

陳皮의 항산화 활성 및 L6 근육세포에서 당대사에 미치는 영향

김수현^{1#}, 박해진^{2#}, 김경조¹, 김민주¹, 이진아¹, 이아름³, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 대구한의대학교 산학협력단 코스메디컬센터
3 : 호산대학교 뷰티디자인학과

Antioxidant Activity of Citrus Peel and Effect on its Glucose Metabolism in L6 Rat Skeletal Muscle Cells

Soo Hyun Kim^{1#}, Hae-Jin Park^{2#}, Kyeong Jo Kim¹, Min Ju Kim¹, Jin A Lee¹
Ah Reum Lee³, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea
2 : Cosmedical Center, Academic Industry Cooperation, Daegu Haany University, Republic of Korea
3 : Department of beauty design, Hosan university, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : This study aimed to effects antioxidant activity of citrus peel extract (CPE) and effect on its glucose metabolism in L6 rat skeletal muscle cells.

Methods : Antioxidative activities were evaluated by using 10 kinds of natural materials, and total polyphenol and flavonoid contents were examined. The L6 muscle cells toxicity of CPE was examined by MTT assay. Expression of glucose-related genes in L6 muscle cells by CPE treatment was analyzed by real-time PCR and western blotting.

Results : The IC₅₀ values of DPPH and ABTS free radical scavenging activity of CPE were (15.47 ± 0.26 µg/ml and 12.07 ± 1.23 µg/ml, respectively), effectively clearing DPPH and ABTS. CPE showed total polyphenol and flavonoid contents (20.30 ± 0.38 and 64.20 ± 0.52, respectively). The selected CPE were used in experiments using an effective concentration that is not toxic in L6 muscle cells. We investigated insulin receptor substrate-1 (IRS-1), phosphatidylinositol 3-kinase regulatory (PI3KR), Akt, and glucose transporter 4 (GLUT4). mRNA analysis by real-time PCR showed no significant difference, but CPE-treated cells showed a tendency to increase in concentration-dependent manner. However, analysis of protein expression of Akt and GLUT4 by western blotting showed that CPE treatment significantly increased concentration dependent ($p < 0.001$).

Conclusions : As a result, citrus peel extract with high antioxidant activity regulates glucose metabolism in L6 muscle cells. Therefore, CPE can be a potential treatment for the treatment of diabetes.

Key words : Antioxidative, citrus peel extract, L6 muscle cells, glucose metabolism, glucose transporter 4

I. 서 론

만성 대사성 질환인 당뇨병 (diabetes)은 혈중 인슐린 농도

및 포도당 농도를 높이고 인슐린 저항성을 가지는 것을 특징으로 하는 질환이며¹⁾, 말초신경병증, 신장 기능 저하, 시력저하, 동맥경화 등 다양한 합병증을 유발한다²⁾. 인슐린은 세포 내

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Soo Hyun Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : hyunsk0513@gmail.com

· Received : 22 June 2018 · Revised : 12 July 2018 · Accepted : 25 July 2018

저장소에 있는 포도당 수송체 (GLUT)의 세포막으로 전이를 통하여 포도당 수송하는데 관여하는 것으로 밝혀져 있으며³⁾, GLUT4는 다양한 생리 자극에 의하여 세포 내 포도당 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다.

당뇨병 치료에 사용되는 치료 약물은 troglitazone 제제, sulfonylurea 제제, biguanide 제제, 인슐린 제제 등이 있다. 그러나, 이러한 약물제제는 저혈당, 유산증 등과 같은 다양한 부작용들이 보고되어져 있으며⁴⁾, 최근에는 독성과 부작용이 우려되는 기존 약물치료 외에 천연물을 이용한 천연 유래 혈당 강하 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁵⁾.

陳皮는 운향과 (Rutaceae)에 속한 상록 소교목인 귤나무 (*Citrus unshiu* Markovich)의 성숙한 과실의 과피 (Citri Pericarpium)를 건조시킨 것으로, 理氣, 健脾, 燥濕, 化痰하는 중요한 약이 된다. 따라서 理氣建胃, 燥濕化痰 하는 작용을 지니고 있으면서 中氣가 不和하여 발생하는 胸悶腹脹, 구토, 噯氣, 식욕부진 및 痰多, 咳嗽 등의 증상에 활용 된다⁶⁾. 함유 성분으로는 flavonoid, alkaloid, sesquiterpenoid, triterpenoid 등 다양한 기능성 성분을 함유하고 있어 소화촉진, 항균 작용, 항산화 작용, 모세혈관 강화 등과 같은 효능이 있는 것으로 보고되어져 있다⁷⁾. 또한 주요 flavonoid 화합물인 hesperidin을 4% 이상 함유하고 있으며 천연 바이오플라보노이드와 베타카로틴 등 다양한 생리활성 물질이 함유되어진 것으로 밝혀져 있다⁸⁾.

따라서 본 연구에서는 천연 소재인 陳皮 추출물 (CPE)의 항산화 효과 및 L6 근육세포에서 당대사의 효능을 평가하여 항당뇨 천연 소재로서의 사용 가능성을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료

본 실험에 사용된 陳皮는 읍니허브 (영천, 한국)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞춰서 관능검사하여 약전규격에 적합한 것만을 정선하여 사용하였다 (Table 1). 陳皮 100 g 분량에 물 1,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 가열하여 추출액을 얻었다. 그 추출액을 감압 증류장치로 농축하여, 그것을 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 분말을 (CPE 22.7 g, 22.7%) 얻었으며 실험에 사용하기 직전까지 냉동 (-80°C) 보관하였다.

Table 1. Contents of Medicinal Plant

Herb	陳皮
Latin name	Citri Unshii Pericarpium
Scientific name	<i>Citrus unshiu</i>
Used part	Pericarp
Origin	Korea

2. 시약

본 실험에 사용된 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH),

7 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, diethylene glycol, sodium hydroxide, naringin은 Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Trizol (Invitrogen, CA, USA) 구입하였고, High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems ; Foster City, CA, USA) 사용하였으며 Akt, GLUT4 및 GAPDH 1차항체와 Goat anti-rabbit IgG conjugates horseradish peroxidase (Abcam, Cambridge, UK), Molecular Imager software system (Bio-Rad Laboratories, USA) 각각 구입하여 사용하였다.

3. 항산화 활성 측정

1) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

항산화 활성을 측정하는 방법으로 Blois에 의한 DPPH free radical 소거법을 사용하였다⁹⁾. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 중에 포함된 항산화 물질의 양을 측정하는데 사용되는 대표적인 실험법이다. 일정농도의 시료 100 μ l과 60 μ M DPPH 용액을 100 μ l 넣고 혼합한 후, 암소상태의 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 UV spectrophotometer (Infinite M200, Tecan, Salzburg, Austria)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 사용하여 측정하여 산출하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데, 필요한 시료의 양을 IC₅₀으로 하여 나타내었다.

2) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

항산화 효능을 비교 평가하기 위하여 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM Potassium persulfate를 증류수에 녹인 다음 12시간동안 차광하여 반응시킨 후, 이 반응액을 415 nm에서 ethanol을 이용하여 흡광도 0.70±0.02로 보정하였다. ABTS 용액 95 μ l에 시료 5 μ l를 첨가하고 15분 동안 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다¹⁰⁾.

3) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법에 의해 측정하였다¹¹⁾. 시료 20 μ l에 증류수 1.58 ml, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ l를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 300 μ l의 20% Na₂CO₃를 첨가하였다. 20°C에서 2시간 후 UV spectrophotometer (Infinite M200, Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 구하고, 시료의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

4) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Lister 등의 방법에 의해 측정하였다¹²⁾. 890 μ l의 diethylene glycol과 시료추출물 100 μ l 및 1 N NaOH 10 μ l를 잘 혼합시켜 37°C의 water bath에서 1 시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 naringin을 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여

시료의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

4. 세포 독성 측정

CPE의 세포독성은 MTT 분석법으로 평가하였다. CPESMS confluent 상태의 L6 myoblast cell에 10, 50, 100, 200, 400, 그리고 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 처리하였다. 처리 후 PBS에 용해된 2 mg/ml 의 MTT 시약을 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 10% BCS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 희석하여 추가로 37°C incubator에서 1시간 동안 배양하였다. 반응이 끝난 후 배지를 완전히 제거하고 DMSO 300 μl 를 첨가하여 보라색의 formazan을 용해시켰다. Formazan 용액은 96-well plate에 100 μl 씩 넣어 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아무것도 처리되지 않은 L6 myoblast 세포의 흡광도를 대조군으로 하여 세포독성 (% of control)을 평가하였다.

5. Real-time PCR

당대사 관련 주요 분자들의 유전자 발현량을 평가하기 위하여 L6 myoblast 세포를 4일간 분화하여 glucose 유입을 조절하는 IRS-1, Akt, PIK3R와 GLUT4 유전자를 Real Time PCR로 평가하였다. CPE 농도별 (0~100 $\mu\text{g/ml}$) 또는 1 μM insulin을 처리하여 3시간 동안 배양한 후 차가운 PBS로 2번 세척하여 1 ml Trizol (Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 추출한 2 μg 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-1 (Mm01278327_m1), Akt (Mm01331626_m1), PIK3R (Mm00803160_m1)와 GLUT4 (Mm00436615_m1)를 사용하였으며, 95°C에서 10분간 denaturing 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초의 간격으로 40회 반복하여 증폭하였다.

Table 2. Probe and Oligonucleotide

Gene		Primer sequence
IRS-1	forward	5' -CAGTCTTCCCTGCACCCTCC-3'
	reverse	5' -AATGCCTGTCCGCATGTCAG-3'
Akt	forward	5' -CAAGGACGGGCACATCAAGA-3'
	reverse	5' -TCAGAGGTGACCTGGGGCTT-3'
PIK3R	forward	5' -ACATCCGTCTCCAGTCCAAAA-3'
	reverse	5' -CAGGTTTCTTGTTCGGTGCAA-3'
GLUT4	forward	5' -ACGCCACCATAGGAGCTGGT-3'
	reverse	5' -AGAAGCCAAGCAGGAGGACG-3'
GAPDH	forward	5' -CCAAGGTCATCCATGACAAC-3'
	reverse	5' -TGACAAAGTGGTTCGTTGAGG-3'

6. Western Blotting

분화된 근육세포에 CPE 농도별 (0, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$) 또는 1 μM insulin을 3시간 동안 처리하여 차가운 PBS로 2회 세척한 후, protease inhibitor와 phosphatase inhibitor를 포함한 RIPA lysis buffer (Sigma Aldrich, Louis, MO) 넣고 15분간 얼음에 방치시킨 후, 4°C, 8000×g에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 단백질 농도를 측정하였다. 단백질 30 μg 과 β -mercaptoethanol를 포함한 sample buffer를 혼합한 후, 90°C에서 2분간 끓여서 단백질의 변성을 유도하였다. SDS-PAGE를 실행하여 단백질을 분리한 후 0.2 μm Trans-Blot Turbo mini PVDF transfer pack (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)으로 단백질을 전이하였다. 비특이적 단백질 결합 부분은 0.1% Tween 20과 5% BSA를 함유한 Tris buffered saline (TBS)에 1시간 동안 반응시켜 blocking하였다. 제1차 항체 Akt와 GLUT4가 각각 첨가된 용액에서 상

온에서 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 peroxidase가 첨가된 용액을 상온에서 1시간 30분 동안 결합시켜 반응을 한 후 TBST로 5분 동안 3번 세척하였다. 내부 표준단백질은 GAPDH를 사용하였고, 효소반응에 의한 발광을 Molecular Imager software system을 사용하여 표적 단백질의 발현을 측정하였다.

7. 통계분석

데이터는 평균±표준편차로 표현하였으며, SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 Tukey Multiple Comparison test로 사후검증을 실시하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다 ($p < 0.05$).

Ⅲ. 결 과

1. 항산화 활성

陳皮 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH, ABTS 자유 라디칼 소거 활성 및 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량을 측정하였다. DPPH 자유 라디칼 소거 활성을 측정된 결과, 표준물질인 L-ascorbic acid의 IC₅₀값은 2.76±0.04

μg/ml로 나타났고 CPE의 IC₅₀값은 249.33±1.38 μg/ml로 나타났다 (Fig. 1). ABTS 자유 라디칼 소거 활성 측정 결과, L-ascorbic acid의 IC₅₀값은 3.81±0.03 μg/ml로 나타났으며, CPE의 라디칼 소거 활성 IC₅₀값은 204.33±1.44 μg/ml로 나타났다 (Fig. 2). 또한, CPE의 총 폴리페놀 함량은 48.14±0.34 mg/g으로 나타났고, 총 플라보노이드 함량은 36.17±0.52 mg/g으로 높은 함량을 나타냈다 (Table 3).

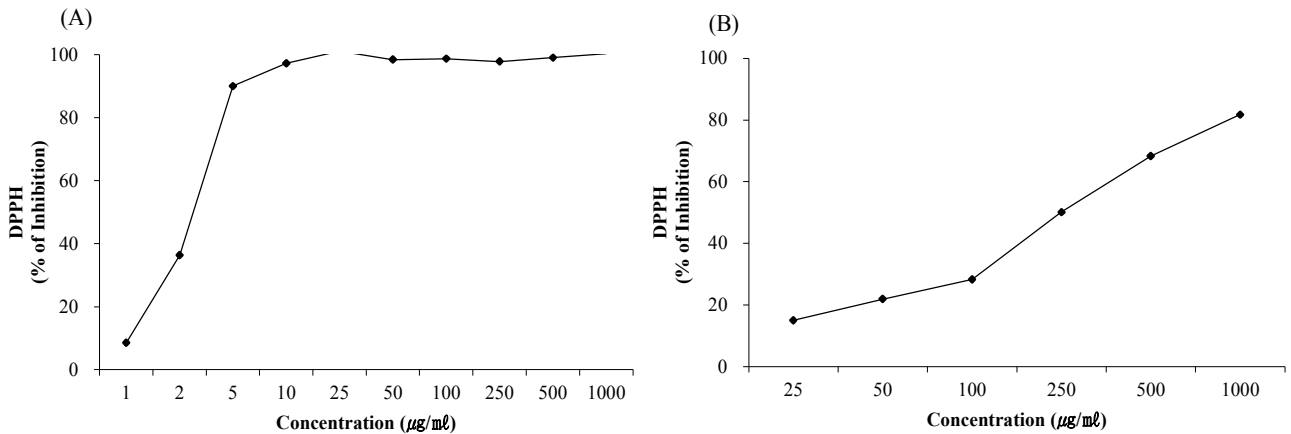


Fig. 1. Scavenging activity of CPE on DPPH free radical. Scavenging activity of L-ascorbic acid against DPPH free radical; (A), Scavenging activity of citrus peel extract against DPPH free radical; (B)

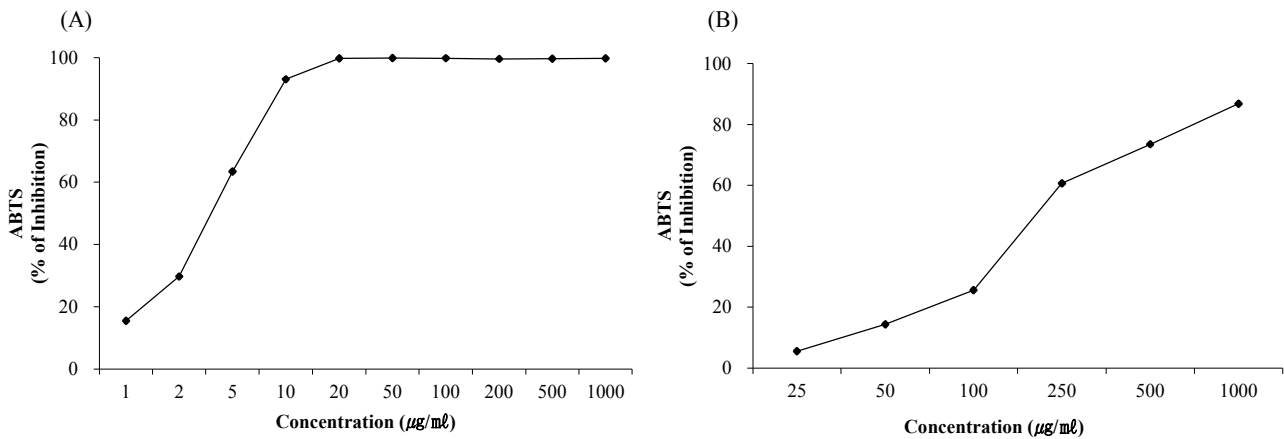


Fig. 2. Scavenging activity of CPE on ABTS free radical. Scavenging activity of L-ascorbic acid ABTS free radical; (A), Scavenging activity of Citri Unshii Pericarpium against ABTS free radical; (B).

Table 3. Total Polyphenol and Total Flavonoid Contents of CPE

Herb	Latin name	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
陳皮	Citri Unshii Pericarpium	48.14±0.34	36.17±0.52

2. 세포독성

L6 근육세포에서 MTT 분석법을 통해 세포 생존률을 측정

하였다. CPE를 10, 50, 100, 200, 400, 그리고 800 μg/ml 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 모든 농도에서 80% 이상의 생존률을 나타내어 세포 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 3).

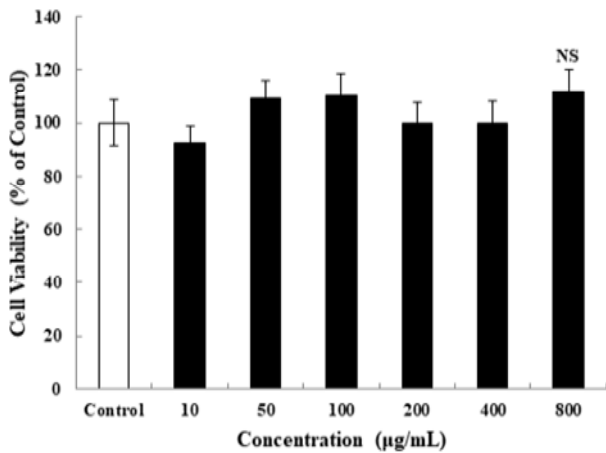


Fig. 3. Effect of CPE on cell viabilities in L6 myoblast cells. The data were expressed as the mean \pm SD. (n=3) from three independent experiments. NS, no significance.

3. Real-time PCR 당 대사 관련 인자 측정

L6 근육세포에서 CPE 처리가 당대사에 미치는 영향을 측정하기 위하여 Real-time PCR을 실시하여 glucose 유입을 조절하는 IRS-1, Akt, PIK3R, GLUT4의 mRNA 발현을 측정하였다. IRS-1 측정된 결과, control군은 (0.67 \pm 0.18) 으로 나타났다. 반면 양성 대조군인 insulin 처리군 (0.95 \pm 0.10)은 control군에 비해 IRS-1의 발현량을 증가시켰고 CPE 50군

(0.68 \pm 0.04), CPE 100군 (0.71 \pm 0.09), CPE 200군 (0.86 \pm 0.19) 그리고 CPE 500군 (0.87 \pm 0.10) 또한 유의성은 없지만 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 4A).

Akt의 mRNA 발현을 측정된 결과, control군은 (0.72 \pm 0.13) 으로 나타났다. control 군에 비해 CPE 50군 (0.68 \pm 0.13)은 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냈다. 반면 양성 대조군인 insulin 처리군 (1.03 \pm 0.09)은 control 군에 비해 Akt의 mRNA 발현량을 증가시켰고, CPE 100군 (0.76 \pm 0.08), CPE 200군 (0.80 \pm 0.25) 그리고 CPE 500군 (0.96 \pm 0.12) 또한 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 4B).

PIK3R의 mRNA 발현을 측정된 결과, control군 (0.74 \pm 0.05) 으로 나타났다. 반면 양성 대조군인 insulin 처리군 (0.95 \pm 0.07 ($p < 0.05$))은 control군에 비해 PIK3R의 mRNA 발현량은 유의성 있는 증가를 나타냈고, CPE 50군 (0.75 \pm 0.06), CPE 100군 (0.80 \pm 0.09), CPE 200군 (0.81 \pm 0.11) 그리고 CPE 500군 (0.87 \pm 0.09) 모두 유의성은 없으나 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 4C).

GLUT4의 mRNA 발현을 측정된 결과, control군은 (0.74 \pm 0.12) 으로 나타났다. 반면 양성 대조군인 insulin 처리군 (1.04 \pm 0.06 ($p < 0.01$))은 control군에 비해 GLUT4의 mRNA 유의성 있는 증가를 나타냈고, CPE 50군 (0.72 \pm 0.09), CPE 100군 (0.87 \pm 0.11), CPE 200군 (0.76 \pm 0.10) 그리고 CPE 500군 (0.85 \pm 0.03) 모두 유의성은 없으나 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 4D).

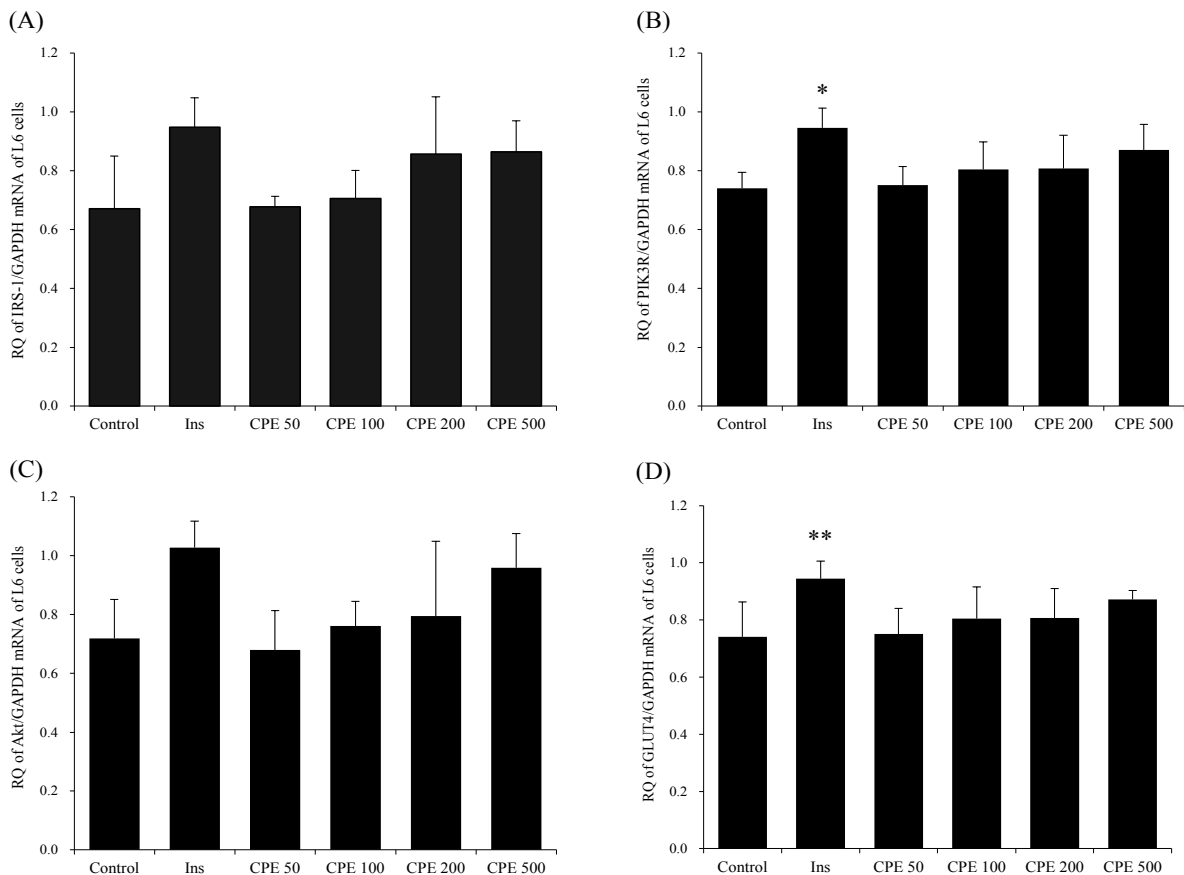


Fig. 4. Expression of glucose-related Real-time PCR mRNA in L6 muscle cell. insulin receptor substrate-1 (IRS-1); (A), phosphatidylinositol 3-kinase regulatory (PI3KR); (B), phosphorylation of serine / threonine-specific protein kinase (Akt); (C), glucose transporter 4 (GLUT4); (D). The data were expressed as the mean \pm SD. (n=3) from three independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4. Western blot 당 대사 관련 인자 측정

L6 근육세포에서 western blot을 실시하여 CPE 처리가 glucose 유입을 조절하는 인자인 Akt와 GLUT4의 단백질 발현을 측정된 결과, control군 (1.07 ± 0.08)에 비해 양성 대조군인 insulin 처리군 (1.75 ± 0.15 ($p < 0.001$))은 Akt의 단백질 발현을 유의성 있게 증가시켰고 CPE 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 (1.68 ± 0.12 ($p < 0.001$))과 CPE 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 ($1.91 \pm$

0.13 ($p < 0.001$)) 또한 농도 의존적으로 유의성 있는 증가를 나타냈다. GLUT4의 단백질 발현을 측정된 결과, control군 (1.09 ± 0.12)에 비하여 양성 대조군인 insulin 처리군 (1.99 ± 0.14 ($p < 0.001$))은 GLUT4의 단백질 발현을 유의성 있게 증가시켰고 CPE 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 (1.86 ± 0.19 ($p < 0.001$))과 CPE 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 (2.12 ± 0.16 ($p < 0.001$)) 또한 농도 의존적으로 유의성 있는 증가를 나타냈다 (Fig. 5).

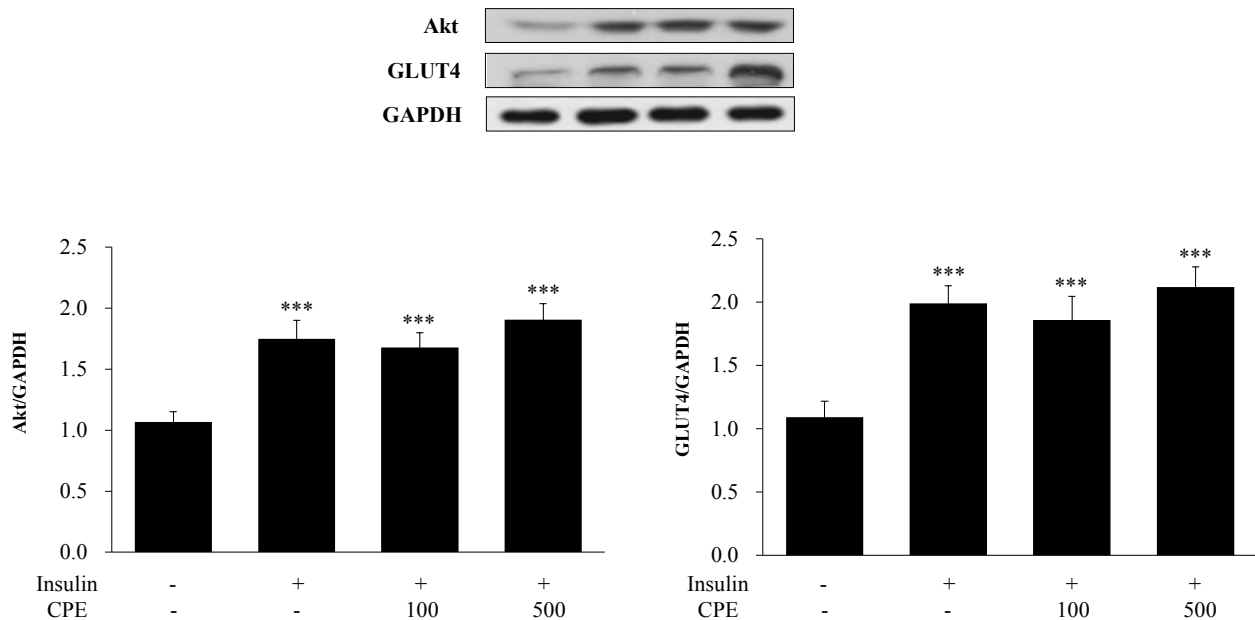


Fig. 5. Expression of glucose-related western blotting protein in L6 muscle cell. Phosphorylation of serine / threonine-specific protein kinase (Akt), glucose transporter 4 (GLUT4). The data were expressed as the mean \pm SD. (n=3) from three independent experiments (***) $p < 0.001$.

IV. 고찰

현대사회는 생활환경과 서구화된 식생활로 인해 대사성 질환이 급격하게 증가하고 있다¹³. 대사성 질환의 대표적인 질병 중 하나인 당뇨병은 제1형 당뇨병과 제2형 당뇨병으로 나누어지는데 약 90% 정도가 제2형 당뇨병이며, 인슐린 작용이 원활하지 않아 발병하여 당 대사의 이상을 초래한다¹⁴.

당뇨병의 대표적인 치료법으로는 약물치료가 있는데, 현재 시판되는 약들은 약물복용에 따른 내성 및 독성 등 많은 부작용들이 발표되어 지고 있다. 당뇨병은 항산화 작용과 밀접한 관계가 있으며 천연 소재에 대한 항당뇨 및 항산화 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁵⁻¹⁶.

성숙한 골의 파괴를 알려진 陳皮는 고혈압 예방 효과¹⁷, 순환계 질환의 예방 및 개선효과¹⁸, 혈중 저밀도 지질단백질 콜레스테롤 함량 감소¹⁹ 등 다양한 연구가 진행되고 있다. 陳皮는 L6 근육세포에서 당 대사에 관여하는 유사 실험이 보고되어진 바 없기에, 본 연구에서는 *in vitro* 항산화 활성 측정 및 CPE를 처리하여 L6 근육세포 내 인슐린 신호전달과 관련된 유전자 발현에 대해 평가 하였다.

본 연구에서는 陳皮를 열수 추출하여 DPPH, ABTS 자유 라디칼 소거능과 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량을 평가 하였다. 천연물에서 분리한 폴리페놀과 플라보노이드 화합물들은 항산화 활성을 판단하는데 있어서 매우 중요한 지표이다²⁰. 실험 결과, CPE의 DPPH 자유 라디칼 소거능 IC_{50} 값은 249.33 ± 1.38 $\mu\text{g/ml}$, ABTS 자유 라디칼 소거능 IC_{50} 값은 204.33 ± 1.44 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타났으며, 총 폴리 페놀함량은 48.14 ± 0.34 mg/g, 총 플라보노이드 함량은 36.17 ± 0.52 mg/g으로 높은 항산화 활성을 확인하였다.

Akt 경로는 세포 내에서 Glucose uptake를 증가시키는 신호 전달 경로 중 하나인데, 인슐린 수용체에 인슐린이 결합되면 IRS는 인산화 되고 PIK3R의 활성화하여 Akt의 인산화를 유도 한다. 인산화된 Akt는 GLUT4를 세포막으로 이동시켜 당을 세포 내로 이동 시킨다²¹. L6 근육세포에서 CPE는 인슐린 신호 전달 관련 mRNA 발현을 유의성은 없으나 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈다.

Akt는 GLUT4와 복잡한 경로에 있고 Akt의 활성화 경로는 여러 신호전달체계와 연결 되어져 있다. Akt는 인슐린의 조절을 통해 지방, 근육, 간 등에서 중요한 역할로 알려져 있다²².

Western blotting을 통해 L6 근육세포에서 Akt의 단백질 발현을 측정 한 결과, 대조 세포에 비해 CPE 처리 세포는 모두 농도 의존적으로 유의성 ($p < 0.001$) 있는 Akt의 증가를 나타냈다. GLUT4의 발현은 인슐린과 관련된 중요한 역할로 알려져 있다²³⁾. 포도당 수송체인 GLUT4는 인슐린에 의해 세포막으로 이동되며 혈액 속 당을 세포 내로 유입시키는 작용을 하며 골격근 등에 분포하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. Western blotting을 통해 L6 근육세포에서 GLUT4의 단백질 발현을 측정 한 결과, 대조 세포에 비해 CPE 처리 세포는 모두 농도 의존적으로 유의성 ($p < 0.001$) 있는 GLUT4의 증가를 나타냈다. GLUT4의 발현을 증가시켜 세포 내의 증가된 당의 유입으로 혈당저하 효과가 있음으로 판단된다.

본 논문의 실험 결과를 종합하여 보면 陳皮 물 추출물은 높은 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었고, 이를 이용하여 L6 근육세포에서 glucose 유입을 조절하는 인자들인 IRS-1, PI3KR, Akt, GLUT4의 mRNA 발현을 확인한 결과 유의적이지 않지만 증가시키는 경향을 나타냈으며, Akt와 GLUT4의 단백질 발현량은 유의적으로 증가시킴으로써 혈당저하효과가 있는 것으로 판단된다. 또한 높은 항산화 활성을 나타낸 陳皮 추출물은 인슐린저항성과 관련이 깊은 대사성 질환에 개선효과를 기대할 수 있을 것으로 사료되는 바이다.

V. 결 론

본 논문에서는 陳皮의 높은 항산화 효과를 확인하였으며 L6 근육세포에서 당대사와 관련된 인자를 분석하였고 그 결과는 다음과 같다.

1. 陳皮 추출물은 자유라디칼 소거능, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높게 나타나 높은 항산화 활성을 보였다.
2. 陳皮를 L6 근육세포에서 독성을 살펴본 결과, 가장 고농도인 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 80% 이상의 세포 생존률을 나타내 세포독성이 없음을 확인 하였다.
3. L6 근육세포에서 陳皮 추출물을 처리하여 당대사와 관련된 유전자의 mRNA 발현량 분석한 결과 IRS-1, PI3KR, Akt, GLUT4 각각 陳皮 추출물 처리가 농도 의존적으로 유의성은 없으나 증가하는 경향을 나타냈다.
4. L6 근육세포에서 陳皮를 처리하여 대사와 관련된 유전자의 단백질 발현량 분석한 결과, Akt, GLUT4 각각 陳皮 추출물 처리 모든 농도에서 농도 의존적으로 유의성 있는 증가를 나타냈다.

위와 같은 결과를 종합하여 보았을 때 陳皮는 우수한 항산화 활성을 가지고 있고, 인슐린저항성과 관련이 깊은 인자들을 긍정적으로 확인하였으며, 이와 관련하여 추후 연구가 진행되어 당 대사와 관련된 기능성 천연 소재로서의 가치가 충분하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구결과는 2017년도 농림축산식품부에서 시행한 창업벤처지원 R&D 바우처 사업 (117008-1)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Task Force Team For Basic Statistical Study of Korean Diabetes Mellitus, Report of task force team for basic statistical study of Korean diabetes mellitus: diabetes in Korea 1st ed, Seoul: Goldfishery; 2007 : 1-57.
2. Lee SY, Park SL, Nam YD, Yi SH, Lim SI. Anti-diabetic effects of fermented green tea in KK-A y diabetic mice. Korean J Food Sci Technol. 2013 ; 45(4) : 488-94.
3. Kang DH, Khil LY, Park KS, Lee BH, Moon CK. Effects of Cadmium on Glucose Transport in L6 Myocytes. J ENVIRON TOXICOL, 2005 ; 20(1) : 75-85.
4. Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Youm JK, Lee HS, Moon JY. (1996) A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. Korean J Seric Sci, 1996 ; 38 : 100-7.
5. Kim JO, Lee GD. Hypoglycemic Effects of a Medicinal Herb Mixture Prepared through the Traditional Antidiabetic Prescription. Korean J Food Preserv. 2011 ; 18(6) : 923-9.
6. Lee JS, Do EJ, Kwak MA, Park HJ, Ha DI, Sung KJ, Kim MR. Clinical Trial to Evaluate the Efficacy of Extract of Citri Pericarpium on Serum Lipid Profiles in Subjects: a Randomized, Double-blind. Kor. J. Herbology. 2011 ; 26(1) : 125-132.
7. Jo HK, Han MH, Hong SH, Choi YH, and Park C. Ethanol Extracts of Citrus Peel Inhibits Adipogenesis through AMPK Signaling Pathway in 3T3-L1 Preadipocytes. Journal of Life Science. 2015 ; 25(3) : 285-92.
8. Park CH, Jung HK, Jeong YS, Hong JH, Lee GD, Park CD. Effects of Citrus Peel Ethanol Extract on the Serum Lipid and Body Fat of High-fat-diet-fed Rats. Korean J Food Prserv. 2011 ; 18(4) : 567-74.
9. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 1958 ; 181(4617) : 1199-200.
10. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine. 1999 ; 26(9) : 1231-7.
11. Folin O, Denis W. On phosphotungsticphosphomolybdic compounds as color reagent. Journal of biological chemistry. 1912 ; 12(2) : 239-43.

12. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JR. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *Journal of the science of food and agriculture*. 1994 ; 64(2) : 155–61.
13. Lim SH, Baik IK, Lee HS, Lee YJ, Chung NS, Jho SY, Kim SS. Effects of the life style in patients with coronary artery disease on the serum lipid concentrations and atherosclerotic coronary lesion. *Korean J Lipidology*. 1995 ; 5(1) : 71–83.
14. Choe M, Dae-Jung Kim DJ, Lee HJ, You JK, Seo DJ, Lee JH, and Chung MJ. A Study on the Glucose-regulating Enzymes and Antioxidant Activities of Water Extracts from Medicinal Herbs. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2008 ; 37(5) : 542–7.
15. Braunwald, E., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Halsey, S. L., Longo, D. L. and Jameson, J. L. 2011. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2011 ; 342 : 2109–37.
16. Matough, F. A., Budin, S. B., Hamid, Z. A., Alwahaibi, N. and Mohamed, J. The role of oxidative stress and antioxidant in diabetic complications. *Squ Med J*. 2012 ; 12(1) : 5–18.
17. Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS. Isolation, purification and hypotensive effects of bioflavonoids in *Citrus sinensis*. *J Korean Soc Food Nutr* 1992 ; 21 : 136–42.
18. Monforte MT, Trovato A, Kirjavaniien S, Forestieri AM, Galati EMI, Curto RB. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Famco* 1995 ; 50 : 595–9.
19. Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and acyl CoA cholesterol transferase are lower in rat fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr*. 1999 ; 129(6) : 1182–5.
20. Nakgawa T, Yokozawa T, Kim YA, Kang KS, Tanaka T. Activity of wen-pi-tang, and purified constituents of rhei rhizome and glycyrrhizae radix against glucose-mediated protein damage. *Am. J. Chin. Med*. 2005 ; 33(5) : 817–29.
21. Kim SM, Lee YM, Kim MJ, Nam SY, Kim SH and Jang HH. Effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb. Water Extract on α -Glucosidase Inhibition and Glucose Uptake in C2C12 Skeletal Muscle Cells. *Korean J. Food & Nutr*. 2013 ; 26(4) : 806–13.
22. Tan SX, Ng Y, Meoli CC, Kumar A, Khoo PS, Fazakerley DJ, Junutula JR, Vali S, James DE, Stockli J. Amplification and demultiplexing in insulin-regulated Akt protein kinase pathway in adipocytes. *J Biol Chem*. 2012 ; 287 : 6128–38.
23. Kahn SE. Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001 ; 86(9) : 4047–58.
24. Jeon SY, Park JY, Kim SO, Lee ES, Koo JS, Kim MR. Water Extract of Fermented New Korean Medicinal Mixture (F-MAPC) Controls Intracellular Adipogenesis and Glut-4 dependent Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes and L6 Myoblasts. *Kor. J. Herbology* 2014 ; 29(1) : 45–52.