-71 (1989).
- 46) Choi, E., Xia, Z., Villacres, E. C., and Storm, D. R.: The regulatory diversity of the mammalian adenyl cyclases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 269-273 (1993).
- 47) Kimura, Y., Okuda, H., and Arichi, S.: Effects of baicalin on leukotriene biosynthesis and degranulation in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **922**, 278-286 (1987).
- 48) Schulman, H.: The multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 247-253 (1993).