

석위가 예쁜꼬마선충에서 Glucose로 유도된 독성에 미치는 영향

김봉석¹ · 이병주¹ · 이현주¹ · 안순영¹ · 박지원¹ · 윤선화¹ · 오미진² ·
권진³ · 이세연¹ · 차동석¹ · 오찬호⁴ · 전훈^{1*}

¹우석대학교 약학대학, ²한국식품연구원, ³한국복지대학 의료보장구과, ⁴우석대학교 식품생명공학과

Protective Effects of *Pyrrosiae Folium* on the 2% Glucose-Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*

Bong Seok Kim¹, Byung Ju Lee¹, Hyun Joo Lee¹, Soon Young An¹, Zi Won Park¹, Seon Hwa Yoon¹,
Mi Jin Oh², Jin Kwon³, Se Youn Lee¹, Dong Seok Cha¹, Chan Ho Oh⁴ and Hoon Jeon^{1*}

¹College of Pharmacy, Woosuk University, Samrye, Korea

²Korea Food Research Institute, Seongnam, Korea

³Department of Prosthetics and Orthotics, Korea National College of Welfare, Pyongtaek, Korea

⁴Department of Food & Biotechnology, Woosuk University, Samrye, Korea

Abstract – *Pyrrosia lingua* which belongs to Polypodiaceae has been used as a traditional medicine for the treatment of urinary system inflammation, urination disorder, and bronchitis. However, there are not enough phytochemical and pharmacological studies of *P. lingua* up to now. Here in this study, the protective effect of MeOH extract of whole plant of *Pyrrosia lingua* (MPL) against 2% glucose-induced toxicity was investigated using *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) model system. We found that MPL significantly extended the lifespan of wild-type nematode under normal culture condition. MPL also effectively recovered the decreased lifespan caused by 2% glucose-toxicity. In addition, MPL efficiently attenuated the increased glucose concentration inside of nematode. Further studies evaluating diabetes-related factors revealed that MPL reduced both intra-cellular ROS and lipid accumulation which were up-regulated under 2% glucose supplement condition. Our data also showed that MPL improved the 2% glucose-induced shortened body movement of nematode. Lastly, we carried out genetic studies using several single gene knockout mutants to establish the possible target of MPL. Our results demonstrated that genes such as *daf-2* and *daf-16* were responsible for the protective activity of MPL against 2% glucose-induced toxicity. These results indicate that MPL exerts protective action against 2% glucose via regulation of insulin/IGF-1 signaling pathway and FOXO activation.

Keywords – *Pyrrosia lingua*, Anti-diabetes, Glucose Toxicity, Lifespan

당뇨는 체내 glucose 농도를 조절하는 인슐린의 분비 및 감수성 장애로 인해 glucose 대사가 원활하게 일어나지 않아 고혈당 상태가 지속되는 대사증후군이다. 당뇨는 심장질환, 고혈압, 만성신부전, 족부궤양 및 망막병증 등과 같은 심각한 합병증을 유발하는데 이는 인간의 삶의 질을 심각하게 떨어뜨릴 수 있는 주요 원인으로 작용할 수 있다.¹⁾ 당뇨는 일반적으로 제 1형 당뇨(insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)와 제 2형 당뇨(non insulin-dependent

diabetes mellitus, NIDDM)로 구분된다.²⁾ IDDM은 췌장의 β -cell의 파괴로 인해 인슐린의 분비에 문제가 발생한 것인 반면에 NIDDM은 말초 조직에서 인슐린의 감수성이 감소하여 발생하는 것이 특징이다.³⁾ 대한당뇨병학회(Korean Diabetes Association, KDA)의 2016년 조사 자료에 의하면 국내 30세 이상의 인구 중 480만 명이 당뇨병을 앓고 있는 실정이다. 더욱 심각한 것은 국내 인구의 1/4이 예비 당뇨병 환자라는 사실이다. 이에 국내에서도 당뇨병 치료를 위한 많은 연구가 진행되고 있는 실정이다.

당뇨병 치료에는 약물요법, 식이요법 및 운동요법이 병행되고 있으며, 약물요법에서는 인슐린제제와 혈당강하제가 대

*교신저자(E-mail): jeonh@woosuk.ac.kr
(Tel): +82-63-290-1577

표적으로 이용되고 있다. 현재 혈당강하제로 주로 사용되는 sulfonyleureas, biguanides, α -glucosidase inhibitors, glitazones, meglitinides 및 DDP-4 inhibitors는 장기간 사용할 경우 저혈당쇼크와 간독성을 일으키는 부작용이 보고되고 있다. 특히, 경구용 혈당강하제로 많이 사용되는 acarbose, miglitol, voglibose 등의 α -glucosidase inhibitor는 복부팽만, 구토 및 설사와 같은 심각한 부작용이 보고된 바 있다. 이에 상대적으로 부작용이 적은 혈당강하제의 개발이 요구되는 실정이며, 최근 연구에서 많은 천연물들이 뛰어난 혈당강하 활성이 있는 것으로 보고되고 있다.⁴⁾

석위(*Pyrossia lingua*)는 고란초과(Polypodiaceae)에 속하는 식물로 석피, 석란, 석검 등의 이명을 가진 약재이다. 석위는 남부지방 및 제주도 등의 따뜻한 지역에 분포하는 식물로서 이뇨작용과 폐의 열을 끄는 작용이 있어 전통적으로 임질, 요로결석, 혈뇨, 월경과다, 자궁출혈 등의 부인과 및 비뇨기계 질환에 다양하게 사용되어 왔다. 석위의 성분에 대한 연구에서 석위가 flavonoids와 dammarane triterpenoids 화합물 등 다양한 성분을 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다.^{5,6)} 그러나 현재까지 석위의 약리작용에 대한 연구는 미흡한 실정으로 항산화 및 진통 효능 등이 알려져 있다.^{7,8)}

한방에서 당뇨는 소갈이라 하였으며 신체의 열이 몸 밖으로 발산되지 못해 진액과 혈액이 소모되는 것을 원인으로 보았다. 이에 체내 열을 내리고 소모된 진액과 혈액을 보충하는 것이 치료의 방법으로 여겨져 왔다.⁹⁾ 이러한 측면에서 석위는 한방에서 폐의 열을 내리고 비뇨기계 질환 등에 사용되어 왔기에 당뇨병 치료에 가능성이 있음에도 불구하고 항당뇨 효능을 밝히기 위한 과학적 연구는 전무한 실정이다. 이에 본 연구에서는 2% glucose로 고혈당모델이 유도된 *Caenorhabditis elegans* model system을 이용하여 석위의 항당뇨 효능 및 그 기전을 검증하였다. 먼저 석위를 처리한 선충의 glucose toxicity 완화 효과 및 수명을 측정하였으며 실제 선충 내부의 glucose 농도에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 당뇨와 관련된 인자인 산화적 스트레스, 지질 함량, 운동능력 감퇴 등에 석위가 미치는 영향을 조사하였다. 더불어, 특정 유전자의 발현을 억제한 돌연변이 선충을 이용하여 석위의 항당뇨 효능의 기전을 알아보았다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출 - 실험에 사용된 석위의 전초는 2014년 3월 강원 원주 소재의 강원약초에서 구입하여 우석대학교 약학대학 김대근 교수의 감정을 거친 후 실험을 진행하였다. 건조과정을 거친 확증표본(WH087)은 우석대학교 약학대학 한약학과에 보관되었다. 건조된 샘플 600 g은 6,000 mL의 100% methyl alcohol(MeOH)을 사용해 50°C를 유지한 상태에서 초음파추출기를 이용하여 추출되었으며, 이 과

정을 3회 반복하였다. 추출물은 회전식 농축기를 이용하여 22.5 g(수율: 3.75%)으로 농축되었고, 그 뒤 동결 건조하여 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

예쁜꼬마선충 배양 - 본 연구에 사용된 *C. elegans*는 N2(wild-type), TJ356(*zls356*), DR1572(*el368*) 및 GR1307(*mgDf50*) 등으로 모두 *Caenorhabditis* Genetic Center(CGC: University of Minnesota, Minneapolis, MN)로부터 제공받았다. *C. elegans*는 *Escherichia coli* OP50를 도말한 Nematode Growth Medium(NGM)에 20°C에서 배양되었다.¹⁰⁾ 석위는 DMSO를 용매로 한 stock solution 상태로 멸균된 NGM plates(at 50°C)에 첨가되었다. 최종 DMSO의 농도는 모든 상태에서 0.1%(v/v)를 유지하였다.

수명 및 glucose toxicity 측정 - *C. elegans*의 수명 측정은 20°C에서 이루어졌다. 선충의 성장 단계를 일정하게 하기 위해 NGM plate로부터 egg만을 분리하여 각 농도별 plate(석위 0, 62.5, 125, 250 μ g/mL)에 옮겨 배양하였다. 또한 2% glucose 독성평가를 위해 멸균된 NGM plates(at 50°C)에 D-(+)-glucose와 다양한 농도의 석위(0, 62.5, 125, 250 μ g/mL)가 첨가 되었으며, 성장 단계가 동일한 egg를 분리하여 각각의 plate에 옮겨 배양하였다. 선충의 생존율은 매일 동일한 시간에 측정되었으며, platinum wire의 끝으로 자극했을 때 반응이 없는 경우를 사망 상태로 간주하였다.¹¹⁾ 또한 선충은 2-3일마다 새로운 NGM plate로 옮겨 배양되었다.

선충 내부의 glucose 농도 측정 - 선충 내부의 glucose 농도를 측정하기 위해 성장 단계가 동일한 선충은 2% glucose와 다양한 농도의 석위가 함유된 plate에서 배양되었다. 성체 8일째에 buffer로 3회 세척 후 ice상에서 homogenizer(homogenization buffer: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5)를 이용하여 샘플링되었다. 먼저 Bradford assay를 수행하여 샘플별 단백질 함량을 일정하게 하였다. 그 후 혈당측정기(Accu-chek active kit, Roche Diagnostics GmbH, Germany)에 샘플을 점적하여 glucose 농도를 측정하였다.

세포내 활성산소종 분석 - 세포내 활성산소종은 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(H₂DCF-DA)를 사용하여 측정되었다. 성장 단계가 동일한 선충은 2% glucose와 다양한 농도의 석위가 함유된 plate에서 배양되었다. 성체 20일째에 100 μ L의 M9 buffer가 담긴 96-well plate에 5마리씩 옮겨졌다. 그 뒤 50 μ M H₂DCF-DA 100 μ L를 첨가한 뒤 60분 동안 반응시킨 후 excitation 490 nm, emission 510-570 nm에서 형광도를 측정하였다.

선충 내부의 lipid storage 분석 - 선충 내부의 lipid storage를 측정하기 위해 Nile red 염색법을 이용하였다. Nile red stock(0.5 mg/1 mL with acetone)은 1:250의 비율로 OP50와 혼합하여 NGM plate에 도말되었다. 성장 단계가

동일한 선충은 성체 1일째에 Nile red가 함유된 OP50이 도말된 plate에 옮겨졌으며 12일 동안 Nile red를 섭취하게 하였다. 그 후 M9 buffer로 2회 세척하였으며 sodium azide (2%, w/v)로 마취하여 agarose pad(2%, w/v)에 올려졌다. 형광현미경(SMZ1500, Nikon, Japan)과 이미지 분석 프로그램(NIS-Elements, Nikon, Japan)을 이용하여 lipid storage의 측정하였고 Image J software로 사진을 분석하였다.

DAF-16의 핵내 이동 분석 - DAF-16의 핵내 이동을 분석하기 위해 TJ356(Pdaf-16::daf-16-gfp;rol-6) strain을 이용하였다. 성장 단계가 동일한 TJ356은 2% glucose와 다양한 농도의 석위가 함유된 plate에서 배양되었다. 성체 5일째에 M9 buffer로 2회 세척하였으며 sodium azide(2%, w/v)로 마취하여 agarose pad(2%, w/v)에 올려졌다. 형광현미경(Eclipse Ni-u, Nikon, Japan)과 이미지 분석 프로그램(NIS-Elements, Nikon, Japan)을 이용하여 DAF-16의 핵내 이동을 관찰하였다.

운동능력 측정 - 성장 단계가 동일한 선충은 2% glucose와 다양한 농도의 석위가 함유된 plate에서 배양되었다. 그 후 성체 10일째에 깨끗한 NGM plate로 옮겨 1분 동안 동안 선충이 움직인 거리를 실체현미경과 이미지 분석 프로그램(NIS-Elements, Nikon, Japan)을 사용하여 측정하였다.

통계 분석 - 모든 자료는 평균값±표준오차(mean±S.E.M.)로 표시하였다. 유의성 검증은 실험결과에 따라 one-way ANOVA 또는 Log-rank test 분석법을 이용하였고 * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 및 *** $p<0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

산업화와 도시화로 인한 서구형 식생활이 증가함에 따라 혈중 glucose 농도를 나타내는 혈당지수(glucose index, GI)가 높아지고 있는 실정이다. 체내에서 만성 고혈당 상태는 인슐린을 생산하는 췌장 β -cell에 손상을 주어 인슐린의 분비 및 감수성에 문제가 생기기 때문에 혈중 glucose 농도 조절 장애는 당뇨의 주요 원인으로 인식되고 있다.¹²⁾ 따라서 효과적인 혈중 glucose 농도 조절은 당뇨병 치료에 있어

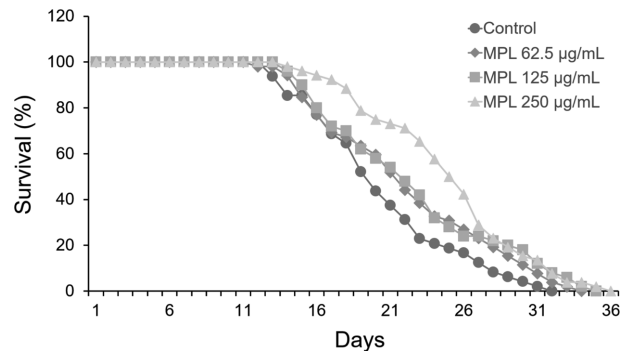


Fig. 1. Effects of MPL on the lifespan of *C. elegans*. Lifespan assay was performed using wild-type N2 worms. The number of worms used per each lifespan assay experiment was 48-52 and three independent experiments were repeated (N=3).

서 중요한 치료방법 중 하나이다.

본 연구에서는 석위가 당뇨병에 미치는 영향을 2% glucose에 의해 당뇨병이 유발된 *C. elegans*를 사용하여 검증하였다. 먼저 석위가 2% glucose의 독성이 유발된 선충의 수명에 미치는 영향을 알아보기 위하여 석위를 농도별(0, 62.5, 125, 250 µg/mL)로 처리한 후 glucose toxicity assay를 수행하였다. Table II와 Fig. 2에서 확인할 수 있듯이 2% glucose의 처리에 의해 선충의 평균 수명이 19.22일에서 14.96일로 약 22.16% 감소(### $p<0.001$)하였고 감소된 수명은 석위 투여에 의해 농도의존적으로 회복되었다. 석위는 62.5, 125 및 250 µg/mL의 농도에서 각각 평균 수명을 17.06일(** $p<0.01$), 18.57일(*** $p<0.001$), 20.00(*** $p<0.001$)일로 증가시켰다. 선행연구에서 2% glucose 처리에 의해 선충의 수명이 감소하는 것은 insulin/IGF-1 signaling pathway의 활성화를 통해 나타나는 것으로 보고된 바 있으며 이는 2% glucose에 의한 수명의 감소가 노화와 매우 밀접한 관련이 있음을 의미한다.¹³⁾ 따라서 정상 성장 조건에서 석위가 선충의 수명에 미치는 영향을 알아보기 위해 lifespan assay를 수행하였다. 실험의 결과, 정상 성장 조건에서 석위 투여에 의해 선충의 평균 수명이 62.5, 125 및 250 µg/mL의 농도에서 각각 10.25%, 12.80%, 24.87%로 농도의존적으로 증가하였음을

Table I. Effects of MPL on the lifespan of *C. elegans*

Genotype	Treatment	Dose (µg/mL)	Mean lifespan	Maximum lifespan	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
Wild-type	Vehicle	-	19.22±0.73	32	-	-
	MPL	62.5	21.19±0.82	34	10.25	* $p=0.049$
	MPL	125	21.68±0.87	35	12.80	* $p=0.016$
	MPL	250	24.00±0.73	36	24.87	*** $p<0.001$

Mean lifespan presented as mean±S.E.M. data. Change in mean lifespan (%) was compared with control group. Statistical significance of the difference between survival curves was determined by log-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. Differences compared to the control were considered significant at *** $p<0.001$

Table II. Effects of MPL on the glucose toxicity of *C. elegans*

Treatment	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	2% Glucose	Mean lifespan	Maximum lifespan	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
Vehicle	-	-	19.22 \pm 0.73	32	-	-
Vehicle	-	+	14.96 \pm 0.18	27	-22.16	$p<0.001$ ###
MPL	62.5	+	17.06 \pm 0.60	26	-11.23	$p=0.001$ **
MPL	125	+	18.57 \pm 0.35	28	-3.38	$p<0.001$ ***
MPL	250	+	20.00 \pm 0.38	28	4.05	$p<0.001$ ***

Mean lifespan presented as mean \pm S.E.M. data. Change in mean lifespan (%) was compared with control group. Statistical significance of the difference between survival curves was determined by log-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. ### $p<0.001$ compared to vehicle. ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ compared to 2% glucose-MPL treated groups

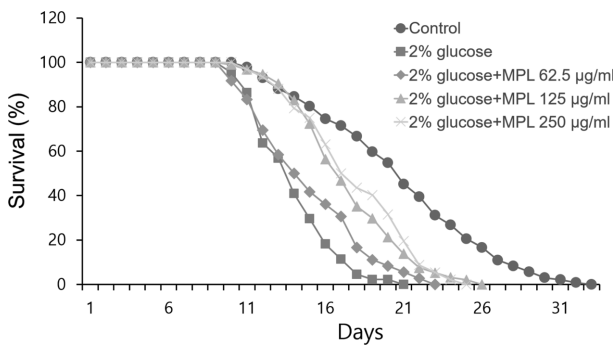


Fig. 2. Effects of MPL on the glucose toxicity of *C. elegans*. Glucose toxicity assay was performed using wild-type N2 worms. The number of worms used per each glucose toxicity assay experiment was 36-281 and three independent experiments were repeated (N=3).

확인하였다(Table I, Fig. 1). 이러한 결과로 볼 때 석위에 의한 정상조건에서의 수명 연장은 2% glucose 처리에 의해 감소된 수명을 회복시키는 것과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다.

다음으로 석위가 선충 내부에 존재하는 glucose 농도에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 선충의 균질현탁액(homogenate)을 이용하여 glucose concentration assay를 수행하였다. Fig. 3에서 확인할 수 있듯이 2% glucose를 처리한 경우 정상 조건의 선충에 비해 체내 glucose의 농도가 39 $\mu\text{g/dL}$ 에서 72 $\mu\text{g/dL}$ 로 약 1.85배(### $p<0.001$) 증가하였으나 이러한 증가는 석위 투여에 의해 유의적으로 감소하였다(-37.3% at 62.5 $\mu\text{g/mL}$, -50.0% at 125 $\mu\text{g/dL}$ (** $p<0.001$), -54.5% at 250 $\mu\text{g/mL}$).

고혈당은 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)의 생성을 증가시켜 β -cell을 포함한 다양한 세포에 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있다. 특히, 고혈당으로 인해 생성된 과도한 ROS는 advanced glycation end products (AGEs)를 생성하고 인슐린의 분비 및 감수성을 저해하여 당뇨 합병증의 발병에도 영향을 미친다고 알려져 있다.¹⁴⁾ 또한 ROS는 당 분해 과정을 촉진시키며 이는 methylglyoxal

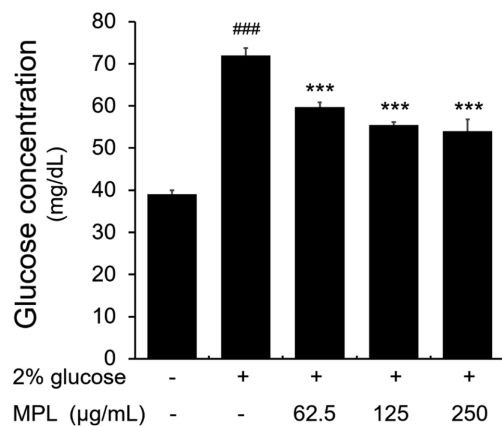


Fig. 3. Effects of MPL on the glucose concentration. For measurement of glucose concentrations, about 100,000 worms which was elapsed 5 days from glucose contained NGM plate were sampled. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (N=3). Differences between groups were statistically analysed by one-way ANOVA. ### $p<0.001$ compared to control-2% glucose group, while *** $p<0.001$ compared to 2% glucose-MPL treated groups.

(MG)의 독성을 완화시키는 효소인 glyoxalase-1을 억제시키는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ MG는 glucose 대사 과정에서 생성된 중간 대사물로 당뇨 및 노화의 발병에 증점적으로 작용하는 AGEs의 형성에 관여한다.¹⁶⁾ 실제로 선행연구에서 2% glucose에 의한 선충의 수명 감소가 ROS와 MG의 생성 증가에 따른 AGEs의 축적과 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀졌다.¹⁷⁾ 이에 본 연구에서는 석위가 2% glucose에 의해 증가된 ROS를 감소시키는지 알아보기 위하여 H₂DCF-DA를 이용하여 세포 내 ROS의 양을 분석하였다. 실험 결과, 2% glucose는 세포 내 ROS를 비교대조군에 비해 130.65% 증가시켰고 석위 투여에 의해 증가한 ROS가 농도의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과는 골당초의 항산화 작용과 관련이 있을 것으로 추정되며, 석위의 투여에 의해 AGEs의 생성 및 축적이 감소될 수 있을 것으로 기대된다.

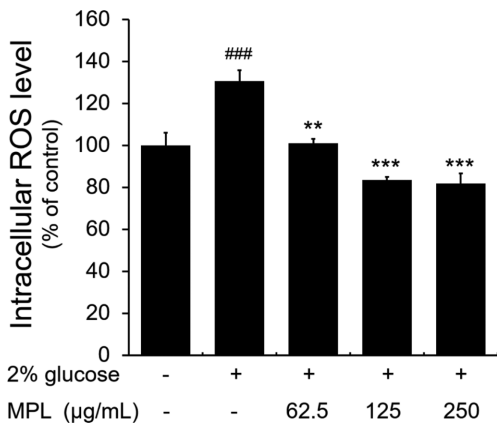


Fig. 4. Effects of MPL on the intracellular ROS levels. Intracellular ROS level was quantified spectrophotometrically at excitation 490 nm and emission 510-570 nm. The plate was read at 60 min after treatment of H₂DCF-DA. Data are expressed as the mean±S.E.M. of three independent experiments (N=3). Differences between groups were statistically analysed by one-way ANOVA. ###*p*<0.001 compared to control-2% glucose group, while ***p*<0.01 and ****p*<0.001 compared to 2% glucose-MPL treated groups.

비만은 인슐린 저항성을 증가시켜 당뇨의 발병 및 병리기작과 밀접한 관련이 있다. 지방의 과도한 축적은 insulin-stimulated glucose transport(GLUT)의 발현 감소를 통해 인슐린의 저항성을 야기하는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 본 연구

에서 사용한 동물모델인 *C. elegans*는 인간과 유사하게 과도한 glucose의 섭취에 지방이 축적되는 것으로 보고된 바 있다.¹⁹⁾ 이에 본 연구에서는 석위가 선충의 지방 축적에 영향을 미치는지 알아보기 위해 Nile red 시약을 이용하여 지방세포를 염색하였다. Fig. 5에서 확인할 수 있듯이 2% glucose를 처리한 경우 정상 조건의 선충에 비해 지방 축적량이 2배 이상 증가(###*p*<0.001)하였으나 석위의 투여에 의해 농도의존적으로 감소하였다. 이러한 결과는 선충 내부의 glucose 농도를 감소시켜 지방으로 전환되는 잉여 glucose 양이 줄어드는 것에서 기인하는 것으로 생각되며, 석위가 지방대사 자체에 영향을 미쳐 지방의 축적을 저해하는지의 여부를 확인하기 위해서는 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

최근 연구에 의하면 *C. elegans*에 glucose를 투여하였을 때 체내에서 apoptosis가 유도되어 근육 세포 및 근력이 감소된다고 알려져 있으며, 이는 운동능력의 감소로 이어진다고 보고되고 있다.²⁰⁾ 본 연구에서는 정상 성장 조건 및 2% glucose 조건에서 석위가 선충의 운동능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 성체 10일 째에 motility assay를 수행하였다. 실험 결과, 정상 성장 조건 뿐만 아니라 2% glucose 조건에서 모두 석위는 농도의존적으로 선충의 운동능력을 향상시켰다(Fig. 6). 대조군은 1분 동안 6600 µm를 움직인 반면에 2% glucose를 처리한 경우 1500 µm로 움직인 거리가 감소하였다(###*p*<0.001). 2% glucose와 석위를 함께 투여한

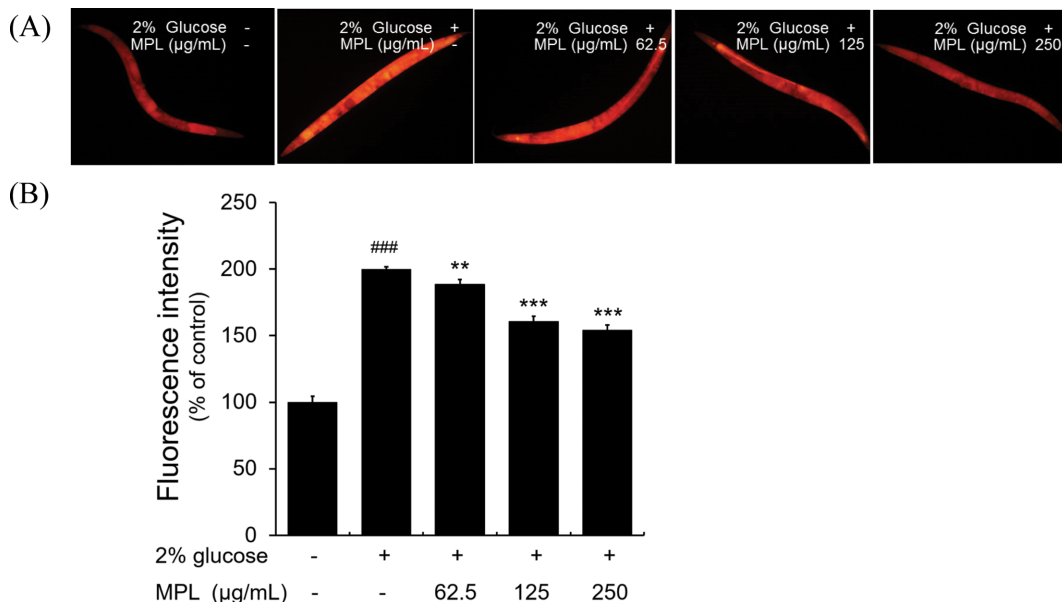


Fig. 5. Effects of MPL on the lipid storage. (A) Nile red staining of wild-type N2 which was grown at various concentration of MPL. Fluorescent images of lipid of worms staining by Nile red. (B) Fluorescence intensity of the nematodes was quantified using Image J software by determining average pixel intensity. Mean fluorescence intensity of lipid was represented as mean±S.E.M. of values from 24-48 animals. Differences between groups were statistically analysed by one-way ANOVA. ###*p*<0.001 compared to control-2% glucose group, while ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared to 2% glucose-MPL treated groups.

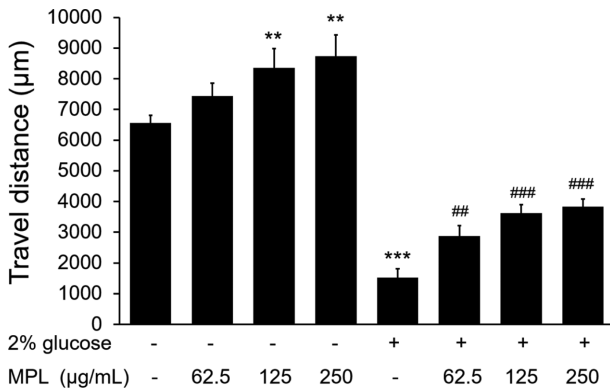


Fig. 6. Effects of MPL on the motility. To check the motility of *C. elegans*, the analysis was taken on 10th day of adulthood. Motility of worms were counted under a dissecting microscope for 1 min. Each animal was analyzed by the Nikon software (Nikon, Japan). All the tests were repeated at least 3 times. Differences between groups were statistically analysed by one-way ANOVA. ***p*<0.01 and ****p*<0.001 compared to control group, while ##*p*<0.01 and ###*p*<0.001 compared to 2% glucose-MPL treated groups.

경우 감소된 운동능력이 농도의존적으로 회복되었음을 관찰할 수 있었으며 이는 석위가 2% glucose 처리에 의해 감소된 근력을 회복시킴을 나타낸다(2900 µm at 62.5 µg/mL, 3600 µm at 125 µg/mL, 3800 µm at 250 µg/mL).

포유류 및 *C. elegans*에서 FOXO는 glucose의 대사를 조절하는 인자이며 Lee 등에 의하면 *C. elegans*에서 2% glucose는 insulin/IGF-1 signaling pathway의 조절을 통해 transcriptional factor인 DAF-16/FOXO 및 *aqp-1*/aquaporin glycerol channel 발현을 억제하는데 이는 수명의 감소로 이어지게 된다.^{13,21} 기존 연구결과를 바탕으로 2% glucose로 유도된 독성에 대한 석위의 보호 효과의 가능한 기전을 알아보기 위해 *daf-16* null 돌연변이 선충을 이용하여 glucose toxicity assay를 수행하였다. 실험 결과, glucose와 석위 모두 해당 돌연변이 선충의 수명의 변화에 유의적인 영향을

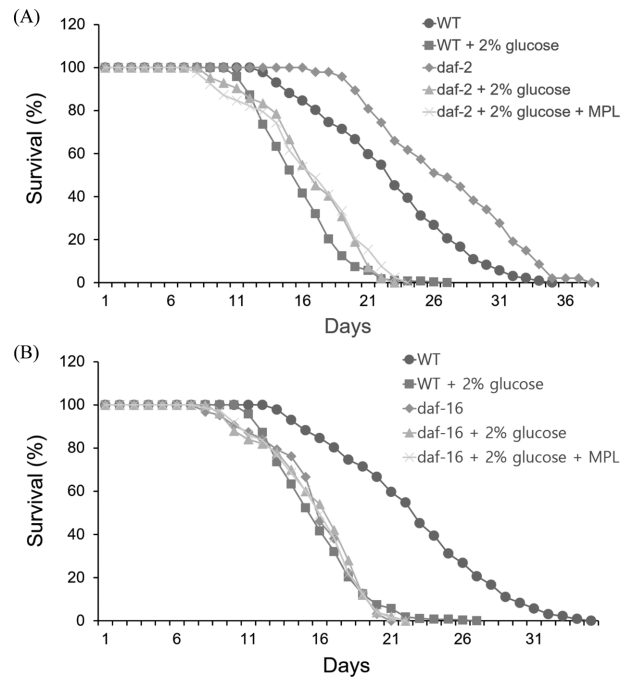


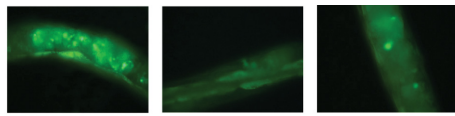
Fig. 7. Mechanism of MPL-induced protective activities against 2% glucose-induced toxicity. Glucose toxicity assay was performed using DR1572 (*el368*) and GR1307 (*mgDf50*). The number of worms used per each glucose toxicity assay experiment was 39-73 and three independent experiments were repeated (N=3).

미치지 않음을 확인하였다. 이러한 결과는 glucose에 의한 선충의 수명 감소에 *daf-16*이 관여하며, glucose에 의한 독성에 대한 석위의 보호 효능 역시 동유전자와 관련이 있는 것을 나타낸다(Table III and Fig. 7B). 석위의 약리작용에 DAF-16이 매개되어 있는지 검정하기 위하여 DAF-16에 GFP가 결합된 돌연변이 선충을 이용하여 DAF-16의 핵내 이동을 형광현미경을 이용하여 측정하였다. 실험 결과, glucose를 처리한 경우 정상 성장 조건에 비해 DAF-16의 활성이 감소되어 특이한 형광 양상이 관찰되지 않았으나 석위를 함

Table III. Involvement of insulin receptor and FOXO in MPL-mediated protective activities

Genotype	Treatment	Dose (µg/mL)	2% Glucose	Mean lifespan	Max. lifespan	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
<i>daf-2(e1368)</i>	-	-	-	26.15±0.79	38	-	-
	-	-	+	15.93±0.57	23	-64.16	<i>p</i> <0.001 ***
	MPL	250	+	15.82±0.69	24	-65.30	<i>p</i> =0.586
<i>daf-16(mgDf50)</i>	-	-	-	14.98±0.41	21	-	-
	-	-	+	15.00±0.49	22	0.13	<i>p</i> =0.735
	MPL	250	+	14.90±0.38	22	-0.67	<i>p</i> =0.718

Mean lifespan presented as mean±S.E.M. data. Change in mean lifespan (%) was compared with control group. Statistical significance of the difference between survival curves was determined by rog-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. Differences compared to the control were considered significant at ****p*<0.001



2% glucose	-	+	+
MPL (µg/mL)	-	-	250

Fig. 8. Effects of MPL on the nuclear localization of DAF-16. The translocation of DAF-16 was visualized under fluorescence microscope using TJ356 strain which carries *daf-16::gfp* transgene. Worms were subjected to analyze GFP expression after 5 days from transferred to NGM plate contained 2% glucose at 20°C.

게 투여한 경우 핵내로 이동한 DAF-16의 양이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 이러한 결과는 석위가 DAF-16의 핵내 이동을 조절하여 DAF-16에 의해 발현되는 *aqp-1*과 *sod-3* 등의 활성화를 유도하여 glucose의 독성을 완화시키는 것을 나타낸다.^{13,22)}

Lee 및 Murphy 등의 연구에 의하면 DAF-2/insulin receptor의 agonist인 INS-7은 glucose 처리에 의해 과발현되며 glucose는 wild-type 선충뿐만 아니라 *daf-2* null mutant의 수명도 감소시킨다고 알려져 있다.^{13,23)} 이에 본 연구에서는 *daf-2* null 돌연변이를 이용하여 glucose toxicity assay를 수행하였다. 실험 결과 2% glucose는 *daf-2* null 돌연변이 선충의 수명을 억제하였으며 glucose와 석위를 동시에 처리한 선충에서는 glucose만 처리한 선충과 비교하여 유의적인 수명의 변화가 관찰되지 않았다(Table III and Fig. 7A). 이러한 결과는 석위가 INS-7의 발현에 영향을 미치거나 INS-7에 의해 활성화되는 insulin/IGF-1 signaling pathway를 조절하여 glucose에 대한 독성 완화 효과를 나타냄을 의미한다.

이상의 연구 결과를 통해 석위가 선충을 이용한 당뇨모델에서 insulin receptor 및 전사인자인 FOXO의 조절을 통해 우수한 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 보다 정확한 약리기전 및 활성 성분 확인을 위해서는 향후 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 *C. elegans* 모델을 이용하여 glucose로 유도된 독성에 대한 석위의 보호효능에 대해 알아보았다. 석위는 2% glucose에 의해 감소된 선충의 수명을 농도의존적으로 회복시켰으며 선충 내부의 glucose 농도 역시 감소시켰다. 또한 다양한 당뇨 관련 인자들에 미치는 영향을 결과, 석위는 2% glucose에 의해 증가된 세포 내 ROS와 지질의 축적을 효과적으로 감소시켰다. 더불어 2% glucose에 의해 감소된 선충의 운동능력이 석위의 투여에 의해 유의적으로 증가한 것을 알 수 있었다. 이러한 석위의 효능은 insulin

receptor 및 FOXO의 조절을 통해 나타난 것임을 알 수 있었다.

인용문헌

- Canivell, S. and Gomis, R. (2014) Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmunity Reviews* **13**: 403-407.
- Gavin III, J. R., Alberti, K., Davidson, M. B. and DeFronzo, R. A. (1997) Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **20**: 1183.
- Chiang, J. L., Kirkman, M. S., Laffel, L. M., Peters, A. L. and Type 1 Diabetes Sourcebook Authors. (2014) Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* **37**: 2034-2054.
- Asano, N., Yamashita, T., Yasuda, K., Ikeda, K., Kizu, H., Kameda, Y., Kato, A., Nash, R. J., Lee, H. S. and Ryu, K. S. (2001) Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4208-4213.
- Do, J. C., Jung, K. Y. and Son, K. H. (1992) Notes; Flavonoid Glycosides from the Fronds of *Pyrrhosia lingua*. *Kor. J. Pharmacogn.* **23**: 276-279.
- Yamashita, H., Masuda, K., Kobayashi, T., Ageta, H. and Shiojima, K. (1998) Dammarane triterpenoids from rhizomes of *Pyrrhosia lingua*. *Phytochemistry* **49**: 2461-2466.
- Lim, H., Kwon, J. and Jeon, H. (2014) *Pyrrhosia lingua* Reduces Nociception in Mouse. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**: 285-289.
- Kim, M., Park, J. and Lim, S. (2010) Antioxidant activity and cell toxicity of pressurised liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea. *Food Chem.* **122**: 546-552.
- Cho, S., Yoo, W., Ahn, S. and Kim, N. (2007) The formation of Sogal concept and classification in Korean Traditional Medicine. *Korean J. Orient Med.* **13**: 1-14.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S. and Johnson, T. E. (1995) Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 7540-7544.
- Rezania, A., Bruin, J. E., Xu, J., Narayan, K., Fox, J. K., O'Neil, J. J. and Kieffer, T. J. (2013) Enrichment of human embryonic stem cell-derived NKX6.1-expressing pancreatic progenitor cells accelerates the maturation of insulin-secreting cells in vivo. *Stem Cells* **31**: 2432-2442.
- Lee, S. J., Murphy, C. T. and Kenyon, C. (2009) Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell Metab.* **10**: 379-391.
- Ha, H., Hwang, I., Park, J. H. and Lee, H. B. (2008) Role of

- reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **82**: S42-S45.
15. Morcos, M., Du, X., Pfisterer, F., Hutter, H., Sayed, A. A., Thomalley, P., Ahmed, N., Baynes, J., Thorpe, S. and Kukudov, G. (2008) Glyoxalase?1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell* **7**: 260-269.
 16. Schalkwijk, C. G., van Bezu, J., van der Schors, Roel C, Uchida, K., Stehouwer, C. D. and van Hinsbergh, V. W. (2006) Heat-shock protein 27 is a major methylglyoxal-modified protein in endothelial cells. *FEBS Lett.* **580**: 1565-1570.
 17. Schlotterer, A., Kukudov, G., Bozorgmehr, F., Hutter, H., Du, X., Oikonomou, D., Ibrahim, Y., Pfisterer, F., Rabbani, N., Thomalley, P., Sayed, A., Fleming, T., Humpert, P., Schwenger, V., Zeier, M., Hamann, A., Stern, D., Brownlee, M., Bierhaus, A., Nawroth, P. and Morcos, M. (2009) *C. elegans* as model for the study of high glucose- mediated life span reduction. *Diabetes* **58**: 2450-2456.
 18. Samuel, V. T., Petersen, K. F. and Shulman, G. I. (2010) Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *The Lancet.* **375**: 2267-2277.
 19. Nomura, T., Horikawa, M., Shimamura, S., Hashimoto, T. and Sakamoto, K. (2010) Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* is mediated by SREBP homolog SBP-1. *Genes & Nutrition* **5**: 17-27.
 20. Tissenbaum, H. A. (2012) Genetics, life span, health span, and the aging process in *Caenorhabditis elegans*. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **67**: 503-510.
 21. Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P. and Brunet, A. (2007) The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **282**: 30107-30119.
 22. Mendler, M., Riedinger, C., Schlotterer, A., Volk, N., Fleming, T., Herzig, S., Nawroth, P. P. and Morcos, M. (2017) Reduction in *ins-7* gene expression in non-neuronal cells of high glucose exposed *Caenorhabditis elegans* protects from reactive metabolites, preserves neuronal structure and head motility, and prolongs lifespan. *J. Diabetes Complications* **31**: 304-310.
 23. Murphy, C. T., McCarroll, S. A., Bargmann, C. I., Fraser, A., Kamath, R. S., Ahringer, J., Li, H. and Kenyon, C. (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**: 277-283.
- (2017. 8. 8 접수; 2017. 9. 5 심사; 2017. 9. 11 게재확정)