

## 쑥신나물 열수 추출물의 $\alpha$ -Glucosidase 저해 효과 및 근육세포에서 포도당 이용에 미치는 영향

김상미 · 이영민 · 김미주 · 남송이 · 김성희 · \*장환희  
농촌진흥청 국립농업과학원 기능성식품과

### Effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb. Water Extract on $\alpha$ -Glucosidase Inhibition and Glucose Uptake in C2C12 Skeletal Muscle Cells

Sang-Mi Kim, Young Min Lee, Mi-Ju Kim, Song-Yee Nam, Sung-Hee Kim and \*Hwan-Hee Jang  
Functional Food & Nutrition Division, Department of Agrofood Resources, RDA, Suwon 441-853, Korea

#### Abstract

*Agrimonia pilosa* Ledeb. is a medicinal plant with anti-tumor, anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-hyperglycemic activities. However, few studies of the anti-diabetic effect of *A. pilosa* on insulin resistance status have been performed. In the present study, the anti-diabetic effect of *A. pilosa* water extract (AP) was determined by investigating its  $\alpha$ -glucosidase inhibitory property, glucose utilization, and uptake, as well as insulin resistance mechanism of action in C2C12 skeletal muscle cells. Compared to positive control (acarbose), AP (10 mg/ml) showed a similar  $\alpha$ -glucosidase inhibitory capacity. Glucose uptake was significantly increased by 1  $\mu$ M insulin treatment ( $p < 0.05$ ). However, palmitic acid (FFA, 1 mM) induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction. On the other hand, AP (10  $\mu$ g/ml) was capable of reversing the FFA-induced insulin resistance in C2C12 myotubes. Compared to control, AP (100  $\mu$ g/ml without insulin) significantly increased the utilization of glucose ( $p < 0.05$ ) in C2C12 myotubes cultured in normal glucose (7 mM). AP treatment significantly increased the relative mRNA and protein expression levels of Akt. In particular, the effect of *A. pilosa* on the insulin signaling system is associated with the up-regulation of Akt genes and glucose uptake in C2C12 myotubes. These results suggest that *A. pilosa* is useful in the prevention of diabetes and the treatment of hyperglycemic disorders.

Key words: anti-diabetes, insulin resistance, skeletal muscle cells, 2-NBDG, Glut 4

#### 서 론

현대사회에서는 생활습관 및 사회 경제적 변화, 산업화 등의 환경적 요인에 의해 비만과 제2형 당뇨병이 증가하는 추세이다(Lee KW 2005). 전체 당뇨의 90%에 해당하는 제2형 당뇨병은 근육, 간, 지방조직에서 다양한 요인에 의해 인슐린 작용이 저하되어 상승된 혈당을 제거하지 못하고 혈중 glucose 농도가 오랫동안 높게 지속될 때 유발된다(Moody & Hassan 1982; Marle 등 1985; Jenkins 등 1988). 대한당뇨병학회에 따르면 한국 당뇨병환자 인구는 2010년 기준 320만 명으로 성인 10명 중

1명이 당뇨병환자(당뇨병 유병율 10.1%)이며, 2050년에는 약 600만 명에 달할 것으로 추산하였다(Korea Diabetes Association 2012). 이와 같이 당뇨병은 지속적으로 증가하는 추세이나, 대부분 당뇨병 치료는 약물 치료나 식이와 운동요법에 의존하고 있으며, 장기간 약물 복용에 따른 부작용이 대두되고 있다. 최근에는 부작용을 줄이고 항당뇨 효과를 가지는 천연물에 대한 관심이 증대되고, 많은 연구가 진행되고 있다(Salimifar 등 2013).

쑥신나물(*Agrimonia pilosa* Ledeb.)은 장미과에 속하는 다년생 속근초로서, 용아, 용아초, 황야초, 황용초, 지선초, 선학초 등으로 부르기도 한다. 예로부터 민간요법으로 폐암, 간

\* Corresponding author: Hwan-Hee Jang, Functional Food & Nutrition Division, Department of Agrofood Resources, RDA, Suwon 441-853, Korea. Tel: +82-31-299-0522, Fax: +82-31-299-0504, E-mail: rapture19@korea.kr

암, 식도암, 종양, 통증 제거, 지혈, 지사, 토혈, 혈뇨, 자궁 출혈 등의 약용으로 널리 이용되어 왔다(Kang BS 1992). 깊신나물 추출물은 항산화, 항염증, 항암 등의 효과를 가진 식물로 알려져 있다(Lee 등 2002; Tang 등 2002; Xu 등 2005; Jung CH 등 2006). 현재까지 다양한 깊신나물 추출물의 생리활성이 보고되었음에도 불구하고, 항당뇨 효능에 대한 연구 및 메커니즘 구명에 대한 연구는 미비하다.

식후 혈당은 탄수화물 흡수율에 의해 영향을 받을 수 있는데, 천연물 중에는  $\alpha$ -glucosidase와  $\alpha$ -amylase와 같은 탄수화물 분해효소의 활성을 억제하는 저해제가 있어 식후 고혈당을 낮추는 것으로 보고되고 있다(Park 등 2009; Kim 등 2013). 또한 혈중에 존재하는 glucose는 각 세포로 이동되어 에너지 대사에 쓰인다. 식후 혈중에 glucose 농도가 증가하면 인슐린 분비가 촉진되고, 인슐린은 근육, 지방, 여러 다른 조직으로 glucose 유입을 촉진시킨다. 그 중 골격근(근육)은 신체에서 glucose를 처리하는 주요한 장소이며, 인슐린에 반응하여 약 75% 이상의 glucose를 처리한다(Ferrannini E 1998). 인슐린에 의해 활성화된 glucose transporter 4(Glut 4)는 세포 내로 glucose 유입을 증가시켜 체내의 glucose 농도를 조절하는 중요한 역할을 한다(Watson & Pessin 2001). 이에 본 연구는 깊신나물의 기능성 식품으로 이용성을 높이기 위해  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성과 근육세포에서 glucose이용과 인슐린 신호전달에 미치는 영향을 마우스 근육세포인 C2C12 세포를 이용하여 알아보고자 하였다. 깊신나물 열수 추출물이 Glut 4 발현에 미치는 영향 및 활성조절에 관여하는 insulin receptor substrat(IRS), protein kinase B(Akt), phosphoinositide 3-kinase(Pik3r) 등의 유전자 및 단백질 발현증가 관계를 구명하여 당뇨 예방 소재로서의 이용 가능성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 추출

본 실험에서 사용한 깊신나물(*Agrimonia pilosa* Ledeb.)은 전남 곡성군 소재 선화초영농조합법인에서 구입하여 깊신나물 지상부를 수세 후 분쇄기로 균일하게 분쇄하였다. 시료 10g에 중량 대비 10배의 증류수를 가하고, 80°C 수욕상에서 3시간 씩 2회 반복으로 환류냉각 추출하였다. 추출물은 ADVANTEC paper(No.6)(ADVANTEC Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 감압 여과하는 과정을 2번 거친 후 감압농축기(EYELA N-1000, Riakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 농축한 후 동결 건조(PVTFD 10R, Ilsin Lab, Yangju, Korea)하여 -70°C에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

### 2. $\alpha$ -Glucosidase 활성 억제 효과 측정

$\alpha$ -Glucosidase 활성 억제 효과 측정은 Watanabe(1997)의 방법으로 측정하였다. 100 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 yeast  $\alpha$ -glucosidase(0.7 U, Sigma St, Louis, USA)와 p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside(5 mM)를 각각 용해시켜 효소와 기질 용액으로 준비하였다. 효소 용액 50  $\mu$ l, 깊신나물 열수 추출물 10  $\mu$ l 및 완충용액 890  $\mu$ l를 넣고 섞은 다음, 5분 동안 실온에서 배양하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(SpectraMax M5, Molecular Devices, CA, USA). 여기에 기질 용액 50  $\mu$ l를 가하고 다시 5분 동안 배양시킨 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. Positive control로는 acarbose를 사용하였다.  $\alpha$ -glucosidase 활성 저해율은 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{저해율(\%)} = [1 - (\text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{시료 무 첨가구의 흡광도})] \times 100$$

### 3. 세포 배양

마우스 근육세포(C2C12 myoblast)는 American Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. C2C12 myoblast 세포는 고농도 glucose(4.5 g/l) Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco, Grand Island, NY) 배지에 10% Fetal Bovin Serum(FBS; Invitrogen, Carlsbad, USA)와 100 units/ml penicillin streptomycin(HyClone, Logan, UT)을 첨가한 배지를 사용하여 배양하였다. 근육세포가 약 70% confluent 해졌을 때 분화배지로 교환하여 4일 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조정된 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 분화배지는 고농도 glucose(4.5 g/l) DMEM 배지에 2% heat-inactivated horse serum(Invitrogen, Carlsbad, USA)과 100 units/ml penicillin streptomycin을 첨가한 분화배지로 사용하였으며, 2일마다 새 배지로 교환하였다.

### 4. Glucose 이용능 측정

#### 1) Glucose Uptake

Glucose uptake 실험은 세포 내로 유입되는 glucose 탐색에 민감한 probe로서, fluorescent 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa 1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy(2-NBDG; Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 형광광도를 excitation 485 nm, emission 535 nm하에서 측정하였다(Zou 등 2005; Deng 등 2012). C2C12 myoblast 세포의 농도를  $5 \times 10^4$  cells/ml로 계수하여 96well black plate에 분주하였다. 4일간 분화된 세포는 지방산(1 mM palmitic acid)을 16시간 동안 처리하여 인슐린 저항성을 유도한 후 glucose uptake를 증가시키기 위해서 serum free DMEM으로 2시간 동안 배양하였다. 깊신나물 열수 추출물 농도별(0~10  $\mu$ g/ml)로 3시간 동안 처리한 다음, 1  $\mu$ M insulin을 10분 동안 처리하였

다. 마지막으로 50  $\mu$ M 2-NBDG를 첨가하여 15분 동안 uptake를 유도하였다. 차가운 PBS로 3회 세척한 후 형광 분석기를 통해 측정하여 glucose 흡수 정도를 나타내었다.

## 2) Glucose Utilization

C2C12 myoblast 세포의 농도를  $5 \times 10^4$  cells/ml로 계수하여 6 well plate에 분주하였다. 4일간 분화된 세포에 glucose와 serum free DMEM으로 2시간 동안 배양한 후, 농도별 짚신나물 열수 추출물(0~100  $\mu$ g/ml) 및 1  $\mu$ M insulin을 3시간 동안 처리하였다. 배지를 제거하고 7 mM glucose가 포함된 DMEM 배지를 overnight 처리한 후, 배지 중에 세포가 이용하고 남은 glucose 양을 혈당측정계(Ultra One touch, Korea)를 사용하여 측정하였다(Zhang 등 2013). Glucose utilization은 처리한 glucose 농도에서 배양 후 남은 배지 중의 glucose 농도의 차이 값으로 계산하였다.

## 5. RT-PCR

당 대사 관련 주요 분자들의 유전자 발현량을 평가하기 위하여 C2C12 myoblast 세포를 4일간 분화하여 glucose 유입을 조절하는 IRS, Akt, Pik3r와 Glut 4 유전자를 Real Time PCR로 평가하였다. 짚신나물 열수 추출물 농도별(0~100  $\mu$ g/ml) 또는 1  $\mu$ M insulin을 처리하여 3시간 동안 배양한 후 차가운 PBS로 2번 세척하여 1 ml Trizol(Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다(Tan & Yiap 2009). 추출한 2  $\mu$ g RNA는 High Capacity RNA-to-cDNA Kit(Applied Biosystems; Foster City, CA, USA)를 이용하여 메뉴얼에 따라 합성하였고, mRNA 발현은 TaqMan analysis를 사용하여 Step-One-Plus RT-PCR System(Applied Biosystems)에서 실행하였다. Primer는 IRS(Mm 01278327\_m1), Akt(Mm01331626\_m1), Pik3r(Mm00803160\_m1)와 Glut 4(Mm00436615\_m1)를 사용하였으며, 95°C에서 10분간 denaturing 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초의 간격으로 40회 반복하여 증폭하였다.

## 6. Western-blot

분화된 근육세포에 짚신나물 열수 추출물 농도별(0~10  $\mu$ g/ml) 또는 1  $\mu$ M insulin을 3시간 동안 처리하여 차가운 PBS로 2회 세척한 후, protease inhibitor와 phosphatase inhibitor를 포함한 RIPA lysis buffer(Sigma Aldrich, Louis, MO) 넣고 15분간 열음에 방치시킨 후, 4°C, 8000 $\times$ g에서 10분 동안 원심 분리하여 얻은 단백질 농도를 측정하였다. 단백질 30  $\mu$ g과  $\beta$ -mercaptoethanol을 포함한 sample buffer를 혼합한 후, 90°C에서 2분간 끓여서 단백질의 변성을 유도하였다. SDS-PAGE를 실행하여 단백질을 분리한 후 0.2  $\mu$ m Trans-Blot Turbo mini PVDF transfer pack(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)으로 단

백질을 전이하였다. 비특이적 단백질 결합 부분은 0.1% Tween 20과 5% BSA를 함유한 Tri-buffered saline(TBS)에 1시간 동안 반응시켜 blocking하였다. 제1차 항체 Akt와 Glut4(Abcam, Cambridge, UK)가 각각 첨가된 용액에서 상온에서 1시간 30분 동안 혼합한 후 TBST(0.1% Tween 20 함유한 TBS)로 5분간 3번 세척하였다. 그런 다음 membrane은 제2차 항체 Goat anti-rabbit IgG conjugates horseradish peroxidase(Abcam, Cambridge, UK)가 첨가된 용액을 상온에서 1시간 30분 동안 결합시켜 반응을 한 후 TBST로 5분 동안 3번 세척하였다. 내부 표준단백질은 GAPDH(Abcam, Cambridge, UK)를 사용하였고, 효소반응에 의한 발광을 Molecular Imager software system(Bio-Rad Laboratories, USA)을 사용하여 표적 단백질의 발현을 측정하였다(Lin-Moshier & Marchant 2013).

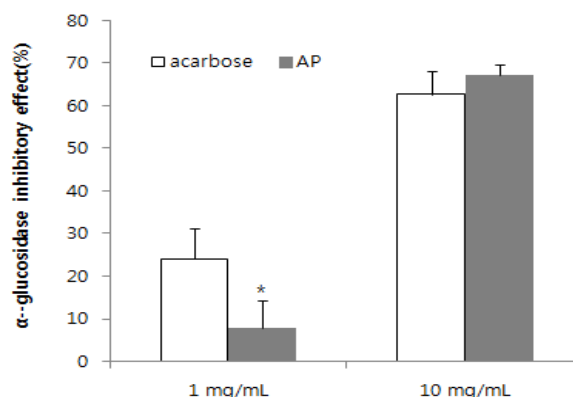
## 7. 통계처리

실험결과는 SAS 9.2 프로그램을 이용하여 실시하였다. 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, 각 sample간의 통계적 유의성은 student's *t*-test와 one-way ANOVA를 실시하였으며, 각 군 간의 차이는  $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. $\alpha$ -Glucosidase 저해 활성

$\alpha$ -Glucosidase는  $\alpha$ -amylase에 의해 분해된 당질을 최종적으로 단당류로 전환시킨다(Baron AD 1998; Shinde J 2008). 이러한 효소의 활성 저해는 당질 가수분해와 흡수과정을 지연 시킴으로 식후 혈당의 급격한 상승을 막아줄 것으로 생각된



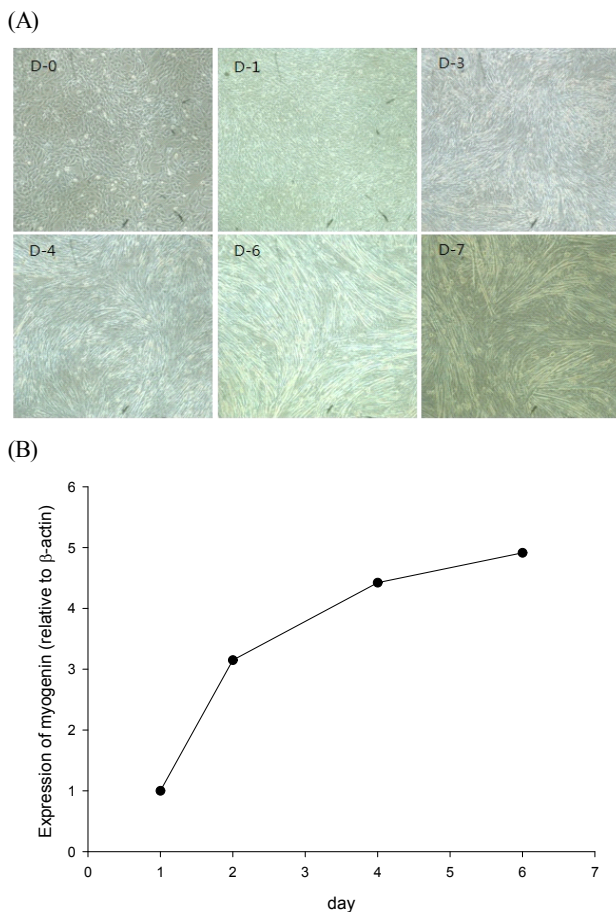
**Fig. 1.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activities of *Agrimonia pilosa* Ledeb. water extract.** Concentration of *Agrimonia pilosa* Ledeb. water extract (AP) and acarbose (positive control) are 1 and 10 mg/ml. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. Statistical significances of differences were determined by student's *t*-test (\* $P < 0.05$ ).

다. 짚신나물 열수 추출물로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 살펴 본 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

짚신나물 열수 추출물 1 mg/ml 농도에서는 양성대조물질인 acarbose의 저해 활성(24%)에 비해 유의적으로 낮은 효과를 나타냈지만(7%), 짚신나물 열수 추출물 10 mg/ml 농도에서는 대조구인 acarbose와 통계적으로 유의한 차이 없이 높은 저해 활성을 나타냈다(각각 63%, 67%). 본 연구에서는 당뇨치료제로 쓰이는 acarbose와 유사한  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성 효과를 보여 주어 당뇨 개선을 위한 천연소재로 이용 가능성이 기대된다.

## 2. 근육세포에서 Glucose Uptake, Utilization

C2C12 세포는 분화되지 않은 상태의 근원세포(myoblast)



**Fig. 2. Differentiation of mouse skeletal C2C12 myotubes.**

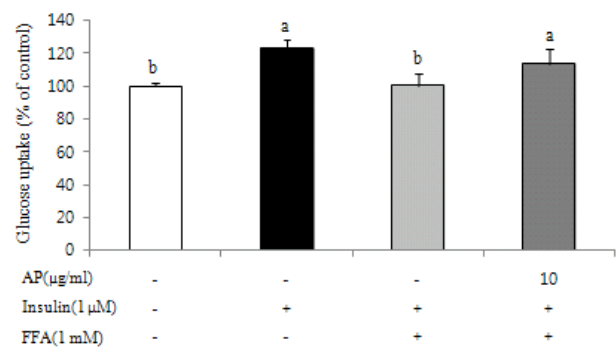
(A) C2C12 myotubes were incubated with 2% horse serum for 7 days to induce myotube differentiation, and representative photographs are shown. (B) C2C12 myoblasts were incubated with 2% horse serum to induce myotube differentiation for different day periods, and total RNA was used to assess the mRNA expression of myogenin and  $\beta$ -actin.

로 2%의 horse serum이 첨가된 배지에서 근관세포(myotube)로 분화를 유도하였다. C2C12 세포 분화에 영향을 미치는 유전자인 myogenin의 발현 정도를 분화 1일차부터 6일차까지 시간 별로 비교하여 분화 정도를 확인하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 근원세포가 근관세포로 길게 신장되었으며, myogenin의 유전자 발현이 시간에 따라 증가하였다.

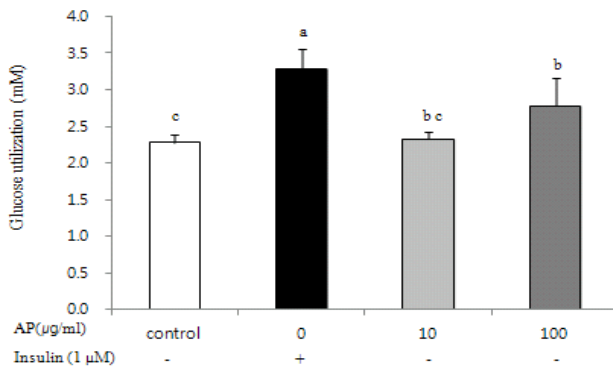
짚신나물 열수 추출물의 직접적인 세포내 glucose 유입에 미치는 영향을 분석하기 위하여 2-NBDG assay를 실시하였다. 2-NBDG는 fluorescent derivate of glucose로서 세포 내 glucose 유입을 측정하기 위해 유용하게 사용한다. 본 연구에서는 분화 4일차의 C2C12 세포에 지방산(1 mM palmitic acid)을 처리한 후, 분화 5일차에 짚신나물 열수 추출물이 glucose uptake에 미치는 영향을 평가하였다.

그 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 인슐린 처리에 의해 glucose uptake가 증가하지만, palmitic acid를 함께 처리하면 감소하게 된다. 여기에 짚신나물 열수 추출물(10  $\mu$ g/ml)을 처리하면 감소되었던 glucose uptake가 유의하게 증가하였다. Deang 등(2012)의 보고에 따르면 0.75  $\mu$ M palmitic acid를 처리하여 인슐린 저항성이 유도된 C2C12 세포는 Curcumin (10-20  $\mu$ M) 농도 의존적으로 2-NBDG의 세포내의 유입을 증가시키는 것으로 나타났다. Palmitic acid로 인슐린 저항성이 유도된 근육세포에서 짚신나물 열수 추출물이 glucose uptake를 회복하는데 영향을 미치는 것으로 사료된다.

또한, 분화된 근육세포에 인슐린 처리 없이 짚신나물 열수 추출물을 농도 별로 처리하였을 때 100  $\mu$ g/ml 농도에서 glucose 이용능이 대조구와 대비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 4).



**Fig. 3. Effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. water extract on glucose uptake of palmitic acid induced insulin resistance in C2C12 myotubes.** Differentiated C2C12 myotubes were incubated with 1 mM palmitic acid (FFA) for 18h and then treatment with *Agrimonia pilosa* Ledeb. (AP 10  $\mu$ g/ml) in the presence and absence of 10 min of 1  $\mu$ M insulin in stimulation. Data are presented as the mean $\pm$ S.D. Mean with different letters on the bar are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

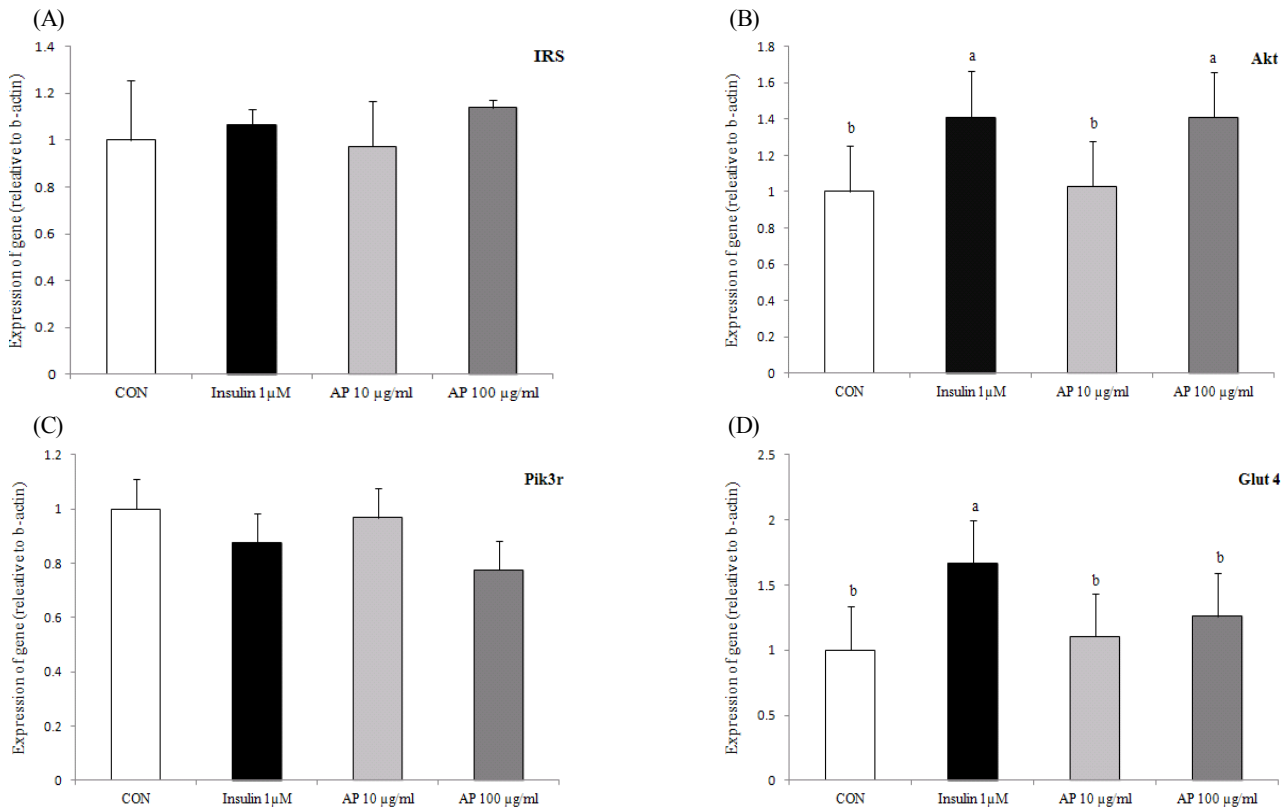


**Fig. 4. Effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. on glucose utilization in C2C12 myotubes.** Differentiated C2C12 myotubes were pretreated with 1 µM insulin or various concentrations of *Agrimonia pilosa* Ledeb. (AP 10 or 100 µg/ml) for 3 h and followed by normal glucose (7 mM glucose) exposure for the next 18 h. Data are presented as the mean±S.D. Mean with different letters on the bar are significantly different from each other at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

이는 짚신나물 열수 추출물이 인슐린과 유사한 효과가 나타나, glucose 이용을 증가시키는 것으로 예측할 수 있다.

### 3. 인슐린 신호 전달 관련 mRNA와 Protein 발현

Glucose uptake를 증가시키는 세포 내에 신호전달 경로에는 크게 두 가지가 보고되었다(Cartee 등 2007). 첫 번째로는 인슐린 수용체(IR)로 시작되어 PI3Kinase/Akt를 거쳐 glucose transporter의 이동에 의해 glucose를 유입하는 경로가 있고(White MF 2003), 두 번째로는 독립적으로 AMPK가 AS160을 통하여 glucose transporter의 이동을 직접 관여하여 glucose를 유입하는 경로가 있다(Lanner 등 2008). 본 연구에서는 짚신나물 열수 추출물이 인슐린 수용체와 관련된 신호전달에 미치는 영향을 분석하였다. 4일 동안 분화시킨 근육세포에 짚신나물 열수 추출물을 처리한 후, 인슐린 신호전달과 관련된 유전자 발현을 PCR assay를 통해 분석한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 인슐린(1 µM) 처리 시 Akt와 Glut4의 발현이 유의하게 증가하였고, IRS와 Pik3r은 유의한 차이가 나타나지 않았



**Fig. 5. Effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. on the gene expressions of IRS, Akt, Pik3r and Glut 4 in C2C12 myotubes.** Differentiated C2C12 myotubes were treated with 1 µM insulin or various concentrations of *Agrimonia pilosa* Ledeb. (AP 10 or 100 µg/ml) for 3 h and then mRNA of IRS (A), Akt (B), Pik3r (C) and Glut 4 (D) expressions were detected using Real time PCR (RT-PCR). Data are presented as the mean±S.D. Mean with different letters on the bar are significantly different from each other at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.



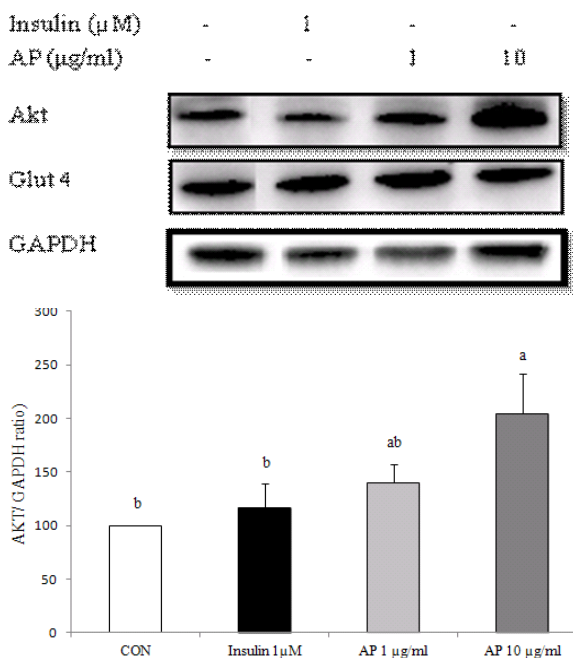
다. 짚신나물 열수 추출물(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )은 인슐린 신호전달 관련 유전자 중 Akt 유전자 발현만 유의하게 증가시켰다. Akt는 인슐린 조절을 통해 근육, 지방, 간에서의 대사작용에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Tan 등 2012). Akt의 작용은 Glut4 이동과 합성 외에도 복잡한 경로에 관여하며, Akt를 활성화 시키는 경로 또한 다양한 신호전달체계와 연결되어 있다(Tan 등 2012).

짚신나물 열수 추출물이 Akt 단백질 발현에 미치는 영향을 분석한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 짚신나물 열수 추출물(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 처리 시 Akt와 단백질 발현이 증가였지만, glucose 운반 단백질인 Glut 4의 발현은 유의적인 증가를 보이지 않았다. 또한 인슐린 처리에 의한 Akt와 Glut4 단백질 발현에는 변화가 없었다. 본 실험에서 짚신나물 열수 추출물과 동일한 조건으로 positive control인 인슐린을 3시간 동안 처리하였다. 하지만 Hinchee-Rodriguez 등(2013)에 의하면 C2C12 세포에서 다양한 시간대별로 인슐린을 처리했을 때 Akt의 인산화가 30분, 60분에서 증가되었다. Liu 등(2013)의 연구에서는 C2C12 세포에 인슐린을 2시간 동안 처리했을 때 Akt와 Glut4 단백질 발현에는 변화가 없었으며, Akt 인산화에만 영향을 미쳤다. Ma 등(2013)은 인슐린을 4시간 이상 처리하면 Glut4가 50%가 감

소되는 것으로 보고하였다. 인슐린과 짚신나물이 인슐린 신호전달에 미치는 영향은 처리 시간에 따라서 다른 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 인슐린이 인슐린 수용체(IR)에 결합하면 IRS의 인산화(phosphorylation)가 일어나 Pik3r를 활성화 하고 Akt를 인산화 시킨다(Saito 등 2007). 인산화된 Akt는 Glut4를 세포막으로 이동시켜 glucose를 세포 내로 uptake 시킨다(Elmendorf JS 2002). 따라서 짚신나물 열수 추출물이 근육세포에서 포도당 이용에 미치는 효과는 인슐린 신호전달에 관련된 단백질의 인산화와 Glut4의 이동에 미치는 영향이 더 고려되어야 한다. Glucose uptake를 조절하는 데에는 여러 단계에 관여하고 있으며, 각 단계의 신호전달을 이해하기 위해서는 AMPK 활성화 등 많은 신호전달 물질들에 대한 연구가 더 필요하다.

## 요 약

본 연구는 짚신나물 열수 추출물의  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 측정하고, 분화된 근육세포에서 glucose 이용과 인슐린 신호전달에 미치는 영향을 분석하였다. 짚신나물 열수 추출물(10  $\text{mg}/\text{mL}$ )은  $\alpha$ -glucosidase 활성을 67% 저해하였으며, 같은 농도의 양성대조구인 acarbose(63%)와 유사한 저해 효과를 보였다. 짚신나물 열수 추출물이  $\alpha$ -glucosidase에 의한 당당류 생성을 저해함으로써 식사 후 혈당이 급격히 상승하는 것을 억제하는데 효과적인 소재로 이용 가능성을 확인하였다. 또한 근육세포에서 인슐린 저항성을 유발하기 위해 지방산(1 mM, palmitic acid)를 처리하였고, glucose의 세포내 유입이 감소되는 것을 확인하였다. 지방산 처리 세포 모델에서 짚신나물 열수 추출물(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )은 glucose 이용을 유의적으로 회복시켜 주었다. Normal 상태의 배양조건에서 근육세포의 포도당 이용능은 짚신나물 열수 추출물(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 처리에 의해 유의적으로 증가하였다. 근육세포 내로 glucose 유입은 운반 단백질인 Glut4를 통해 이루어지며, 이것은 인슐린이 신호전달을 통해 조절한다. 짚신나물 열수 추출물의 세포내 glucose 이용 증가 효과는 인슐린 신호전달 관련 분자인 Akt 유전자와 단백질 발현을 증가시킨 것과 관련되는 것으로 추정된다. 결론적으로, 짚신나물 열수 추출물은 소화기관에서의 탄수화물 흡수 저해와 근육세포내 glucose 이용 증가를 통해 혈당 조절 및 당 대사 개선에 긍정적인 영향을 미치고 있음을 확인하였다.



**Fig. 6. Effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. the activation of Akt and Glut4 in the insulin signaling pathway.** Differentiated C2C12 myotubes were treated with 1  $\mu\text{M}$  insulin or various concentrations of *Agrimonia pilosa* Ledeb. (AP 1 or 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 3 h. The lysates were analyzed by western blotting for Akt and Glut4. Anti-GAPDH was used as a protein loading control.

## References

- Baron AD. 1998. Postprandial hyperglycemia and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Diabetes Res Clin Pract* 40:51-55

- Cartee GD, Wojtaszewski JF. 2007. Role of Akt substrate of 160 kDa in insulin-stimulated and contraction-stimulated glucose transport. *Appl Physiol Nutr Metab* 32:557-566
- Deng YT, Chang TW, Lee MS. 2012. Suppression of free fatty acid-Induced insulin resistance by phytopolyphenols in C2C12 mouse skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem* 60:1059-1066
- Elmendorf JS. 2002. Signals that regulate GLUT4 translocation. *J Membr Biol* 190:167-174
- Ferrannini E. 1998. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: Problems and prospects. *Endocr Rev* 19:447-490
- Hinchee-Rodriguez K, Garg N, Venkatakrishnan P, Roman MG, Adamo ML, Masters BS, Roman LJ. 2013. Neuronal nitric oxide synthase is phosphorylated in response to insulin stimulation in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 435:501-505
- Jenkins DJ, Wolever TM, Jenkins AL. 1988. Starchy foods and glycemic index diabetes care. *Clin Diabetes* 11:149-159
- Jung CH, Zhou S, Ding GX, Kim JH, Hong MH, Shin YC, Kim GJ, Ko SG. 2006. Antihyperglycemic activity of herb extracts on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:2556-2559
- Kang BS. 1992. Medical Herbs. pp. 384-386. Young Rym Sa. Inc
- Kim HS, Kim TW, Kim DJ, Lee JS, Kim KK, Choe M. 2013. Antioxidant activities and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of water extracts from medicinal plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* 21:197-203
- Korea Diabetes Association. 2012. Diabetes Fact Sheet in Korea 2012. p. 2
- Lanner JT, Bruton JD, Katz A, Westerblad H. 2008.  $Ca^{2+}$  and insulin-mediated glucose uptake. *Curr Opin Pharmacol* 8: 339-345
- Lee JC, Lim KT, Jang YS. 2002. Identification of *Rhus verniciflua* stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties. *Bio-Chim Biophys Acta* 1570:181-191
- Lee KW. 2005. The importance of lifestyle in the prevention and treatment of diabetes. *J Korean Med Assoc* 48:703-706
- Lin-Moshier Y, Marchant JS. 2013. A rapid western blotting protocol for the *Xenopus* oocyte. *Cold Spring Harbor Protocols* 72793:262-265
- Liu Y, Lai YC, Hill EV, Tyteca D, Carpentier S, Ingvaldsen A, Vertommen D, Lantier L, Foretz M, Dequied F, Courtoy, PJ, Erneux, C, Viollet B, Shepherd PR, Tavares JM, Jensen J, Rider MH. 2013. Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) is an AMPK target participating in contraction-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Biochem J* 455:195-206
- Ma J, Nakagawa Y, Kojima I, Shibata H. 2013. Prolonged insulin stimulation downregulates GLUT4 through oxidative stress-mediated retromer inhibition by a protein kinase CK2-dependent mechanism in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* in press
- Marle A, Krall LP, Bradley RF, Christlieb AR, Soell JS. 1985. Joslin's Diabetes Mellitus 12th ed. pp 251-277. Lea & Febiger, Philadelphia
- Moody CS, Hassan HM. 1982. Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc Natl Acad Sci* 79:2855-2859
- Park TS, Lee SY, Kim HJ, Kim KT, Kim YJ, Jeong I, Do WN, Lee HJ. 2009. Extracts of adlay, barley and rice bran have antioxidant activity and modulate fatty acid metabolism in adipocytes. *Korean J Food & Nutr* 22:456-462
- Saito T, Jones CC, Huang S, Czech MP, Pilch PF. 2007. The interaction of Akt with APPL1 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation. *J Biol Chem* 282:32280-32287
- Salimifar M, Fatehi-Hassanabad, Z, Fatehi M. 2013. A review on natural products for controlling type 2 diabetes with an emphasis on their mechanisms of actions. *Current Diabetes Reviews* 9:402-411
- Shinde J, Taldone T, Barletta M, Kunaparaju N, Hu B, Kumar S, Placido J, William ZS. 2008.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn). Skeels seed kernel *in vitro* and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydrate Res* 343:1278-1281
- Tan SC, Yiap BC. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J Biomed Biotechnol* 2009:574398
- Tan SX, Ng Y, Meoli CC, Kumar A, Khoo PS, Fazakerley DJ, Junutula JR, Vali S, James DE, Stockli J. 2012. Amplification and demultiplexing in insulin-regulated Akt protein kinase pathway in adipocytes. *J Biol Chem* 287:6128-6138
- Tang YP, Li YF, Hu J, Lou FC. 2002. Isolation and identification of antioxidants from *Sophora japonica*. *J Asian Nat Prod Res* 4:123-128
- Watanabe J, Kurihara H, Niki R. 1997. Isolation and identification of a  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci Biotechnol Biochem* 61:177-178
- Watson RT, Pessin JE. 2001. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res* 56:175-194

- White MF. 2003. Insulin signaling in health and disease. *Science* 302:1710-1711
- Xu X, Qi X, Wang W, Chen G. 2005. Separation and determination of flavonoids in *Agimonia pilosa* Ledeb. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Sep Sci* 28: 647-652
- Zhang L, Yang G, Untereiner A, Ju Y, Wu L, Wang R. 2013. Hydrogen sulfide impairs glucose utilization and increases gluconeogenesis in hepatocytes. *Endocrinology* 154:114-126
- Zou C, Wang Y, Shen Zhufang. 2005. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Methods* 64:207-215
- 
- 접 수 : 2013년 10월 14일  
최종수정 : 2013년 11월 25일  
채 택 : 2013년 11월 29일