

RAW 264.7 세포에서 Metformin과 병행투여 시 상승효과를 나타내는 한약재의 선별 연구

김형구 · 왕경화 · 채희성¹ · 진영원¹ · 최한석² · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학과교실, ¹동국대학교 약학대학 약학교실, ²동국대학교 의과대학 내분비내과교실

Screening of Herbal Medicines for Synergistic Effects of Metformin and Herbal Extracts Combination in RAW 264.7 Cells

Hyung-Gu Kim, Jing-Hua Wang, Hee-Sung Chae¹, Young-Won Chin¹, Han-Seok Choi², Hojun Kim

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University, ¹Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Dongguk University, ²Department of Endocrinology Medicine, College of Medicine, Dongguk University

Received: May 20, 2014
Revised: May 31, 2014
Accepted: June 2, 2014

Correspondence to: Hojun Kim
Department of Oriental Rehabilitation
Medicine, Dongguk University Ilsan
Oriental Hospital, 27 Donggung-ro,
Ilsandong-gu, Goyang 410-773,
Korea
Tel: +82-31-961-9111
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2014 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: This study was performed to evaluate the effects of Metformin and Lonicerae Flos, Agrobacterium Rhizogenes, Coptidis Rhizoma, Atractylodis Rhizoma Alba, Houltuyniae Herba extracts combinations on hypoglycemia in RAW 264.7 cells.

Methods: Expressions of Sirt1, p-adenosine monophosphate-activated kinase (p-AMPK), AMPK-alpha, peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)-alpha, PPAR-gamma, X-box binding protein 1 (XBP-1), tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin (IL)-6 were analyzed by real time polymerase chain reaction and Western blotting analysis.

Results: The level of gene expression of Sirt1, p-AMPK, AMPK-alpha, PPAR-alpha and XBP-1 in relation to that of beta-actin were increased or decreased significantly with the Metformin and Lonicerae Flos, Agrobacterium Rhizogenes extracts combination groups. The level of gene expression of TNF-alpha and IL-6 were increased significantly with the Metformin and Houltuyniae Herba, Coptidis Rhizoma extracts combination groups.

Conclusions: Metformin and Lonicerae Flos, Agrobacterium Rhizogenes extracts combination groups showed synergistic hypoglycemic effects by increasing AMPK and PPAR gene expression in RAW 264.7 cells.

Key Words: Metformin, Herbal medicines, Synergistic effects, Combination, Hypoglycemia

서론

당뇨병은 인슐린의 절대적 또는 상대적 결핍 및 조직에서의 인슐린 작용성 저하에 기인하는 고혈당과 이에 수반되는 대사장애를 특징으로 하는 질환이다. 인류문명의 발달에 따른 식이형태와 생활 양식의 변화로 인해 비만인구와 함께 증가추세에 있는 제2형 당뇨병(type 2 diabetes mellitus)은 인슐린의 분비가 절대적으로 부족한 제1형 당뇨병(type 1 diabetes mellitus)과는 달리 인슐린 저항성이 주요한 병태 생리학적 특징이다. 인슐린 저항성은 유전적인 요인과 함께

말초조직에서 인슐린 감수성을 감소시키는 식이형태나 비만, 운동부족, 스트레스 등의 생활습관과 밀접한 관련이 있다¹⁾. 인슐린 민감성의 감소는 비만과 매우 높은 연관성을 가지며, 비만 상태에서의 염증 반응이 인슐린 민감성을 감소시킨다는 연구들이 많이 보고되고 있다²⁾.

현재 제2형 당뇨병 치료제를 살펴보면 인슐린 분비능을 증가시키는 sulfonlurea 계통의 약물이 있고, 인슐린 작용력을 향상시키는 peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR gamma) agonist인 pioglitazone과 rosiglitazone의 약물이 있으며 간에서 당신생 합성을 감소시키는

Metformin 계통의 물질도 있고 탄수화물의 소화흡수를 방해하여 식후 혈당의 상승을 방지하는 acarbose 계통의 약물도 있다³⁻⁵.

Metformin은 biguanide계 약물로 현재 제2형 당뇨병 환자의 1차 약물요법으로 사용되고 있으며 특히 다른 경구용 혈당강하제에 비해 저혈당 및 체중증가 등의 부작용이 적다는 장점이 있다. 하지만 드물게 젖산증(lactic acidosis)을 유발하는 것으로 보고되었고, 이로 인해 신질환, 간질환, 저산소증, 심각한 감염, 알코올중독증 등이 동반된 경우에는 주의해야 한다⁶.

Metformin은 French lilac의 주요성분으로 1957년부터 유럽에서 사용되어 왔고, 미국에서는 1994년부터 사용이 허가되었으나, 작용점 및 작용기전에 근거하여 개발된 약물이 아니며, 작용기전은 비교적 최근에 밝혀졌다. 이제까지 알려진 대표적인 작용기전은 세포의 에너지 조절에 관여하는 adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK)의 활성화를 유도하여 간에서 당 신생작용을 억제하고 근육 및 간에서 지방산 산화를 촉진시키는 것으로 보고되었다⁶. 최근 연구결과에 의하면 Metformin의 혈당저하작용에는 AMPK의 인산화 상위 kinase인 LKB1이 필요한 것으로 밝혀졌으며, LKB1에 의해 transcriptional co-activator인 TORC2의 인산화를 통한 당신생 억제작용을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

제2형 당뇨병 발생의 중요한 인자인 비만과 인슐린 저항성에 염증반응이 밀접하게 연관되어 있음이 밝혀짐에 따라 향후 염증관련 연구가 제2형 당뇨병을 비롯한 대사증후군의 병인 규명에 중요한 기여를 할 것으로 생각된다. 현재까지 Metformin의 염증관련 연구는 소수의 논문이 발표되어 있으며, 대부분 심순환계 작용과 관련하여 혈관내피세포(endothelial cell)를 중심으로 염증반응을 억제한다는 결과가 보고되었다. 예를 들면 Metformin은 endothelial cell에서 AMPK 활성화를 통해 nuclear factor kappa B 활성을 억제하며, endometriotic stromal cell에서 interleukin (IL)-8 및 aromatase 활성을 억제하는 것으로 보고되었다⁷. 따라서 Metformin의 macrophage에서의 항염증 기전을 규명하면 염증반응의 제어가 어떻게 인슐린 저항성 개선 및 혈당강하 작용에 연계되는지를 좀 더 직접적으로 규명할 수 있을 것으로 기대된다.

최근 양약과 한약의 병용을 통하여 약효 상승과 부작용 감소를 얻으려는 시도가 늘어나고 있으나 아직까지 많이 이뤄지지 않았다. 그 중에는 쥐에게 Metformin과 대황을 병용투여했을 때 항산화 효과가 증가한 연구⁸, 쥐에게 Metformin과 황금을 병용투여했을 때 췌장의 인슐린 분비 능력이 개선되고 혈중 중성지방, 콜레스테롤이 유의하게 감소한 연구 등이 있다⁹. 하지만 양약과 한약의 병용이 AMPK 활성화에 영향을 주는지에 대한 연구는 찾아보기 힘들었다. AMPK 활성화에 대한 상승작용이 밝혀진다면, 복용 중인 Metformin의 양을 감량하여 Metformin의 부작용을 최소화할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 백출, 어성초, 금은화, 황금, 황련 추출물을 Metformin과 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여, quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 통해 AMPK, PPAR-alpha, PPAR-gamma, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-alpha, X-box binding protein 1 (XBP-1)을 관찰하였다. 또한 Western blot을 통하여 Sirt1 and p-AMPK protein level 등을 관찰하였다. 상기 실험을 통해 각각의 군에서 Metformin과 한약재의 상호 연관성에 대하여 알아보고자 하였으며, 나아가 Metformin과 병용 투약하여 부작용 감소 및 약효 상승을 시켜주는 한약물 개발 가능성을 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

Macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분주받아 사용하였고, 세포배양은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS)과 2 mL-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 lg/ml streptomycin이 함유된 배지를 사용하였다. CO₂ incubator 37°C, 5% CO₂ - 95% O₂ 조건하에서 배양하였다. 실험에 사용된 백출, 어성초, 금은화, 황금, 황련 추출물(water 100%, ethanol 30%)은 동국대학교 약학대학에서 제공받아 사용하였다.

각각의 세포를 정상군(이하 N), Metformin 처리군(이하 M), 백출 추출물(ethanol 30%) 처리군(이하 BCE), 백출 추출물(water 100%) 처리군(이하 BCW), 어성초 추출물

(ethanol 30%) 처리군(이하 USE), 어성초 추출물(water 100%) 처리군(이하 USW), 금은화 추출물(ethanol 30%) 처리군(이하 GUE), 금은화 추출물(water 100%) 처리군(이하 GUW), 황금 추출물(ethanol 30%) 처리군(이하 HGE), 황금 추출물(water 100%) 처리군(이하 HGW), 황련 추출물(ethanol 30%) 처리군(이하 HLE), 황련 추출물(water 100%) 처리군(이하 HLW), Metformin+백출 추출물(ethanol 30%) 처리군(이하 M+BCE), Metformin+백출 추출물(water 100%) 처리군(이하 M+BCW), Metformin+어성초 추출물(ethanol 30%) 처리군(이하 M+USE), Metformin+어성초 추출물(water 100%) 처리군(이하 M+USW), Metformin+금은화 추출물(ethanol 30%) 처리군(이하 M+GUE), Metformin+금은화 추출물(water 100%) 처리군(이하 M+GUW), Metformin+황금 추출물(ethanol 30%) 처리군(이하 M+HGE), Metformin+황금 추출물(water 100%) 처리군(이하 M+HGW), Metformin+황련 추출물(ethanol 30%) 처리군(이하 M+HLE), Metformin+황련 추출물(water 100%) 처리군(이하 M+HLW)의 22군으로 만들었다. 이후 각각의 세포 군에 24시간 동안 100 µg/ml 약물처리를 하고, 1 mM Metformin을 처리했다.

2. 세포배양

RAW 264.7 cell은 DMEM에 10% FBS와 2 mL-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 lg/ml streptomycin이 함유된 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂,

90% humidity의 조건하에서 배양되었다. 배양된 세포는 2~3일에 한 번씩 배양액을 바꾸어 주면서 배양하여 세포분화가 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline (PBS)으로 세포를 세척한 후 trypsin-EDTA 용액으로 부착된 세포를 분리한 뒤 원심 분리하여 세포를 모은 다음 세포와 배지를 잘 혼합하여 계대 배양하여 사용하였다.

3. Determination of tissue gene expression of RAW 264.7 cell by qRT-PCR

Total RNA는 Trisure (Bioline, USA)를 사용하여 protocol에 따라 분리 정제하였다. 1 µg의 total RNA를 cDNA synthesis kit (Sprint™ RT Complete Oligo- (dT)₁₈; Clontech, MountainView, CA, USA)를 이용하여 protocol에 따라 역전사 반응을 수행하여 first strand cDNA를 얻었다. RT-PCR 샘플은 Light Cycler-Fast Start DNA Master SYBR Green (Roche Applied Science, Indianapolis, ID, USA)을 이용하여 최종 반응 용량을 20 µl로 하여 LightCycler instrument (Roche Applied Science)에서 진행하였다. Primer 종류 및 서열은 Table 1에 표시한 바와 같다. PCR amplification은 C/EBPα에서 95°C에서 10분 동안 prior incubation 후, 45 cycle의 amplification (95°C에서 10초간 denaturation, 52°C에서 10초간 annealing, 72°C에서 15초간 extension) 하였고 beta-actin에서는 95°C에서 10분 동안 prior incubation 후, 35 cycle의 amplification (95°C에서 10초간 denaturation, 52°C에서 10

Table 1. The Primer Sequence Used for Real-Time Polymerase Chain Reaction

Genus specific primers	Direction	Sequence	Annealing temperature (°C)
Beta-actin	F	5'-GCAAGTGCTTCTAGGCGGAC-3'	52
	R	5'-AAGAAAGGGTGTAACGCGAGC-3'	
XBP-1	F	5'-TGGCCGGGTCTGCTGAGTCCG-3'	51
	R	5'-GTCCATGGGAAGATGTTCTGG-3'	
AMPK alpha1	F	5'-AAGCCGACCCAATGACATCA-3'	49
	R	5'-CTTCCTTCGTACACGCAAAT-3'	
PPAR-alpha	F	5'-GCCTGTCTGTCGGGATGT-3'	50
	R	5'-GGCTTCGTGGATTCTCTTG-3'	
PPAR-gamma	F	5'-GCCCTTTGGTGACTTTATGGA-3'	51
	R	5'-GCAGCAGGTTGTCTTGGATG-3'	
TNF-alpha	F	5'-GAACTGGCAGAAGAGGCACT-3'	52
	R	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'	
IL-6	F	5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'	49
	R	5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'	

XBP-1: X-box binding protein, AMPK: adenosine monophosphate-activated kinase, PPAR: peroxisome proliferator activated receptor, TNF: tumor necrosis factor, IL: interleukin.

초간 annealing, 72°C에서 15초간 extension) 하였다. 데이터는 LightCycler Software (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany)로 분석하였다. 각각의 분석에서 cDNA 대신 물을 음성 대조군으로 사용하여 발생가능한 primer-dimer 형성을 체크하였다. 유전자의 전사레벨은 beta-actin을 기준으로 삼아 $2^{-\Delta Ct}$ (목표한 유전자의 threshold 값 - beta-actin의 threshold 값)를 구하는 방식으로 계산되었고, 유전자의 발현량은 differentiation media만 처리한 대조군을 1.0으로 간주하여 상대적인 값을 측정하였다.

4. Western blot analysis

Cell lysate preparation을 위해 처리된 세포를 150 mM NaCl (PBS)이 포함된 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) 용액으로 세척한 후, 0.1% sodium dodesyl sulfate (SDS) and 10 mM β -mercaptoethanol이 포함된 PBS 용액에 넣고 용해시켰다. 세포를 수거하여 8% SDS-polyacrylamide gels에 넣은 후, protein band를 semi-dry blotter (MilliBlot-SDE system; Millipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 nitrocellulose membranes (Schleicher and Schull, Dassel, Germany) 위에 떨어뜨렸다. 그리고 membrane을 0.1% tween-20 (Tris-buffered saline [TBS]-T)이 포함된 10 mM TBS (pH 7.2)으로 1회 세척한 후, 3% 무지분유가 첨가된 TBS (pH 7.2)에 넣고 상온에서 1시간 동안 blocking 시켰다. Anti-Sirt1 antibody, anti-p-AMPK antibody, anti-AMPK antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 혹은 anti-beta actin antibody와 반응하였다. 2시간 동안 incubation한 후, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-Rabbit

immunoglobulin G (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (diluted 1 : 1,000)을 2차 항체로 하여 배양하였다. 그 후 chemiluminescence solution (Amersham Corp., Newark, NJ, USA)으로 처리하여 image reader (LAS-3000; Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)로 분석하였다. Resultant protein band의 강도는 densitometry로 측정하였고, 단백질의 정량은 beta-actin을 참고로 하여 분석하였다.

5. 통계처리

각각의 군별로 4번의 결과 측정을 하였으며, 실험결과는 평균값 \pm 표준오차(mean \pm standard error)로 표시하였고 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용한 one-way ANOVA로 각 실험군 간의 통계적 분석을 시행하였다. 실험의 통계적 유의성은 P값이 0.05 이하인 경우에 유의한 것으로 보았다.

결 과

1. Effect of the Metformin induced expression in RAW 264.7 cells of Sirt1 and p-AMPK by extracts

Metformin과 백출, 금은화, 어성초, 황금, 황련 추출물들의 병용이 Sirt1과 p-AMPK의 발현에 영향을 주는지 확인하기 위하여 백출, 금은화, 어성초, 황금, 황련 추출물(ethanol 30%)을 처리한 RAW 264.7 세포들과 Metformin+백출, 금은화, 어성초, 황금, 황련 추출물(ethanol 30%)을 처리한 RAW 264.7 세포들을 western blot 방법으로 관찰하였다.

Metformin과 백출, 금은화, 어성초, 황금, 황련 추출물(ethanol 30%)을 함께 처리한 RAW 264.7 세포들에서

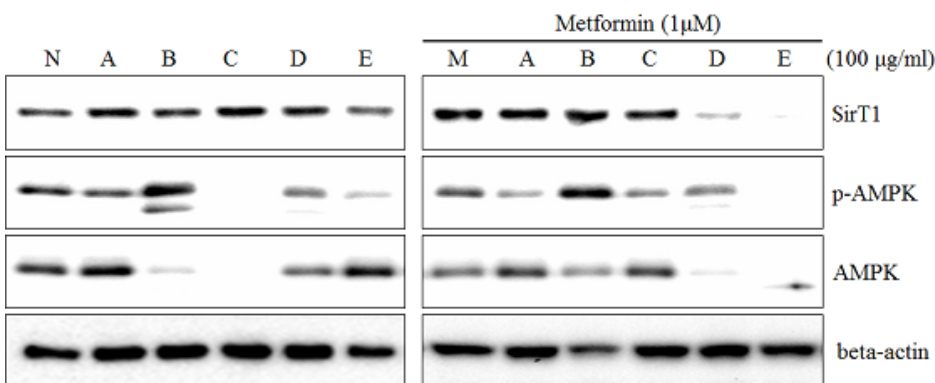


Fig. 1. Differential effects of extract on Metformin-induced Sirt1 and p-adenosine monophosphate-activated kinase (p-AMPK) expression in RAW 264.7 cells. lysates were analyzed using western blotting. N: normal, M: Metformin, A: Atractylodis Rhizoma Alba 30% EtOH extract, B: Lonicerae Flos 30% EtOH extract, C: Houttuyniae Herba 30% EtOH Extract, D: Agrobacterium Rhizogenes 30% EtOH Extract, E: Coptidis Rhizoma 30% EtOH Extract.

Metformin을 함께 처리하지 않은 RAW 264.7 세포들에 비해 Sirt1과 p-AMPK의 발현이 증가하였다. 특히 Metformin과 금은화 추출물(ethanol 30%)을 함께 처리한 RAW 264.7 세포에서 Sirt1과 p-AMPK의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

2. The level of gene expression of AMPK-alpha in relation to that of beta-actin

N군은 0.80, M군은 0.76으로 측정되었다(Fig. 2). M+USE군은 0.84, M+GUE군은 2.70, M+HGW군은 4.50으로 측정되었다. M+USE, M+GUE, M+HGW 3개군은 M군과 비교 시 통계적으로 유의하게 AMPK-alpha 유전자의 발현정도가 증가하였다(M+USE; $P < 0.05$) (M+GUE, M+HGW; $P < 0.001$). 특히 M+HGW군이 가장 많이 증가한 것을 확인할 수 있다.

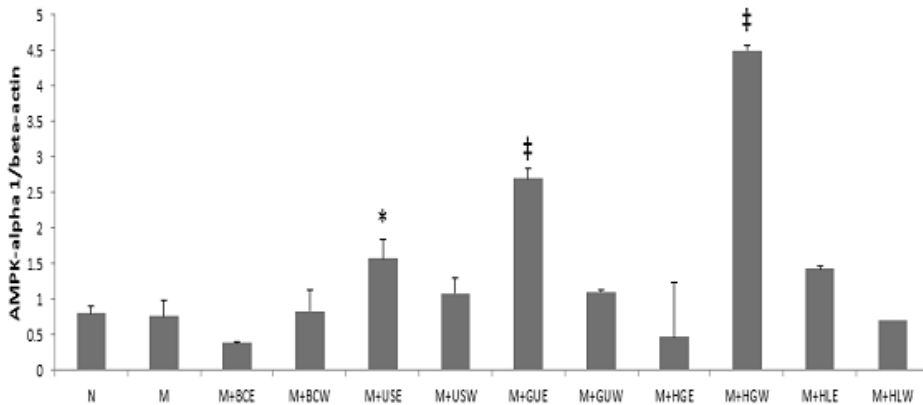


Fig. 2. The level of gene expression of adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK)-alpha in Relation to that of beta-actin in RAW 264.7 cells. N: normal, M, Metformin; E, ethanol 30%, W: water 100%, BC: Atractylodis Rhizoma Alba, US: Houttuyniae Herba, GU: Lonicerae Flos, HG: Agrobacterium Rhizogenes, HL: Coptidis Rhizoma. *Significantly different from M ($P < 0.05$). †Significantly different from M ($P < 0.001$).

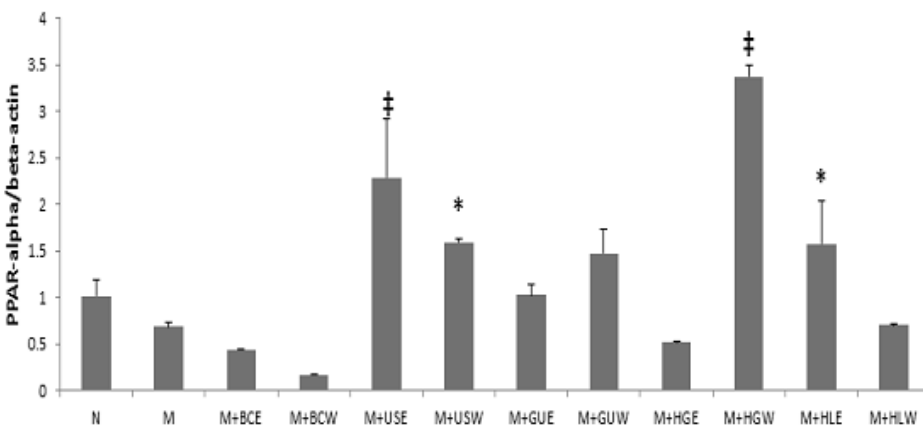


Fig. 3. The level of gene expression of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)-alpha in relation to that of beta-actin in RAW 264.7 cells. N: normal, M: Metformin, E: ethanol 30%, W: water 100%, BC: Atractylodis Rhizoma Alba, US: Houttuyniae Herba, GU: Lonicerae Flos, HG: Agrobacterium Rhizogenes, HL: Coptidis Rhizoma. *Significantly different from M ($P < 0.05$). †Significantly different from M ($P < 0.001$).

3. The level of gene expression of PPAR-alpha in relation to that of beta-actin

N군은 1.01, M군은 0.68로 측정되었다(Fig. 3). M+USE군은 2.29, M+USW군은 1.59, M+HGW군은 3.38, M+HLE군은 1.57로 측정되었다. M+USE, M+USW, M+HGW 3개군은 M군과 비교 시 통계적으로 유의하게 PPAR-alpha 유전자의 발현정도가 증가하였다(M+USW, M+HLE; $P < 0.05$) (M+USE, M+HGW; $P < 0.001$). 특히 M+HGW군이 가장 많이 증가하였다.

4. The level of gene expression of PPAR-gamma in relation to that of beta-actin

N군은 1.03, M군은 0.83으로 측정되었다(Fig. 4). M+USE군은 0.94, M+GUW군은 0.90, M+HLE군은 1.05로 측정되었다. M+USE, M+GUW, M+HLE 3개군은 M군과

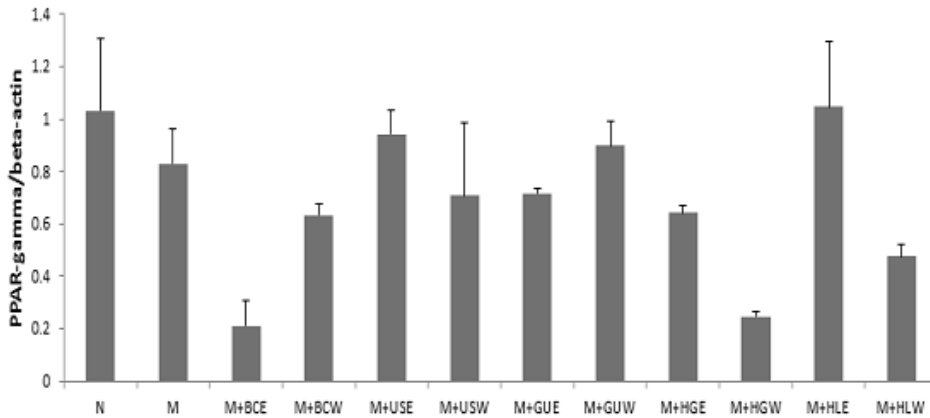


Fig. 4. The level of gene expression of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)-gamma in relation to that of beta-actin in RAW 264.7 cells. N: normal, M: Metformin, E: ethanol 30%, W: water 100%, BC: Atractylodis Rhizoma Alba, US: Houttuyniae Herba, GU: Lonicerae Flos, HG: Agrobacterium Rhizogenes, HL: Coptidis Rhizoma.

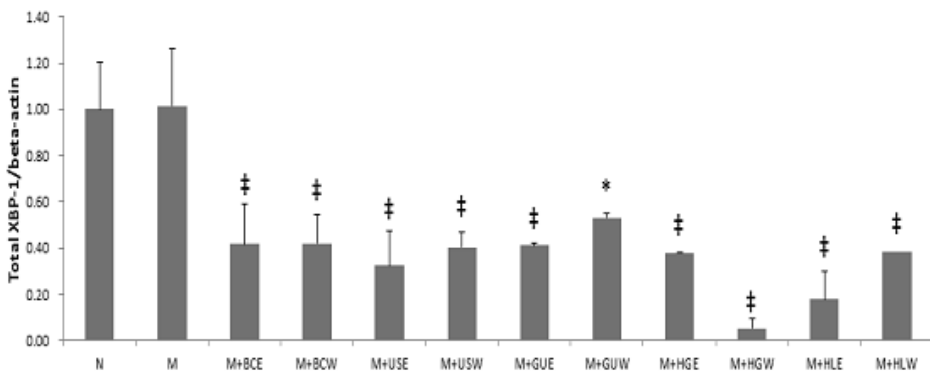


Fig. 5. The level of gene expression of X-box binding protein (XBP-1) in relation to that of beta-actin in RAW 264.7 cells. N: normal, M: Metformin, E: ethanol 30%, W: water 100%, BC: Atractylodis Rhizoma Alba, US: Houttuyniae Herba, GU: Lonicerae Flos, HG: Agrobacterium Rhizogenes, HL: Coptidis Rhizoma. *Significantly different from M ($P < 0.05$). †Significantly different from M ($P < 0.001$).

비교 시 통계적인 유의성은 없었으나, PPAR-gamma 유전자의 발현 정도가 증가하였다.

5. The level of gene expression of XBP-1 in relation to that of beta-actin

N군은 1.00, M군은 1.01로 측정되었다(Fig. 5). M+BCE군은 0.42, M+BCW군은 0.42, M+USE군은 0.32, M+USW군은 0.40, M+GUE군은 0.41, M+GUW군은 0.53, M+HGE군은 0.38, M+HGW군은 0.05, M+HLE군은 0.18, M+HLW군은 0.39로 측정되었다. Metformin과 함께 추출물을 처리한 모든 군에서 M군과 비교 시 통계적으로 유의하게 XBP-1 유전자의 발현정도가 감소하였다(M+GUW; $P < 0.05$) (M+BCE, M+BCW, M+USE, M+USW, M+GUE, M+HGE, M+HGW, M+HLE, M+HLW; $P < 0.001$). 특히 M+HGW군이 가장 많이 감소하였다.

6. The level of gene expression of TNF-alpha in relation to that of beta-actin

N군은 1.01, M군은 1.34로 측정되었다(Fig. 6). M+BCW군은 1.40, M+HGE군은 1.30으로 측정되어 M군과 비슷한 수치를 유지하였다. M+GUE군은 0.66, M+GUW군은 0.97, M+HGW군은 0.13으로 측정되어 통계적으로 유의성은 나타나지 않았지만, M군과 비교 시 감소하는 경향을 보였다. 하지만 M+USE군은 4.55, M+USW군은 6.39, M+HLW군은 7.73으로 측정되었다. M+USE, M+USW, M+HLW 3개군은 M군과 비교 시 통계적으로 유의하게 TNF-alpha 유전자의 발현정도가 증가하였다(M+USE; $P < 0.01$) (M+USW, M+HLW; $P < 0.001$). M+BCE군은 3.28, M+HLE군은 4.16으로 측정되어 통계적으로 유의성은 나타나지 않았지만, M군과 비교 시 증가하는 경향을 보였다.

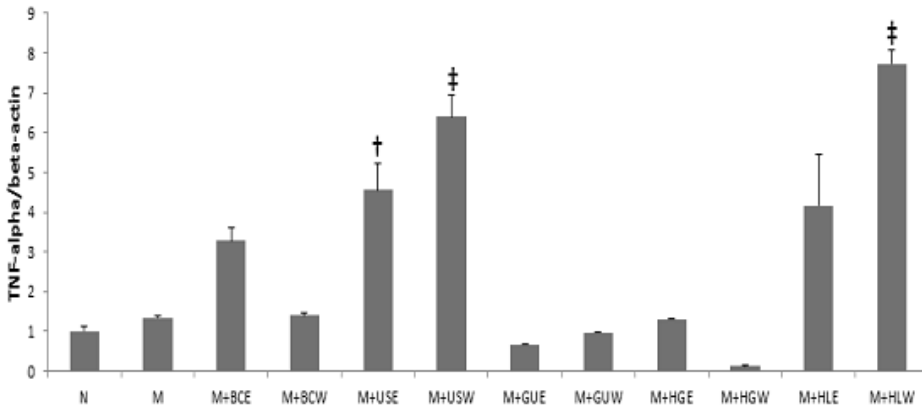


Fig. 6. The level of gene expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in relation to that of beta-actin in RAW 264.7 cells. N: normal, M: Metformin, E: ethanol 30%, W: water 100%, BC: Atractylodis Rhizoma Alba, US: Houttuyniae Herba, GU: Lonicerae Flos, HG: Agrobacterium Rhizogenes, HL: Coptidis Rhizoma. † Significantly different from M ($P < 0.01$), ‡ Significantly different from M ($P < 0.001$).

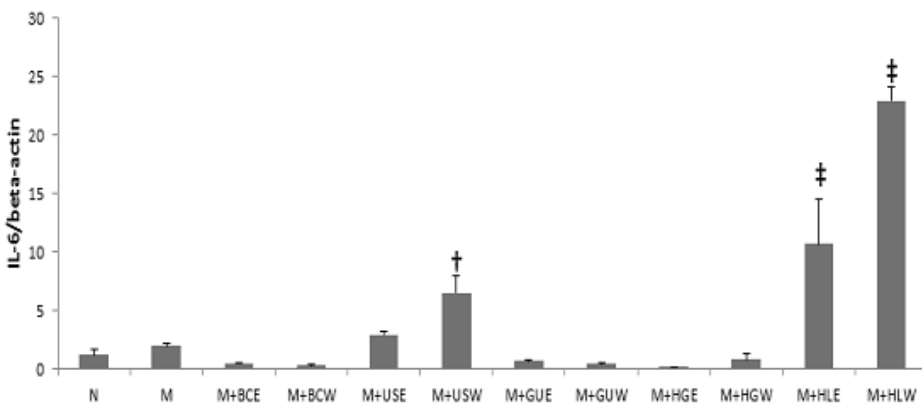


Fig. 7. The level of gene expression of interleukin (IL)-6 in relation to that of beta-actin in RAW 264.7 cells. N: normal, M: Metformin, E: ethanol 30%, W: water 100%, BC: Atractylodis Rhizoma Alba, US: Houttuyniae Herba, GU: Lonicerae Flos, HG: Agrobacterium Rhizogenes, HL: Coptidis Rhizoma. † Significantly different from M ($P < 0.01$), ‡ Significantly different from M ($P < 0.001$).

7. The level of gene expression of IL-6 in relation to that of beta-actin

N군은 1.11, M군은 1.91로 측정되었다(Fig. 7). M+BCE군은 0.41, M+BCW군은 0.22, M+GUE군은 0.59, M+GUW군은 0.35, M+HGE군은 0.12, M+HGW군은 0.74로 측정되었다. M군과 비교 시 통계적으로 유의성이 나타나진 않았으나 모두 IL-6 유전자의 발현정도가 감소하였다. 하지만 M+USE군은 2.90, M+USW군은 6.46, M+HLE군은 10.65, M+HLW군은 22.96으로 측정되었다. M+USW, M+HLE, M+HLW 3개군은 M군과 비교 시 통계적으로 유의하게 IL-6 유전자의 발현정도가 증가하였다(M+USW; $P < 0.01$) (M+HLE, M+HLW; $P < 0.001$). M+USE군은 M군과 비교 시 통계적으로 유의성이 나타나지 않았으나 IL-6 유전자의 발현정도가 증가하였다.

고찰

백출의 성분은 atractylol을 주성분으로 하는 정유성분과 atractylone, vitamin A 등을 함유한다¹⁰. 백출에 관한 약리적인 연구로는 보비위하는 작용으로 공복감지연효과에 대한 보고가 있고¹¹, 백출을 함유하는 처방인 五苓散, 茵陳五苓散 등에서 이노작용과 신부전보호작용을 보고한 바가 있다¹². 또한 백출의 추출물이 streptozotocin에 의한 췌장과 신장조직의 손상을 줄이고 이상 지질대사를 억제함으로써 당뇨병 개선효과가 있다는 보고가 있다¹³.

어성초에 관한 연구로는 인체의 T, B세포에 미치는 영향¹⁴, 항균활성 작용¹⁵ 및 면역기능에 미치는 영향¹⁶, 고지혈증¹⁷ 등에 관한 실험적 연구가 보고되었다. 또한 비만세포에 여성초 추출물을 처리하였을 때 염증성 매개물질에 대한 억제 효과를 기대할 수 있다는 보고가 있다¹⁸.

금은화의 성분 중 tannin이 급성장염 및 해독효과를 나타내는 유효성분으로 밝혀져 있고¹⁹⁾, 해열탕의 항염증 작용에 대한 연구에서 lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 NO의 생성, iNOS, COX-2 및 cytokine에 미치는 영향에서 항염 작용의 유의성을 보고한 바 있다²⁰⁾.

황금에는 활성성분으로 baicalein, biacalin, chrysin, oroxylin-A, wogonin 및 wogonoside 등과 같은 30여 종 이상의 flavonoid가 함유되어 있으며, 항염증, 항당뇨, 항균, 항알레르기, 항바이러스, 항고혈압 및 항산화 등과 같은 많은 약리학 및 생물학적 활성을 가지는 것으로 알려져 있다²¹⁻²⁴⁾.

황련의 임상작용을 살펴보면 장이나 위에 쌓여서 일어나는 설사나 위열로 인한 구토에 유효하며 해열과 해독 작용이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 강한 항균작용을 하는 것으로 알려진 성분은 berberine인데 이는 위장내의 세균과 진균 및 대장 내의 감염에 대하여 항균력이 강하여 위염과 위장 및 대장 내 발효를 개선하고 소화관에 정체된 내용물에 대장균이 작용하여 gas를 생성하는 것을 방지하는 것으로 알려져 있다. 또한 berberine 유도체를 이용하여 콜레스테롤 대사 조절기능이 행해져 온 것으로 알려져 있다²⁵⁾.

본 연구에서는 항지질 및 항염증 등의 효과가 있는 상기의 백출, 어성초, 금은화, 황금, 황련 추출물을 Metformin과 병용하였을 때, 혈당 조절 및 염증 조절에 어떠한 효과를 나타낼 것인지에 대한 여부를 *in vivo* 실험을 통해 알아보고자 하였다.

Metformin은 신체의 다양한 기관에 작용하여 항당뇨 효능을 나타내며, 생체 내의 에너지 항상성을 조절하는 주요한 효소인 AMPK를 주요 목표로 하여 나타난다²⁶⁾. AMPK는 serine/threonine kinase의 일원으로 세포 내 에너지 상태를 감지하는 '에너지 센서'로 알려져 있는 효소이다. AMPK는 세포 내 에너지가 부족한 상황(adenosine triphosphate [ATP]에 비해 AMP가 증가하는 상황)에서 활성화되어 정상 에너지 균형을 회복시키기 위해 ATP를 소비하는 과정(지방산, 콜레스테롤 등의 합성을 억제하고 반대로 ATP를 생산하는 과정), 즉 지방산 산화, 해당과정을 활성화시킨다²⁷⁾. AMPK는 지방세포로부터 분비되는 렙틴(leptin)과 아디포넥틴(adiponectin)의 세포 내 신호전달 물질로서도 잘 알려져 있다²⁸⁾. Acetyl-CoA carboxylase

(ACC)는 지방대사가 증가할 경우에 생성되는 효소 물질 가운데 하나이다. AMPK는 지방산 합성에서 ACC 등 핵심 효소를 억제함으로써 ATP의 추가적 사용을 억제한다²⁹⁾.

Metformin과 한약재 추출물들을 병용하였을 때의 혈당 조절 효과를 조사하기 위해 Western blot 방법을 사용하여 관찰하였다. Metformin과 한약재 추출물들을 함께 처리한 군에서, 처리하지 않은 군들에 비해 Sirt1과 p-AMPK의 발현이 증가하였다. 특히 M+GUE군에서 Sirt1과 p-AMPK의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

RT-PCR을 통해 AMPK- α 유전자의 발현 정도를 측정하였을 때, M+USE군, M+GUE군, M+HGW군은 통계적인 유의성을 나타내었다($P < 0.05$) ($P < 0.001$). 위의 3개군 중에서, M+HGW군이 가장 발현 정도가 높게 나타났다. 이는 Metformin과 어성초 추출물(ethanol 30%), 금은화 추출물(ethanol 30%), 황금 추출물(water 100%)의 병용이 인슐린 저항성을 감소시키고 고혈당을 개선하는데 Metformin을 단독 사용한 것보다 나은 효과를 나타낸다고 볼 수 있다.

PPAR- α 는 간조직에서 주로 발현되며 liver와 muscle에서 peroxisomal & mitochondrial β -oxidation과 fatty acid uptake 등을 통해 중성지방의 분해에 관여하는 당·지질 대사를 조절한다. 최근에는 식욕을 억제하여 포만감을 일으켜 체중 감소를 유도한다는 보고가 있어 비만 치료제로서 가능성이 제기되고 있다. PPAR- α 의 활성은 lipoprotein lipase를 통해 triglyceride의 level을 낮춘다^{30,31)}.

본 실험에서 PPAR- α 유전자의 발현 정도를 측정하였을 때, M+USE군, M+USW군, M+HGW군, M+HLE군은 통계적인 유의성을 나타내었다($P < 0.05$) ($P < 0.001$). 위의 4개군 중에서, M+HGW군이 가장 발현 정도가 높게 나타났다. 이는 Metformin과 어성초 추출물(ethanol 30%, water 100%), 황금 추출물(water 100%), 황련 추출물(ethanol 30%)의 병용이 PPAR- α 유전자 발현정도 증가에 어느 정도 의미가 있다고 생각된다.

PPAR- γ 는 지방세포의 전사조절분자 중의 하나이다. 이는 지방세포의 분화 및 지방합성과 저장에 관여하는 효소들의 발현을 조절하는 역할을 하는데 지방대사뿐만 아니라 대사증후군, 염증반응 그리고 동맥경화증에 있어서 여러 가지 유전자의 발현을 조절하는 역할을 한다고 알려져

있다³²⁾. 또한 말초 조직에서 인슐린 민감도를 향상시키는데 있어서 중요한 기능을 담당하는 것으로 예상되는데 PPAR- γ 작용제 주입 시에 단백뇨의 감소, 혈압 강하 효과 및 혈중 지질 대사에 영향을 준다는 점과 당뇨병 치료제 중 thiazolidinedione 계열에 속하는 pioglitazone이 PPAR- γ 작용제로서 인슐린 저항성을 개선시켜 혈당을 조절한다는 보고가 이를 뒷받침해주고 있다³³⁾. 본 실험에서 PPAR- γ 유전자의 발현정도를 측정하였을 때, M+USE군, M+GUW군, M+HLE군에서 증가하였으나 통계적인 유의성은 볼 수 없었다.

소포체 스트레스가 제2형 당뇨병의 발병에 중요한 역할을 한다는 보고들이 있으며 이는 췌장의 베타세포의 사멸뿐 아니라 인슐린 저항성에도 영향을 준다고 알려져 있다. 소포체 스트레스 발생 시 이를 없애는 데 관여하는 것이 XBP-1으로 보고되었다³⁴⁾.

본 실험에서 XBP-1 유전자의 발현정도를 측정하였을 때, Metformin과 약물 추출물을 병용한 모든 군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다($P < 0.05$) ($P < 0.001$). 특히 M+HGW군에서 XBP-1 유전자의 발현정도가 가장 많이 감소하였다. 이는 소포체 스트레스가 발생 시 제거를 위해 XBP-1이 작용을 함으로, XBP-1 유전자의 발현정도 감소는 소포체 스트레스의 감소를 의미한다고 볼 수 있다. Metformin과 약물 추출물들의 병용이 소포체 스트레스 감소 및 예방에 의의가 있는 것으로 해석할 수 있다.

사이토카인이란 다양한 자극에 의한 반응으로 면역세포나 다른 다양한 세포로부터 분비되는 낮은 분자량의 조절 단백질 또는 당단백이다. 그 중에는 M1 대식세포가 분비하는 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α)과 M2 대식세포와 관련된 항염증성 사이토카인(IL-4, IL-10)이 있는데, 염증성 사이토카인은 다른 면역세포들을 활성화시켜 염증 반응을 증가시키는 반면, 항염증성 사이토카인은 과도한 염증 반응을 억제하고 항상성을 유지하는 역할을 한다. M1 대식세포와 M2 대식세포는 각각 염증성 사이토카인과 항염증성 사이토카인의 길항작용을 통해 면역 균형을 유지한다³⁵⁾.

TNF- α 는 활성화된 M1 대식세포에 의해 생성되어 미생물의 감염으로부터 숙주를 보호하며, 염증 반응을 활성화시키는 역할을 한다. 그러나 TNF- α 가 장기적으로 분비될 경우 만성적인 감염에 대해 패혈증으로 인한 쇼크

반응을 나타내며, 류마티스 관절염 등의 만성 염증 질환 등을 발생시킨다³⁶⁾. TNF- α 는 염증에서뿐만 아니라, 대사 질환에도 영향을 미치는 중요한 사이토카인이다. TNF- α 는 비만 상태인 설치류의 지방 조직에서 그 발현이 매우 증가된 상태로 존재한다는 것이 보고되었으며³⁷⁾, 증가한 TNF- α 는 비만 상태에서의 염증 반응에 아주 중요한 매개체로 작용하며, 인슐린 민감성을 감소시킨다³⁸⁾. 또한 혈중 중성 지질 농도를 증가시키며 유리지방산 생성을 증가시키는 등 지질 대사에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, IL-6 생성을 유도하여 IL-6와 함께 스캐빈저 수용체(SR-A, Lox-1)의 발현을 증가시켰다는 보고도 있다³⁹⁾.

본 실험에서 TNF- α 유전자의 발현정도를 측정하였을 때, M+GUE군, M+GUW군, M+HGW군은 통계적인 유의성은 나타나지 않았지만 감소하는 경향을 보였다. 하지만 M+BCE군, M+USE군, M+USW군, M+HLW군, M+HLE군은 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 M+USE군, M+USW군, M+HLW군은 통계적으로 유의하게 TNF- α 유전자의 발현정도가 증가하였다($P < 0.01$) ($P < 0.001$). 이는 Metformin과 어성초 추출물, 황련 추출물의 병용 시 염증 작용에 유의해야 한다는 것을 시사한다.

본 실험에서 IL-6 유전자의 발현정도를 측정하였을 때, M+BCE군, M+BCW군, M+GUE군, M+GUW군, M+HGE군, M+HGW군은 통계적인 유의성은 나타나지 않았지만 감소하는 경향을 보였다. 하지만 M+USE군, M+USW군, M+HLE군, M+HLW군은 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 M+USW군, M+HLE군, M+HLW군은 통계적으로 유의하게 IL-6 유전자의 발현정도가 증가하였다($P < 0.01$) ($P < 0.001$). 이는 Metformin과 어성초 추출물, 황련 추출물의 병용 시 염증 작용에 유의해야 한다는 것으로 볼 수 있다.

이번 실험을 종합하면, Metformin과 금은화, 황금 추출물의 병용이 Sirt1, p-AMPK, AMPK- α , PPAR- α , PPAR- γ , XBP-1 유전자의 발현정도를 유의성 있게 각각 증가, 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 금은화는 ethanol 30%로, 황금은 water 100%로 추출하였을 경우 좋은 결과를 나타내었다. 하지만 Metformin과 어성초, 황련 추출물의 병용 시 TNF- α , IL-6 유전자의 발현정도가 유의성 있게 증가하였다. 따라서 이번 연구에서는 *in vivo* 모델을 통해 Metformin과 금은화, 황금 추출물의

병용이 Metformin 단독 사용 시보다 좀 더 혈당 조절 및 염증 억제 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 Metformin 과 어성초, 황금 추출물의 병용 시 염증 작용에 대한 주의가 필요할 것으로 사료된다. 약동학적인 추가적인 연구가 필요하겠지만, 만성적인 염증상태의 지속은 인슐린 저항성을 유도하여 좋지 않은 영향을 미칠 수 있다⁴⁰⁾. 추후 Metformin 과 한약 추출물들의 병용 사용 시의 약리학적 기전뿐만 아니라 인슐린, 염증 조절 작용에 관여하는 다양한 반응 경로에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 지속적인 연구 시에 Metformin과 병용사용하여 약효를 증가시키고 부작용을 감소시키는 치료 약물의 개발 가능성이 있을 것으로 생각된다.

결론

Metformin과 백출, 어성초, 금은화, 황금, 황련 추출물 (ethanol 30%, water 100%)을 함께 처리하여 Sirt1, p-AMPK, AMPK- α , PPAR- α , PPAR- γ , XBP-1, TNF- α , IL-6 유전자의 발현정도에 미치는 영향에 대해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Metformin과 금은화, 황금 추출물의 병용은 Western blot, RT-PCR 분석 시, Sirt1, p-AMPK, AMPK- α , PPAR- α 유전자의 발현정도가 유의성 있는 증가를 나타냈다.
2. Metformin과 금은화, 황금 추출물의 병용은 Western blot, RT-PCR 분석 시, XBP-1 유전자의 발현정도가 유의성 있는 감소를 나타냈다.
3. Metformin과 어성초, 황련 추출물의 병용은 RT-PCR 분석 시, TNF- α , IL-6 유전자의 발현정도가 유의성 있게 증가하여, 주의가 필요할 것으로 생각된다.
4. 금은화는 ethanol 30% 추출물이, 황금은 water 100% 추출물이 Metformin과 함께 사용하였을 때 효과가 좋은 것으로 관찰되었다.
5. Metformin과 금은화, 황금 추출물의 병용은 Metformin 단독 사용 시보다 혈당 조절 및 염증 조절 작용 효과가 유의하게 나타났으며, 추후 지속적인 연구를 하여 Metformin과 병용시 약효를 증가시키고 부작용을 감소시키는 치료 약물로 개발 가능성이 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원을 통해 보건복지부(양한방 융합기반 기술개발사업)의 재정지원을 받아 수행된 연구임(HI14C0558).

References

1. Korean Diabetes Association. Textbook of diabetes. Seoul : EPUBLIC. 2006 : 2-4.
2. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2007 ; 132 : 2169-80.
3. Fineman MS, Bicsak TA, Shen LZ, Taylor K, Gaines E, Varns A, et al. 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*. 2003 ; 26 : 2370-7.
4. Tosi F, Muggeo M, Brun E, Spiazzi G, Perobelli L, Zanolini E, et al. Combination treatment with metformin and glibenclamide versus single-drug therapies in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, comparative study. *Metabolism*. 2003 ; 52 : 862-7.
5. Oudjeriouat N, Moreau Y, Santimone M, Svensson B, Marchis Mouren G, Desseaux V. On the mechanism of alpha-amylase. *Eur J Biochem*. 2003 ; 270 : 3871-9.
6. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001 ; 108 : 1167-74.
7. Huang NL, Chiang SH, Hsueh CH, Liang YJ, Chen YJ, Lai LP. Metformin inhibits TNF- α -induced IkappaB kinase phosphorylation, IkappaB- α degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation. *Int J Cardiol*. 2009 ; 134 : 169-75.
8. Waisundara VY, Huang M, Hsu A, Huang D, Tan BK. Characterization of the anti-diabetic and antioxidant effects of rehmannia glutinosa in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Am J Chin Med*. 2008 ; 36(6) : 1083-104.
9. Waisundara VY, Hsu A, Huang D, Tan BK. Scutellaria baicalensis enhances the anti-diabetic activity of metformin in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Am J Chin Med*. 2008 ; 36(3) : 517-40.
10. Professors of herbology in colleges of oriental medicine. *Herbology*. Seoul : Younglimsa. 2004 : 581-3.
11. Han HK, Je HS, Kim GH. Effects of cirsium japonicum powder on plasma glucose and lipid level in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Food Sci Technol*. 2010 ; 42 : 343-9.
12. Son DW, Kim DG, Lee SJ. Effect of natural functional mixture

- on the descent of blood glucose level in streptozotocin-induced diabetic (typeI) rats(II). *Korean J Culin Res.* 2011 ; 17 : 238-47.
13. Han YK, Park YK. Effect of *Atractylodis Rhizoma Alba* water extract on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Korean J Herbol.* 2011 ; 26(4) : 23-30.
 14. Jun YE. Partial purification of *houத்துynia cordata* thunb extract and characterization of its immunological activities in human system. MS Thesis. Seoul: Seoul University. 1997 : 1-43.
 15. Kang JM. Identification of volatile essential oil, and flavor characterization and antibacterial effect of fractions from *Houttuynia cordata* Thunb -II. Flavor characterization and antibacterial effect of fraction from *Houttuynia cordata* Thunb by Prep-HPLC-. MS Thesis. Busan: Pukyong Natioal University. 1997 : 1-34.
 16. Gil YS. An experimental study on the effects of *Houttuynia cordata* Thunb and *sangukeum* on immune function. MS Thesis. Seoul: Kyung Hee University. 1990 : 1-56.
 17. Lee JW. Experimental study on the preventive effects of *Houttuyniae herba* on hyperlipidemia. MS Thesis. Seoul: Kyung Hee University. 1995 : 1-27.
 18. Lee HJ, Kim KJ. The effects of *Houttuyniae Herba* on the mast cell-mediated inflammatory responses. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2009 ; 22(2) : 60-73.
 19. World Health Organization. Lead Environmental health criteria 3. Geneva : WHO. 1997 : 160.
 20. Gok JK, Kim JJ, No YL, Lee SH, Jung SY, Jung HJ, Jung SK. Experimental Research on the Effect of *Haeyeol-tang*. *J Korean Orient Intern Med.* 2007 ; 28(4) : 671-80.
 21. Huang Y, Tsang SY, Yao X, Chen ZY. Biological properties of *baicalein* in cardiovascular system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2005 ; 5 : 177-84.
 22. Jung HS, Kim MH, Gwak NG, Im YS, Lee KY, Sohn Y, et al. M. Antiallergic effects of *Scutellaria baicalensis* on inflammation in vivo and in vitro. *J Ethnopharmacol.* 2012 ; 141 : 345-9.
 23. Lu Y, Joerger R, Wu C. Study of the chemical composition and antimicrobial activities of ethanolic extracts from roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *J Agric Food Chem.* 2011 ; 59 : 10934-42.
 24. Waisundara VY, Hsu A, Huang D, Tan BK. *Scutellaria baicalensis* enhances the anti-diabetic activity of metformin in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Am J Chin Med* 2008 ; 36 : 517-40.
 25. Lee JS, Park HG, Woo ER, Lee EJ, An DG, Yoon WS, et al. A study on the extraction efficiency of berberine in *coprodia rhizoma*. *J Analytical Sci Technol.* 1997 ; 10(2) : 83-90.
 26. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, et al. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002 ; 51(7) : 2074-81.
 27. Kola B, Grossman AB, Korbonits M. The role of AMP-activated protein kinase in obesity. *Front Horm Res.* 2008 ; 36 : 198.
 28. Janovska A, Hatzinikolas G, Staikopoulos V, McInerney J, Mano M, Wittert GA. AMPK and ACC phosphorylation: effect of leptin, muscle fibre type and obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 ; 1 : 284.
 29. Landree LE, Hanlon AL, Strong DW, Rumbaugh G, Miller IM, Thupari JN, et al. C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism. *J Biol Chem.* 2004 ; 3817 : 279.
 30. Guo W, Huang N, Cai J, Xie W, Hamilton JA. Fatty acid transport and metabolism in HepG2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 ; 290(3) : 528-34.
 31. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 1992 ; 68(5) : 879-87.
 32. Rossen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR gamma is required for the differentiatio of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 1999 ; 4 : 611-7.
 33. Rossen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR gamma is required for the differentiatio of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 1999 ; 4 : 611-7.
 34. Park SW, Zhou YJ, Lee J, Lu A, Sun C, Chung J, et al. The regulatory subunits of pi3k, p85 α and p85 β , interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nat Med Apir.* 2010 ; 16(4) : 429-37.
 35. Feldmann M, Saklatvala J. Proinflammatory cytokines. In: Oppenheim JJ, Feldman M, editors. *Cytokine reference.* New York : Academic Press. 2001 : 291-305.
 36. Vila-del Sol V, Fresno M. Involvement of TNF and NF-kB in the transcriptional control of cyclooxygenase-2 expression by IFN- γ in macrophages. *J Immunol.* 2005 ; 174 : 2825-33.
 37. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Ann Rev Physiol.* 2010 ; 72 : 219-46.
 38. Ji ZZ, Dai Z, XU YC. Anew tumor necrosis factor (TNF)- α regulator, lipopolysaccharides-induced TNF- α factor, is associated with obesity and insulin resistance. *Chin Med J.* 2011 ; 124(2) : 177-82.
 39. Hashizume M, Mihara M. Atherogenic effects of TNF- α and IL-6 via upregulation of scavenger receptors. *Cytokine.* 2012 ; 58 : 424-30.
 40. Jung IJ. The role of plasminogen activator inhibitor-1 in the regulation of adipocyte function. MS Thesis. Seoul: Ewha Womans University. 2013 : 1-90.