

오미자 추출물의 혈당 강하 효과에 관한 연구

고병섭¹ · 박성규² · 최수봉³ · 전동화 · 최미경 · 박선민*

호서대학교 자연과학대학, ¹한국한의학연구원, ²경희대학교 한의과대학, ³건국대학교 의과대학

(2003년 12월 31일 접수, 2004년 3월 11일 수리)

한의학에서 당뇨병 (소갈) 처방으로 사용되는 옥천산 처방의 성분 중의 하나인 오미자의 포도당 이용에 대한 효과를 조사하기 위해서 오미자를 70% 에탄올로 추출한 후 메탄올과 물을 섞은 용액으로 단계별로 XAD-4 column으로 분획하였다. 오미자를 복용한 후 혈당을 낮추기 위해서는 인슐린처럼 작용하는 인슐린성 물질이거나, 인슐린 작용을 향상시키는 인슐린 민감성 물질로 작용하거나, 또는 α -glucoamylase 활성을 억제하여 탄수화물의 소화를 방해 작용이 있어야 하므로 본 연구에서는 섬유아세포와 지방세포 3T3-L1에서 각 분획층이 이러한 3가지 기전에 관여하는지를 조사하였다. 오미자 분획물은 인슐린성 물질로 작용하거나 α -glucoamylase의 활성을 저하시켜 탄수화물의 소화를 방해하지 않았다. 그러나 오미자 분획층은 인슐린의 작용을 향상시켜 포도당의 흡수를 증가시키는 효과가 매우 컸다. 특히 오미자 분획층 중 Fr. 4(메탄올 60%)와 Fr. 5(메탄올 80%)는 지방세포 3T3-L1에서 포도당의 흡수를 현저하게 증가시켜 인슐린을 50 ng/ml를 처리한 것보다도 효과적으로 포도당 흡수를 증가시켰다. Fr. 4와 Fr. 5에서 포도당 흡수가 증가한 것은 Fr. 4와 5가 인슐린 작용을 향상시켜 세포막에 GLUT4 양을 증가시킨 결과이었다. 결론적으로 오미자 중 특히 Fr. 4와 Fr. 5에 인슐린 민감성 제제가 함유되어 있을 것으로 추정된다.

Key words: insulin sensitizer, insulin-like substance, α -glucoamylase, Okchun-san(OCH), 3T3-L1 adipocytes

서 론

당뇨병은 인슐린이 분비가 되지 않거나 인슐린의 작용력이 감소하여 나타나는 것으로 전자는 제1형 당뇨병에 그리고 후자는 제2형 당뇨병에 속한다. 제2형 당뇨병은 인슐린이 분비되지만 인슐린 작용 조직에서 그 작용력이 낮아져 정상 혈당을 유지하지 못하므로 혈당이 점점 높아지고 이에 대응하여 췌장의 베타세포에서 지속적으로 인슐린이 분비되어 고인슐린혈증을 동반한다.^{1,2)} 그러나 우리나라의 제2형 당뇨병은 인슐린 작용력이 낮는데 인슐린 분비도 낮아서 서구에 비해 당뇨병 증세도 심하고 비만하지 않은 특징을 가지고 있다.^{3,4)} 그러므로 우리나라의 제2형 당뇨병을 치료함에 있어서 인슐린 작용력을 향상시키고 동시에 인슐린 분비능도 증가시키는 것이 중요하다는 것이 알려져 있다. 현재 제2형 당뇨병 치료제를 살펴보면 인슐린 분비능을 증가시키는 sulfonylurea 계통의 약물이 있고, 인슐린 작용력을 향상시키는 pioglitazone 계통의 약물이 있으며 간에서 당신생합성을 감소시키는 metformin 계통의 물질도 있고 탄수화물의 소화흡수를 방해하여 식후 혈당의 상승을 방지하는 acarbose 계통의 약물도 있다.^{5,7)}

우리나라를 비롯한 아시아의 여러나라에서는 민간요법으로 여러 가지 약초들을 당뇨병 및 여러 질병의 치료제로 사용하여 왔다.⁸⁻¹⁰⁾ 그러나 민간요법에서 당뇨병의 효과가 있는 것으로 알려진 것 중에서 효과가 있는 것도 있었지만 없는 것도 있다는 것이 보고되고 있다. 사용되고 있는 많은 한약재중에서도 아직

까지 그 효과가 밝혀진 것은 많지 않고 특히 어떤 기전으로 혈당을 낮추는지에 대한 연구는 많지 않다. 본 연구팀은 동의보감에서 당뇨병의 처방에 많이 사용하는 50 여종의 약초들을 중심으로 먼저 섬유아세포와 지방세포 3T3-L1을 사용하여 *in vitro*에서 인슐린 민감성이나 인슐린 유사성 물질을 탐색하였다.¹¹⁻¹⁴⁾ 효과가 있는 한약재의 분획층은 더 분리하여 단일 물질로 분리하고 있으며, 이 물질들의 효과는 백서에 장기간 투여하였을 때 인슐린 민감성이나 인슐린 분비능의 변화를 조사하고 있다. 연구한 한약재 중에서 이미 발표한 것으로 울무, 상백피, 둥굴레 뿌리의 분획물에는 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있는 것을 발견하였다.¹¹⁻¹³⁾ 특히 둥굴레 뿌리 추출물은 90% 췌장을 제거한 백서에서 인슐린 민감성을 호전시킴으로써 체내 포도당 이용을 증가시켜 혈당을 강하시키는 효과가 있었다.¹³⁾ 또한, 둥굴레 뿌리에 함유되어 있는 steroidal glycosides가 90% 췌장 제거 백서에서 인슐린 민감성 물질로 작용한다는 것을 확인하였다.¹⁴⁾ 본 연구팀이 한약재가 혈당 강하에 대한 효과가 있는지를 조사할 때 표적(target)으로 조사한 것은 인슐린의 작용을 향상시키는 인슐린 민감성 효과, 인슐린처럼 작용하는 인슐린성 효과, 탄수화물의 소화 흡수를 방해하는 α -glucoamylase 억제 효과를 가지고 있는 지 여부를 조사하는 것이었다.

오미자는 목련과(Magnoliaceae)의 식물인 오미자(*Schizandra chinensis* (Turcz.) Baillon)의 과실로 시고, 달고, 맵고, 쓰고, 떼은 맛을 낸다고 하여 지어진 이름이다. 오미자에는 시잔드롤(Schizandrol), 시잔드린(Schizandrin) A, B, C, 안질로일고미신(angelylgomisin) O, P, 에피고미신(epigomisin), 프레고모이신(pregomisin), 데옥시시잔드린(Deoxyschizandrin) 등을 함유한다. 오미자는 오래전부터 수렴, 자양, 강장, 진해약, 해주독, 목마름, 수렴고삼, 익기생진, 보신염심 등의 약효를 가지고 있어 생약원

*연락처

Tel: 82-41-540-5633; Fax: 82-41-548-0670

E-mail: smpark@office.hoseo.ac.kr

료로 한방에서 사용해오던 재료이다.^{15,16)} 아직까지 오미자의 혈당 강하 효과에 대한 연구는 미미하다. 그러나 동의보감에 기록된 당뇨병(소갈) 처방의 하나인 옥천산의 주원료로 오미자가 사용되어 왔고 이는 오미자가 혈당 강하 능력이 있음을 잠재적으로 의미하는 것으로 사료된다. 그러므로 본 연구에서는 오미자가 인슐린 작용을 향상시키는 인슐린 민감성 효과, 인슐린처럼 작용하는 인슐린성 물질로서의 효과 그리고 α -glucoamylase의 억제제로의 효과가 있는 지 여부를 조사하여 오미자가 당뇨병 치료에 있어서 어떠한 작용을 하는지에 대한 연구 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

한약재료. 본 실험에 사용한 오미자는 *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baillon의 과실로 서울 경동시장에서 2002년 10월에 구입한 후 한국한의학연구원에서 엄격하게 감별하고 선정한 것을 사용하였고, 일련 번호를 붙이고 한국한의학연구원 표본실에 보관하고 있다.

시료의 조제. 오미자 1kg에 70% 에탄올 10L을 넣고 2시간 열수로 2회 반복 추출한 후 꺼즈로 여과하고 450×g로 원심분리(Megafuge 1.0R, USA)하여 상등액을 회전진공 농축기(Buchi R-114, USA)로 35°C에서 감압농축한 후 동결건조(Ilshin Freeze dryer, Korea)하여 분말 추출시료를 만들었다. 열수분말추출시료 1g을 증류수 10ml에 현탁시켜 현탁액으로 만든 후, amberlite XAD-4 gel을 충전한 유지컬럼(직경: 30mm; 길이: 300mm)으로 정제하였다. 이때 용출액은 메탄올의 양을 증량시켜 극성을 변화시키면서 H₂O(Fr. 1), 20% 메탄올(Fr. 2), 40% 메탄올(Fr. 3), 60% 메탄올(Fr. 4), 80% 메탄올(Fr. 5) 및 100% 메탄올(Fr. 6)으로 나누어 분획하여 감압농축 후 동결건조하여 사용하였다. 각각의 분획층은 10% DMSO에 1mg/ml로 녹인 후 sonicator로 20초 동안 진탕하여 침전물 없이 모두 용해시켰다.

인슐린성 물질 탐색 실험. 혈구계산기(Haemocytometer)로 계산된 5×10^3 cells/ml의 세포를 24 well plate의 각 well에 넣고 phosphate buffer saline(PBS)로 세척한 후 1% bovine serum albumin(BSA)을 함유하고 있는 고농도 포도당 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지에서 2일 동안 배양하였다. 배양한 후 새로운 DMEM배지로 교환하였다. 배양 후 70% 에탄올로 추출한 오미자 시료를 1mg/ml의 농도로 녹인 후 final 농도가 각각 1, 10, 100 및 250 μ g/ml의 농도가 되도록 첨가하여 5일간 배양한 후 지방세포로의 분화를 조사하였다. 이때 대조군은 오미자 추출물이 함유되지 않은 DMSO를 실험군에 첨가한 것과 같은 양 첨가하여 배양하였다. 또한 오미자 추출물의 분화 유도물질이 존재할 때 이 물질들을 도와 분화를 촉진시키는지 조사하기 위해서 분화유도물질인 0.25 μ M의 dexamethasone(DEX, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), 0.5 mM의 1-methyl-3-isobutylxanthine(IBMx, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), 10 μ g/ml의 인슐린(Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA)이 함유된 DMEM 배지에 오미자 추출물을 각각 1, 10, 100 및 250 μ g/ml 첨가하여 5일간 배양하였다.¹⁸⁾

대조군으로는 분화유도물질만이 함유된 DMEM 배지를 사용하였다. 분화정도의 측정에는 Oil-Red-O로 염색하여 지방 함량을 측정하였는데,¹⁹⁾ phosphate buffer(PBS)로 2회 세척 후, 10% formalin을 50 μ l씩 첨가(최종농도 3% formalin)하여 30분간 세포를 고정시켰다. 고정된 세포를 증류수로 3회 반복하여 세척하고, 공기중에서 건조한 다음, Oil-Red-O로 2시간 동안 염색하였다. 염색후 증류수로 3회 세척한 후 공기 중에서 건조시키고 isopropyl alcohol 100 μ l씩 분주하여 1시간 동안 용출시켜 ELISA 분석기로 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

지방세포내로의 포도당 섭취 실험. 계대 배양한 후 섬유아세포 3T3-L1이 75 cm² flask에 완전히 채워질 때까지 배양하였다. 배양용기 바닥을 완전히 채운 지 2일 후에 유도 분화 물질을 넣어 3일 동안 배양한 후 2일에 한번씩 고농도 포도당 DMEM 용액으로 새로 바꾸어 주어 지방세포로 완전히 전환된 10-15일 사이에 포도당 섭취 실험을 하였다. 배양용기에 있는 지방세포의 수를 세어 24 well plate의 well을 빈 공간없이 완전히 채울 수 있도록 분주하였다. Well plate에 옮긴 지방세포를 PBS로 세척한 후 500 μ l의 1% BSA를 함유하고 있는 저농도의 포도당을 함유한 DMEM에서 12시간 이상 지난 후에 HEPES 용액으로 37°C에서 30분 동안 배양한 후 1 μ Ci/ml의 [¹⁴C]2-deoxy-glucose와 1 mM 포도당을 첨가하고 22°C에서 30분 동안 배양하여 포도당의 세포내로의 섭취 정도를 ¹⁴C이 세포내로 이동한 양으로 측정하였다. 비특이적인 포도당 섭취를 배제하기 위해서 glucose transporter 4(GLUT4)의 작용을 억제하는 cyto B와 함께 배양하였을 때의 포도당 이동량을 빼고 세포내로 이동한 포도당의 양을 측정하였다. 세포는 10 mM 포도당이 함유한 PBS로 세척하고 0.5 N NaOH로 세포를 분해하였다.¹⁴⁾ 분해된 세포를 초산으로 중화시키고 함유된 ¹⁴C의 함량을 베타 counter(Tri-Carb 2100TR, Packard Bioscience, IL)로 측정하였다.

오미자 추출물 분획이 포도당 섭취에 미치는 영향을 조사하기 위해서 오미자 추출물 분획을 DMSO에 1mg/ml로 녹인 후 이것을 PBS에 0.3와 3 μ g/ml로 희석시켜 두 가지 농도에서 포도당 섭취를 측정하였다. 오미자의 각 분획에 인슐린 민감성 제제가 함유되어 있는지의 여부를 조사하기 위해서 지방세포 3T3-L1에 인슐린 1 ng/ml과 함께 각 분획을 넣고 1시간 동안 배양한 후에 포도당 섭취 정도를 인슐린 50 ng/ml에서의 결과와 비교하였다. 대조군으로 인슐린 0, 1 그리고 50 ng/ml을 사용하였다. 모든 실험은 3 반복하였고, 실험결과는 인슐린과 오미자 추출물을 모두 처리하지 않은 것의 값에 대한 비로 나타내었다. 분리한 물질이 인슐린의 작용에 관계없이 detergent로 작용하여 세포막을 파괴시켜 포도당 섭취를 증가시키는 것을 배제하기 위해서 인슐린이 0 ng/ml에서 분리한 물질과 함께 포도당 섭취를 측정하였을 때 기저(basal) 값보다 높은 것은 포도당 섭취를 증가시킨다고 해도 인슐린 민감성 제제로서의 작용이 없는 것으로 간주하였다.²⁰⁾

세포막의 GLUT4 양. Plate(10 cm²)에 지방세포 3T3-L1을 옮긴 다음 지방세포 3T3-L1은 혈장 대신 3% BSA를 첨가한 고농도 포도당 DMEM에서 12시간동안 배양한 후에 3 μ g/ml의 오미자 분획을 첨가하고 5시간동안 배양한 후 0, 1 또는 50

ng/ml 인슐린을 5분 동안 처리하였다. 지방세포는 차가운 PBS로 반응을 중단시키고 바로 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 1% NP40, 10% glycerol, 12 mM α -glycerol phosphate과 protease inhibitor를 포함하는 20 mM Tris(pH 7.4)로 구성된 lysis buffer로 세포를 용출시켰다. 이 세포 용출액은 30분 동안 얼음 속에 방치시킨 후 세포막을 분리하였다.²¹⁾ 분리한 세포막의 단백질 함량을 Lowry 방법으로²²⁾ 측정 후 동량의 세포막 단백질에 함유된 glucose transporter 4(GLUT4) 함량을 anti-GLUT4 antibody(Chemicon, Temecula, CA)를 사용하여 immunoblotting 방법으로 측정하였다.²¹⁾

In vitro α -glucoamylase 실험. α -glucoamylase는 50 mM sodium acetate 용액으로(pH 5.0) 5 mg/ml로 희석시키고, 기질인 말토스 20 mg/ml로 증류수에 녹인 후 1:1의 비율로 섞었다. 약물은 동결건조한 것을 1 mg/ml의 농도로 DMSO로 녹이고 이것을 PBS로 희석하여 사용하였다. 오미자 분획물은 50 μ g/ml의 농도로 사용하였다. 이 반응 용액은 37°C에서 1시간 동안 배양시켰다. 1시간 후에 150 μ l의 0.2 M NaOH로 반응을 종결시키고 중화하기 위해서 150 μ l의 0.2 M 초산 용액을 넣어주었다. 반응 후 생성되는 유리 포도당 양을 측정하여 α -glucoamylase의 활성을 측정하였다. 대조군은 오미자 분획물의 용매인 DMSO만을 처리한 것에서 생성되는 유리 포도당 양으로 결정하였다. 결과는 DMSO만을 처리하였을 때 생성되는 유리 포도당 양에 비해 오미자 분획물을 넣었을 때 유리 포도당의 생성이 감소되는 정도를 백분율(%)로 계산하였다.

통계적 처리. 모든 결과는 세 번 반복에 대한 평균과 표준편차로 계산하여 나타내었다. 지방세포 3T3-L1에서 포도당 섭취가 증가하는 정도는 인슐린 1 ng/ml만을 넣고 측정 한 값과 인슐린 1 ng/ml와 오미자 분획물을 함께 넣고 측정 한 값을 two sample t-test로 통계적 유의성을 검증하였다. 오미자 추출물의 세포의 분화능 효과와 in vitro에서 α -glucoamylase 활성에 미치는 영향은 대조군과의 비를 백분율로 계산하여 one sample t-test 방법으로 통계적 유의성을 검증하였다. 모든 통계 처리의 유의성 검증은 $\alpha = 0.05$ 로 정하였다.

결과 및 고찰

인슐린성 물질로서의 효과. 본 연구에서는 유도 분화 물질에서 인슐린이 중요한 역할을 하므로 섬유아세포 3T3-L1에 분화 유도물질 대신 70% 에탄올 오미자 추출물을 1, 10, 100 및 250 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때와 분화유도물질과 함께 오미자 추출물을 처리하였을 때 지방세포로의 분화정도를 측정하여 대조군인 DMSO를 처리한 것과 백분율로 계산하여 비교하

였다. 전자와 후자에서 모두 오미자 추출물 처리군은 대조군에 비해 오히려 지방 세포로의 전환이 감소하는 경향을 나타내어 오미자 추출물은 인슐린성 물질로 작용하지 않는 것으로 나타났다(Table 1).

본 연구에서 사용한 섬유아세포 3T3-L1은 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있고, 인슐린과 같은 유도물질의 존재하에서는 지방 세포로 분화되는 특성을 갖고 있어 분화를 촉진하는 물질인 인슐린과 유사한 물질(인슐린성 물질)의 존재 여부를 탐색하는 실험에 사용한다. 섬유아세포 3T3-L1은 인슐린, DEX와 IBMX로 조성된 분화유도물질을 첨가하였을 때 지방세포로 전환되는 데,^{23,24)} 이 기전은 아직 확실하게 알려지지는 않았다. 알려진 기전으로는 지방세포의 분화는 지방 조직세포에 특이적으로 발현되는 유전자들의 조절부위에 작용하는 transcription factor들이 섬유아세포가 지방세포로 분화되는 과정에 발현되어 진행한다고 한다. 이 과정에 관여하는 transcription factor는 peroxisome proliferation activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancing binding protein(C/EBP), adipocyte differentiation and determinator factor 1(ADD1) 그리고 sterol regulatory element binding protein 1c(SREBP1c) 등이 있다. 유도 분화물질은 이 과정에 관여하는 transcription factor들의 발현을 촉진시킴으로써 섬유아세포를 지방 세포로 전환시키는 것으로 알려졌다. 특히 PPAR γ 는 세포의 성장을 막고 지방세포로 전환을 시작할 뿐 아니라 지방세포의 분화의 조절에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, C/EBP는 지방 조직에서 많이 발현되고 PPAR γ 를 도와서 전지방세포를 지방세포로 전환시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.²³⁻²⁶⁾

Ko 등¹²⁾의 연구에서 분화유도물질이 첨가되지 않은 경우에는 얼마나 추출물을 1와 10 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 대조군에 비해 각각 $115.4 \pm 5.1\%$ ($P < 0.05$)와 $126.9 \pm 2.1\%$ ($P < 0.001$)로 유의성 있게 분화를 촉진시켰다. 또한 분화유도물질과 함께 분화유도물질을 첨가하였을 때 1 μ g/ml에서는 $122.3 \pm 5.3\%$ ($P < 0.05$)로 분화를 촉진 시켜 인슐린성 물질로 작용한다는 것을 알 수 있었다. 또한 Kameda 등²⁷⁾은 인슐린은 지방세포에서 지방분해를 저해하고 지방합성을 촉진하는 호르몬으로 인슐린처럼 지방합성을 촉진시키든지 지방분해를 억제하는 물질을 인슐린성 물질이라고 정의하였고, 로알제리로부터 불포화지방산 trans-10-hydroxy-2-decanoic acid와 마황에서 non-pseudoephedrine 이 인슐린성 물질임을 확인하였다.

지방세포 3T3-L1에서 인슐린의 농도에 따른 포도당 섭취 증가. 본 연구에서 지방세포 3T3-L1에 인슐린 0, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75 ng/ml를 처리한 후 포도당 섭취 정도를 측정하였을 때 인슐린 농도가 50 ng/ml까지는 인슐린 농도가 증가함에 따

Table 1. Effects of *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baillon extracts on the differentiation of 3T3-L1 fibroblasts

Groups	Schizandrae Fructus (μ g/ml)			
	1	10	100	250
Without differentiation inducers ¹⁾	$89.1 \pm 7.8^2)$	89.6 ± 6.8	83.2 ± 4.4	84.8 ± 3.5
With differentiation inducers	108.3 ± 10.3	97.0 ± 3.9	92.6 ± 10.3	90.1 ± 8.4

¹⁾Inducer is a mixture consisting of 0.25 μ M dexamethasone, 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine and 10 μ g/ml insulin.

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

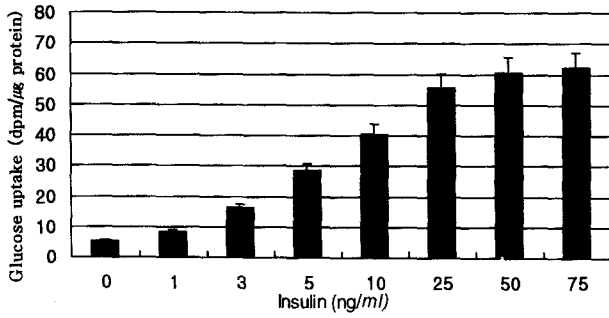


Fig. 1. Insulin-dependent glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. The data given are means \pm SD of triplicate measurements.

라 포도당 섭취가 증가하였고, 50 ng/ml보다 높은 인슐린 농도에서는 인슐린 농도에 따른 세포내로의 포도당 섭취에 차이가 없었다(Fig. 1). 즉, 50 ng/ml 인슐린 농도가 인슐린 수용체를 통한 인슐린 작용을 나타내는 최대 농도로 이 농도 이하에서는 인슐린 농도에 비례하여 인슐린 작용이 증가하지만 그 이상 증가하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

최근에 제2형 당뇨병의 새로운 치료제로 등장한 것이 인슐린 작용을 향상시킴으로 소량의 인슐린으로 혈당을 정상화할 수 있도록 도와주는 인슐린 민감성 물질들이다. 인슐린 민감성 물질은 제2형 당뇨병의 근본적인 문제인 인슐린 저항성을 완화시켜 소량의 인슐린으로 혈당을 정상화시키고 궁극적으로 혈당에 필요한 인슐린 양을 저하시켜 고인슐린혈증을 없애 줄 수 있는 것으로 알려지고 있다.^{1,2,28)} 즉 인슐린 민감성 물질은 당뇨병 뿐 아니라 인슐린 저항성 증후군의 증세를 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 결국 인슐린 저항성을 완화시킨다는 것은 인슐린이 인슐린 수용체와 결합한 후 세포내에서 일어나는 신호전달 체계가 원활하게 일어날 수 있도록 도와주어 세포에서 포도당의 이용을 향상시키는 것이다.

본 연구에서 인슐린 민감성 물질을 탐색하는데 지방세포 3T3-L1을 사용한 이유는 지방세포 3T3-L1은 *in vivo*에 존재하는 대사성 피이드백 루프에 관련된 복잡한 분자와 연루되어 있지 않으면서 인슐린 수용체와 GLUT4를 세포막에 가지고 있어 인슐린에 민감하게 반응하기 때문이다. 인슐린을 처리하면 지방세포 3T3-L1의 세포막에 인슐린이 결합하고 이것은 일련의 인슐린 신호전달체계인 insulin receptor substrate-1(IRS1)-phosphatidylinositol-3-phosphate(PI, kinase)-Akt의 과정을 증폭시킨다. 이 결과로 GLUT4가 세포막으로 translocation되는 것이 증가하게 되어 포도당의 흡수를 증가시키는 것으로 사료된다. 그러므로 지방 세포 3T3-L1은 인슐린의 작용력을 향상시키는 물질을 탐색하거나 인슐린 신호전달체계를 연구하는 모델로 적합하다고 사료된다.^{20,23)}

오미자 추출 분획물이 포도당 섭취에 미치는 영향. 본 연구에서는 지방세포 3T3-L1에 소량의 인슐린인 1 ng/ml과 오미자의 분획물을 처리하였을 때 50 ng/ml 인슐린을 처리하였을 때와 마찬가지로 포도당의 흡수를 증가시키는 지를 조사하였다. 오미자 추출 분획물 0.3 μ g/ml을 처리하였을 때 그 중 Fr. 4와 Fr. 5는 포도당 흡수를 효과적으로 증가시켰고, 특히 인슐린 1과 0.3 μ g/ml과 Fr. 5를 처리하였을 때 인슐린을 50 ng/ml를 처

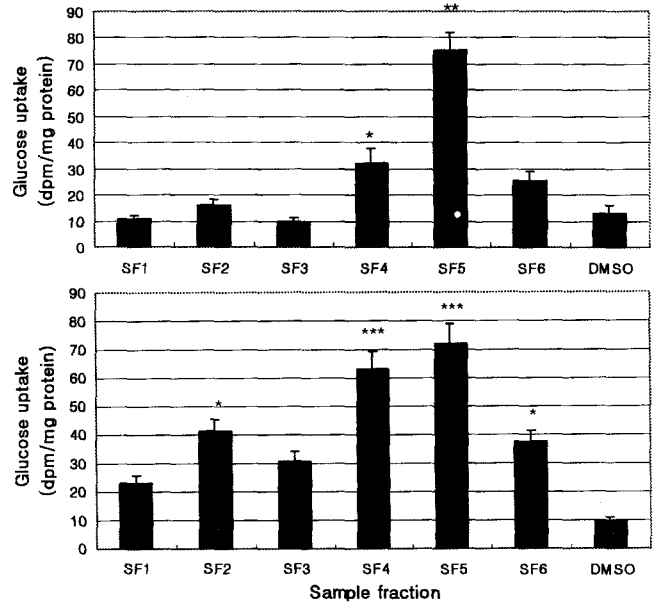


Fig. 2. Effects of Schizandrae Fructus (SF) extracts on glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. The extract was treated with Schizandrae Fructus (SF) extracts at a level of 0.3 (A) and 3 (B) μ g/ml in the presence of 1 ng/ml insulin. The data given are means \pm SD of triplicate measurements. Fr. 1-Fr. 6: 1 ng of insulin + each of Fr 1~Fr. 6. DMSO: treatment of 1 ng of insulin + DMSO (solvent of SF). *Significantly different from DMSO treatment group at $P < 0.05$. **Significantly different from DMSO treatment group at $P < 0.01$. ***Significantly different from DMSO treatment group at $P < 0.001$.

리하였을 때보다 포도당 흡수가 더 많이 증가하였다(Fig. 2A). 오미자 분획물을 3 μ g/ml로 증가시켰을 때 Fr. 1과 Fr. 3을 제외한 Fr. 2, Fr. 4, Fr. 5와 Fr. 6이 모두 인슐린 작용을 증가시켜 포도당의 흡수를 증가시켰다. 특히, 인슐린 1 ng/ml 함께 Fr. 4나 Fr. 5를 첨가하였을 때는 인슐린 50 ng/ml를 처리하였을 때보다도 포도당 흡수를 증가시켜 인슐린 작용이 매우 향상된 것을 알 수 있었다(Fig. 2B). 즉, Fr. 4나 Fr. 5를 첨가시키면 인슐린의 필요량을 50배 감소시킨다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 메탄올이 60%와 80%에서 용출된 분획층에 인슐린 민감성 물질이 함유되어 있다는 것을 알 수 있었고 인슐린 민감성 물질의 후보자들은 비극성에 가까운 양쪽성 물질일 가능성이 높다고 사료된다.

인슐린을 첨가하지 않고 분획층만을 넣은 상태에서 포도당을 흡수하는 정도를 측정하였는데 그 값이 기저값과 유사하거나 오히려 낮아 분획물이 세포막을 투과적으로 만드는 detergent로 작용하여 비특이적으로 포도당의 흡수를 증가시키는 것은 아니라는 것을 확인하였다. 다른 연구에서도 천연물 추출물을 처리하였을 때 인슐린 작용을 증가시켜 포도당 흡수를 증가시키는 것들이 있다고 보고하였다. Krenisky 등²⁹⁾은 페루 전통의약식물 *Otholobium pubescens*에서 bakuchiol을 분리하여 인슐린 민감성에 관여하고 있는 물질이라고 보고하였고, Hong 등³⁰⁾은 인삼, 천문동, 황금, 지골피, 황백, 맥문동으로 구성된 혼합처방이 지방세포 3T3-L1에서 포도당 흡수를 증가시켰다고 보고하고 있다.

세포막의 GLUT4 양의 변화. 지방세포 3T3-L1에서 오미자 분획물이 포도당 흡수를 증가시키는 기전을 조사하기 위해서

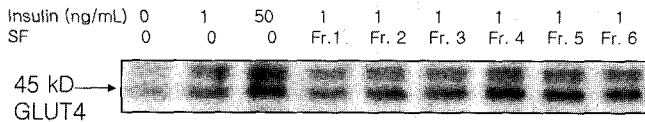


Fig. 3. Immunoblotting of glucose transporter 4 (GLUT4) of 3T3-L1 adipocytes against anti-GLUT4 antibody. Cells were treated with *Schizandrae Fructus* (SF) extracts at 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the presence of 1 ng/ml insulin.

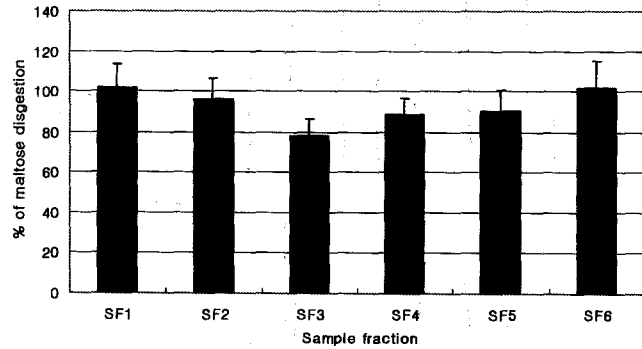


Fig. 4. Effects of *Schizandrae Fructus* (SF) extracts on the digestion of maltose by α -glucoamylase. The data given are means \pm SD of triplicate measurements. Fr. 1-Fr. 6: treatment of each of Fr 1-Fr. 6.

오미자 분획물을 처리하였을 때 인슐린 신호체계를 조사하였다. 지방세포 3T3-L1에 3 $\mu\text{g}/\text{m}$ 의 오미자 추출 분획물을 5시간 처리한 후에 5분 동안 인슐린을 1 ng/ml를 처리하였을 때 세포막에 존재하는 GLUT4의 양을 anti-GLUT4 antibody를 사용하여 immunoblotting한 결과는 Fig. 3에 나타났다. 화살표로 표시된 밴드는 45 KD의 분자량을 가진 단백질인 GLUT4를 나타내는 것으로 오미자 분획 Fr. 4와 Fr. 5를 처리하였을 때 그 밴드가 가장 진하였다. 즉, 오미자 Fr. 4 또는 Fr. 5와 함께 소량의 인슐린을 처리하였을 때 세포막에 존재하는 GLUT4의 양이 급격하게 증가하여 인슐린을 50 ng/ml를 처리한 수준에 도달하였다(Fig. 3). 오미자 분획 Fr. 4나 Fr. 5의 첨가가 이렇게 세포막에 GLUT 4의 양을 증가시킨 것은 인슐린 신호 전달 체계를 향상시켜 인슐린 작용을 증진시킨 것과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고 되고 있다. 또한 세포막의 GLUT4의 증가는 포도당 흡수를 증가시키는 것으로 알려졌다.^{22,28} 본 연구자들은 앞으로 오미자가 어떤 기전으로 세포막의 GLUT4의 양을 증가시키는 지와 오미자의 어떤 화합물이 이 기전을 호전시키는 지를 조사할 것이다. Thiazolidinediones 계통의 약물은 인슐린 민감성 제제로 판매되고 있는데 이것은 지방세포 및 근육세포에서 모두 포도당의 흡수를 증가시키고 그 기전은 GLUT4의 발현을 증가시킬 뿐 아니라 세포막으로의 translocation을 증가시키는 것과 관련이 있다고 알려져 있다.²² 그러므로 오미자의 Fr. 4와 Fr. 5에 함유되어 있는 물질도 인슐린 민감성 제제를 함유하고 있을 것으로 예상된다.

In vitro에서 오미자 추출 분획물이 α -glucoamylase 활성에 미치는 영향. Fig. 4에는 오미자 추출 분획물이 α -glucoamylase 활성에 작용하여 기질인 말토스를 포도당으로 분해하는데 미치는 효과에 대한 결과를 나타내었다. 오미자의 추출 분획물은 대부분 대조군과 비교하였을 때 α -glucoamylase의

활성에 영향을 미치지 않았다. 현재 α -glucoamylase 억제제로서 시판되고 있는 acarbose는 가역적으로 α -D-glycosidase 활성을 억제시키는 약물로 주로 소장 세포의 점막에 존재하는 maltase의 활성을 억제시키는 것으로 알려졌다.³¹⁻³³ Acarbose는 *in vitro*에서 α -glucoamylase와 maltase의 활성을 억제하는데 *in vivo*에서는 말토스 분해를 억제시키는 효과는 약하고 오히려 설당의 분해를 강력하게 억제하는 것으로 알려졌다.^{31,32} 또한 경구 내당 검사를 하기 전에 acarbose를 준 후 30분 이내에 maltose나 설당을 경구 투여하여 혈당을 조사하였을 때 단기간의 효과는 거의 없었고 장기간 acarbose를 공급한 후 경구 내당 검사를 한 경우는 혈당을 약 40% 감소시키는 효과가 있었다고 보고하였다.³³ 오미자는 *in vitro*에서도 효과가 없어서 경구 내당 검사를 할 필요가 없었지만 만약 *in vitro*에서 α -glucoamylase 억제제로 사용하는 것은 반드시 *in vivo* 실험을 하는 것이 바람직하겠다.

결론적으로 본 연구에서 오미자의 분획물의 대부분은 인슐린성 물질과 α -glucoamylase 억제제로는 효과가 없었지만 인슐린 작용을 향상시키는 인슐린 민감성제제로는 그 효과가 매우 컸다. 특히 오미자는 3 $\mu\text{g}/\text{m}$ 의 농도로 사용하였을 때 거의 모든 분획층에서 인슐린 작용을 향상시킬 뿐 아니라 특히 인슐린 1 ng/ml와 Fr. 4와 Fr. 5를 처리하였을 때 그 효과가 매우 컸다. 이렇게 포도당 흡수를 증가시킨 것은 포도당의 흡수에 관여하는 세포막의 GLUT4 함량의 증가와 밀접한 관계가 있다고 여겨진다. 그러므로 이러한 기전을 통하여 오미자를 투여할 때 혈당을 정상화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 오미자에는 인슐린 저항성을 저하시키는 물질이 함유되어 있으므로 당뇨병 및 인슐린 저항성의 치료와 예방에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것입니다(02-PJ9-PG1-CO02-0002).

참고문헌

- DeFronzo, R.A., Bonadonna, R.C. and Ferrannini, E. (1992) Pathogenesis of NIDDM: A balanced overview. *Diabetes Care* **15**, 318-353.
- Kadowaki, T., Hara, K., Yamauchi, T., Terauchi, Y., Tobe, K. and Nagai, R. (2003) Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **228**, 1111-1117.
- Min, H.K. (1992) Clinical characteristics of Korean diabetic patients. *Kor. J. Diabetes* **16**, 163-170.
- Kim, J., Choi, S., Kong, B., Oh, Y. and Shinn, S. (2001) Insulin secretion and sensitivity during oral glucose tolerance test in Korean lean elderly women. *J. Korean Med. Sci.* **16**, 592-597.
- Fineman, M. S., Bicsak, T. A., Shen, L. Z., Taylor, K., Gaines, E., Varns, A., Kim, D. and Baron, A. D. (2003) Effect on glycemic control of exenatide (synthetic exendin-4) additive to existing metformin and/or sulfonylurea treatment in patients

- with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **26**, 2370-2377.
6. Tosi, F., Muggeo, M., Brun, E., Spiazzi, G., Perobelli, L., Zanolin, E., Gori, M., Coppini, A. and Moghetti, P. (2003) Combination treatment with metformin and glibenclamide versus single-drug therapies in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, comparative study. *Metabolism* **52**, 862-867.
 7. Oudjeriouat, N., Moreau, Y., Santimone, M., Svensson, B., Marchis-Mouren, G. and Desseaux, V. (2003) On the mechanism of alpha-amylase. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3871-3879.
 8. Hae, J. (1990) DongEuBoGam, NamSanDang, Seoul, pp. 140-142.
 9. Takahashi, N., Kawada, T., Goto, T., Yamamoto, T., Taimatsu, A., Matsui, N., Kimura, K., Saito, M., Hosokawa, M., Miyashita, K. and Fushiki, T. (2002) Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPARgamma and PPARalpha in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. *FEBS Lett.* **514**, 315-322.
 10. Kamei, R., Kadokura, M., Kitagawa, Y., Hazeki, O. and Oikawa, S. (2003) 2'-benzyloxychalcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci.* **73**, 2091-2099.
 11. Ju, Y.S., Park, S. and Ko, B.S. (2002) Effect of Insulin-like Action and Insulin Signal Transduction on 3T3-L1 Adipocytes from Coisis Semen. *Kor. J. Chinese Med.* **23**, 103-114.
 12. Ko, B.S., Kim, H.K. and Park, S. (2002) Insulin sensitizing and insulin-like effects of water extracts from *Kalopanax pictus* NAKA fractions in 3T3-L1 adipocytes. *Kor. J. Agri. Chem. Biotech.* **45**, 42-46.
 13. Choi, S. B. and Park, S. (2002) The effects of water extract of *Polygonatum Odoratum* (Mill) Druce on insulin resistance in 90% pancreatectomized rats. *J. Food Sci.* **67**, 2375-2379.
 14. Choi, B. S. and Park, S. (2002) A steroidal glycoside from *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce. improves insulin resistance but does not alter insulin secretion in 90% pancreatectomized rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* **66**, 2036-2043.
 15. Bao, T. T., Liu, G. T., Song, Z. Y., Xu, G. F. and Sun, R. H. (1980) A comparison of the pharmacologic actions of 7 constituents isolated from *Fructus schizandrae*. *Chin. Med. J.* **93**, 41-47.
 16. Members of Pharmacognosy. (1999) In *HyundDai pharmacognosy*, Hak ChangSa, pp. 434-438.
 17. Mimaki, Y., Watanabe, K., Ando, Y., Sakuma, C., Sashida, Y., Furuya, S. and Sakagami, H. (2001) Flavonol glycosides and steroidal saponins from the leaves of *Cestrum nocturnum* and their cytotoxicity. *J. Nat. Prod.* **64**, 17-22.
 18. Gray, A. M. and Flatt, P. R. (1999) Insulin-reasing and insulin-like activity of the traditional antidiabetic plant *Coriandurm sativum* (coriander). *Brit. J. Nutr.* **81**, 203-209.
 19. McNeel, R. L. and Mersmann, H. J. (2003) Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation. *J. Nutr. Biochem.* **14**, 266-274.
 20. Lakshmanan, J., Elmendorf, J. S. and Ozcan, S. (2003) Analysis of insulin-stimulated glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Methods Mol. Med.* **83**, 97-103.
 21. Shintani, M., Nishimura, H., Yonemitsu, S., Ogawa, Y., Hayashi, T., Hosoda, K., Inoue, G. and Nakao, K. (2001) Troglitazone not only increases GLUT4 but also induces its translocation in rat adipocytes. *Diabetes* **50**, 2296-2300.
 22. Chou, S. C. and Goldstein, A. (1960) Chromogenic groupings in the Lowry protein determination. *Biochem. J.* **75**, 109-115.
 23. Huo, H., Guo, X., Hong, S., Jiang, M., Liu, X. and Liao, K. (2003) Lipid rafts/caveolae are essential for insulin-like growth factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction. *J. Biol. Chem.* **278**, 11561-11569.
 24. Gerhold D. L., Liu F., Jiang G., Li Z., Xu J., Lu M., Sachs, J. R., Bagchi A., Fridman A., Holder D. J., Doebber T. W., Berger J., Elbrecht A., Moller D. E. and Zhang B. B. (2002) Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferation-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology* **143**, 2106-2118
 25. Miki, H., Yamauchi, T., Suzuki, R., Komeda, K., Tsuchida, A., Kubota, N., Terauchi, Y., Kamon, J., Kaburagi, Y., Matsui, J., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S., Tobe, K. and Kadowaki, T. (2001) Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol. Cell Biol.* **21**, 2521-2532.
 26. Yamamoto, H., Kurebayashi, S., Hirose, T., Kouhara, H. and Kasayama, S. (2002) Reduced IRS-2 and GLUT4 expression in PPAR gamma 2-induced adipocytes derived from C/EBPbeta and C/EBPdelta-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J. Cell Sci.* **115**, 3601-3607.
 27. Kameda, K., Chikaki, M., Morimoto, C., Jiang, M. and Okuda, H. (1996) Insulin like action of trans-10-hydroxy-2-decanoic acid and its related substance. *J. Traditional Med.* **13**, 456-457.
 28. Ciaraldi, T. P., Kong, A. P., Chu, N. V., Kim, D. D., Baxi, S., Loviscach, M., Plodkowski, R., Reitz, R., Caulfield, M., Mudaliar, S. and Henry, R. R. (2002) Regulation of glucose transport and insulin signaling by troglitazone or metformin in adipose tissue of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* **51**, 30-36.
 29. Krenisky, J. M., Luo, J., and Carney, J. R. (1999) Isolation and antihyperglycemic activity of bakuchiol from *Otholobium pubescens* (Fabaceae), a peruvian medicinal plant used for the treatment of diabetes. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 1137-1140.
 30. Hong, S. J., Fong, J. C. and Hwang, J. H. (2000) Effect of crude drugs on glucose uptake in 3T3-L1 adipocyte. *Gaxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi* **16**, 445-451.
 31. Herrmann, B. L., Schatz, H. and Pfeiffer, A. (1998) Continuous blood glucose monitoring: the acute effect of acarbose on blood glucose variations. *Med. Klin.* **93**, 651-655.
 32. Carrascosa, J. M., Molero, J. C., Fermin, Y., Martinez, C., Andres, A. and Satrustegui, J. (2001) Effects of chronic treatment with acarbose on glucose and lipid metabolism in obese diabetic Wistar rats. *Diabetes Obes. Metab.* **3**, 240-248.
 33. Scheen, A. J. (1998) Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials. *Diabetes Metab.* **24**, 311-320.

A Study on Hypoglycemic Effects of Crude Extracts of *Schizandrae Fructus*

Byoung-Seob Ko¹, Seong Kyu Park², Soo Bong Choi³, Dong Wha Jun, Mi Kyung Choi and Sunmin Park* (*Food and Nutrition, Hoseo University; ¹Korea Institute of Oriental Medicine; ²College of Oriental Medicine, Kyung Hee University; ³School of Medicine, Konkuk University*)

Abstract: Hypoglycemic effect of *Schizandrae Fructus* (SF) extract containing in Okchun-san was determined on 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes by investigating insulin-like activity, insulin sensitizing activity and α -glucoamylase suppressing activity. SF were extracted by using 70% ethanol followed by XAD-4 column chromatography with a mixture solvent of methanol and water, and the fractional extractions were utilized for assaying hypoglycemic effect. No inhibition of α -glucoamylase activity of SF was observed. Insulin-like activity in 3T3-L1 adipocytes was not shown by SF. A significant insulin sensitizing activity of SF extractions was observed in 3T3-L1 adipocytes, giving SF extractions with 1 ng/ml insulin to reach glucose uptake level increased by 50 ng/ml of insulin alone. When cells were treated with SF (Fr. 4 or 5) plus 1 ng/ml insulin, glucose uptake was increased more than seven times as compared to 1 ng/ml of insulin alone, suggesting that SF extracts increased GLUT4 content by enhancing insulin signaling. These data suggest that SF extracts (especially Fr. 4 and 5) contains an effective insulin sensitizing compounds for hypoglycemic activity in 3T3-L1 adipocytes.

Key words: insulin sensitizer, insulin-like substance, α -glucoamylase, Okchun-san (OCH), 3T3-L1 adipocytes

*Corresponding author