



Caulerpa okamurae ethanol extract improves the glucose metabolism and insulin sensitivity *in vitro* and *in vivo*

Chul-Min Park^{1,3} · Laxmi Sen Thakuri¹ · Dong-Young Rhyu^{1,2}

옥덩굴 에탄올 추출물의 당 대사 및 인슐린 민감성 개선효과

박철민^{1,3} · 타쿠리렉스미센¹ · 류동영^{1,2}

Received: 19 February 2021 / Accepted: 23 February 2021 / Published Online: 31 March 2021
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2021

Abstract The aim of this study is to examine the effect of *Caulerpa okamurae* ethanol extract (COE) on glucose metabolism and insulin sensitivity as one of the drug targets for treatment of type2 diabetes. COE significantly inhibited protein tyrosine phosphatase (PTP1B) and dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) enzyme activities *in vitro* assay. Also, COE significantly enhanced the glucose uptake and the expression of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and glucose transporter4 (GLUT4) proteins in 3T3-L1 adipocytes or zebrafish larvae compared with control. In dexamethasone-induced resistance model of L6 myotubes, the protein expression of insulin signaling and glucose uptake was effectively increased by the treatment of COE. In contrast, the elevated phosphorylation of IRS-1 Ser307 was normally suppressed by treatment of COE. However, COE had no effect on insulin secretion in pancreatic beta cells. Thus, our results suggest that COE improves the glucose metabolism and insulin sensitivity through the regulation of insulin signaling and GLUT4 protein in insulin's target cells and zebrafish larvae.

Keywords *Caulerpa okamurae* · Insulin sensitivity · L6 myotubes · 3T3-L1 adipocytes · Type2 diabetes · Zebrafish larvae

서론

제2형 당뇨병은 현대인의 운동부족, 식생활습관, 과체중 등의 원인으로 발생하는 것으로 여기지만 아직까지 정확한 이유는 알려져 있지 않다[1]. 하지만 고혈당(hyperglycemia), 인슐린저항성(insulin resistance) 및 상대적인 인슐린 부족을 특징으로 하는 당뇨병의 한 형태이다[2]. 췌장베타세포의 인슐린 분비는 혈장 포도당 농도 반응의 변화에 따른 신호전달 경로에 의해 조절되거나 장 점막의 인크레틴(incrutin) 호르몬의 활성화에 의해 조절되어진다[3,4]. 그리고 분비된 인슐린의 포도당 대사효과는 표적 조직(target tissue)에 따라 다르게 작용되는데 근육과 지방에서는 인슐린 신호전달(insulin signaling) 경로와 당 수송체(glucose transporter)의 활성화를 통해 세포내로 당 흡수(glucose uptake)를 촉진시킨다[5,6]. 또한, 인슐린은 간조직의 포도당 흡수에도 관여하지만 주로 당 신생을 억제하여 혈중 포도당 농도를 조절한다[7]. 현재 임상에서 사용되고 있는 경구용 혈당강화제는 인크레틴 호르몬 분해 억제제, 인슐린분비 촉진제, 인슐린 저항성 개선제, 포도당 생성 억제제, 포도당 재흡수 억제제로 구분되며 단독 또는 병합요법으로 이용되지만 저혈당 위험, 체중증가, 심혈관질환 등이 발생할 수 있으므로 체내 당대사와 인슐린민감성을 개선시키면서 부작용의 위험성이 적은 효율적인 천연자원 소재의 개발이 요구되고 있다[8-10].

옥덩굴류(*Caulerpa*)는 청각목(Codiales)에 속하는 녹조류(green algae)로서 전 세계적으로 20여종 이상 알려져 있으나 우리나라에는 *Caulerpa okamurae* 한 종만이 서식하고 있는 것으로 알려져 있다[11]. 바다의 포도로 일컫는 *C. lentillifera*는 신선한

Young Rhyu (✉)
E-mail: rhyudy@mokpo.ac.kr

¹Department of Nutraceutical Resources and Institute of Korean Medicine Industry, Mokpo National University, Muan-gun 58554, Republic of Korea

²Department of Biomedicine, Health & Life Convergence Sciences, BK21 FOUR, Mokpo National University, Muan-gun 58554, Republic of Korea

³Inhalation Toxicity Research Group, Korea Institute of Toxicology, Jeongup 56212, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

샐러드의 식재료로 활용되므로 일본, 필리핀, 베트남 등에서 양식되고 있다[12]. 미래의 식량자원 또는 식·의약품 바이오소재 개발을 목적으로 옥텅굴류 생리활성 또는 유효 성분에 관한 연구는 아직까지 미비한 수준이다. 현재까지 중금속 또는 오염물질의 제거, 항산화, 세포의 응집과 기능 활성화 물질인 렉틴(lectin) 성분의 항염증 효과에 관한 논문이 보고된 바 있다[12-14]. 본 연구이전에 우리는 *in vitro*, 세포실험계, 전임상 동물실험 모델을 이용하여 옥텅굴류 중에서 국내에 서식하는 *C. okamurae*와 국외 양식종 *C. lentillifera* 추출물의 대사성질환을 개선시킬 수 있는 약리작용기전을 분석한 결과, *C. okamurae* 추출물은 지질대사 그리고 *C. lentillifera* 추출물은 당 대사에 특이적인 효과를 발현하는 것으로 보고한 바 있다[15,16]. 본 연구에서는 *C. okamurae* 추출물이 지질 대사 이외에 포도당 대사효과에도 유용한지를 평가하여 제2형 당뇨병 치료 약물의 부작용 중 하나인 체중 증가 개선에 도움을 주는 유용한 천연자원 소재임을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

Insulin, 4-nitrophenyl phosphate bis(cyclohexyl-ammonium) salt (NPP), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), bovine serum albumin, Oil Red O, 2-mercaptoethanol, anti- β -actin antibody, insulin, dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), newborn calf serum (FCS), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin은 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxyglucose (2-NBDG)는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였고, Gly-Pro-AMC은 Ana Spec, Inc. (San Jose, CA, USA)로부터 구입하였고, interleukin (IL)-1 β 와 interferon (IFN)- γ 은 R&D (Minneapolis, MN, USA), rat insulin kit은 Mercodia Developing Diagnostics (Mercodia, Uppsala, Sweden)로부터 구입하였다. Glucose Transporter Type 4 (GLUT4) primary antibody와 secondary antibody (anti-rabbit, anti-mouse)는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였고, p-IRS1 (insulin receptor substrate 1), IRS1, p-IRS1 (ser 307), p-AKT (protein kinase B, PKB), AKT, p-AMPK (5' AMP-activated protein kinase), AMPK primary antibody는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Nitrocellulose membrane은 Bio-rad사(서울, 한국)에서 구입하였고, 시약 및 용매는 특급 또는 1급 시약을 사용하였다.

추출물 제조

전남 진도군 연안에서 채취한 옥텅굴(*C. okamurae*)은 목포대학교 해양수산자원학과 박찬선교수에 의해 동정 또는 확인되었다. 수집된 옥텅굴은 15°C 정도의 정수기 물로 약 1-2시간 담그어 놓았다가 염분을 제거시키는 과정을 반복하여 염분을 완전히 제거시켰다. 그런 다음에 100% EtOH을 첨가하여 추출하는 과정

을 반복한 후 추출액을 여과하고 진공하에서 회전감압농축기로 농축시켰다. 그 후에 동결건조기를 이용해 동결건조시킨 파우더를 밀폐용기에 보관하면서 실험에 이용하였다. 옥텅굴 에탄올 추출물의 수율은 1.16%이고, COE로 표기하였다.

Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) 및 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 효소 활성

DPP-IV 효소 활성 억제능은 다음과 같은 조건에서 측정되었다. Black 96-well plate의 각 well에 mouse serum 10 μ L, COE 추출물 25 μ L, 50 μ M Gly-Pro-AMC 25 μ L를 넣고 60분 동안 37°C에서 반응시킨다. 1시간 후 반응 정지 시약인 3 M acetic acid를 70 μ L씩 첨가하고 VICTOR™ Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, MA, USA)의 excitation 370 nm, emission 440 nm에서 형광을 측정하였다.

PTP1B 효소 활성 억제능은 p-NPP를 기질로 이용하여 탈인산화 정도를 측정하여 판단하였다. PTP1B (0.05 μ g/ μ L) 용액, 20 mM p-NPP (0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM citrate, pH 6.0, 1 mM DTT) 용액 및 COE 추출물을 첨가시키고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 10 N NaOH 10 μ L를 첨가하여 반응을 종결시킨 다음에 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포배양 및 분화유도

실험에 사용된 모든 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC; USA)으로부터 분양 받았다. RIN-m5F 췌장베타세포와 L6 근육세포는 5% CO₂, 37°C 배양기에서 100 Units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 2.5 μ g/mL amphotericin B, 10% FBS가 함유된 RPMI1640 또는 DMEM 배지 조건에서 배양되었고, 3T3-L1 지방전구세포는 동일한 배양조건의 10% FCS가 함유된 DMEM 배지 조건에서 배양되었다. 모든 세포주는 2일마다 신선한 배지로 보충하면서 계대배양하여 실험에 사용하였다.

3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 분화시키기 위하여 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하고 100% confluent 상태가 되면 분화유도 물질인 5 μ g/mL insulin, 1 μ M DEX, 0.5 mM IBMX와 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 교환하며 분화를 유도였으며, 2일 후 5 μ g/mL insulin이 포함된 DMEM (10% FBS)배지로 교환하였다. 이로부터 2일 간격으로 DMEM (10% FBS)배지로 보충하면서 4일 후 실험에 이용하였다. L6 근육세포는 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 배양한 후에 80-90% confluent 상태가 되면 분화유도 하기 위하여 4-5일 동안 2% FBS 함유 DMEM 배지로 교환한다. 그런 다음에 myotube가 형성되면 실험에 이용하였다.

세포독성

3T3-L1 지방전구세포는 96-well plate에 1×10^3 과 5×10^3 cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 그 다음에 COE 추출물을 첨가하고 다시 24 또는 48시간 배양하였다. RIN-m5F 췌장 베타세포는 96-well plate에 well 당 1×10^5 씩 분주하고 12시간 동안 배양시킨 후 3시간 동안 COE 추출물로 노출시키고 IL-1 β (2 ng/mL)와 IFN- γ (100 U/mL) 물질을 첨가하여 다시 48시간 동안 배양하였다. 실험이 종료되면 MTT (1 mg/mL) 용액을 각 well에 200 μ L씩 첨가하

고 4시간 동안 반응시켰다. MTT 용액을 제거하고 각 well에 DMSO 넣고 10분 후에 540 nm (Immuno Mini NJ-2300)에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 control 값에 대한 비율로 계산하였다. L6 근육세포는 96-well plate에 5×10^3 cells/well로 분주하고 분화유도 후 0.5 μM DEX을 24시간 동안 첨가하였다. 그런 다음 COE 추출물을 넣고 24시간 배양시키고 cell counting Kit-8 (Dojindo Laboratory, Kumamoto, Japan) 용액으로 2시간 반응시킨 후 450 nm (Immuno Mini NJ-2300)에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 control 값에 대한 비율로 계산하였다.

인슐린 함량

RIN-m5F 췌장베타세포를 24-well plate에 2×10^5 cells/well로 분주한 후에 IL-1 β (2 ng/mL), IFN- γ (100 U/mL), COE 추출물을 첨가하고 48시간 동안 반응시킨다. 그런 다음에 세포배양액에 분비된 인슐린 함량은 Rat Inulin ELISA Kit를 이용하여 정량화 한다.

Glucose uptake

3T3-L1 지방세포의 인슐린민감성 향상으로 인한 세포내 포도당 섭취 정도를 측정하기 위하여 3T3-L1 지방전구세포는 1×10^4 cells/well 및 L6 근육세포는 5×10^3 cells/well로 black 96-well plate에 분주하고 배양하였다. 분화유도를 시작하는 0일째부터 COE 추출물을 처리한 후 실험이 종료된 시점에 배지를 제거하고 2-NBDG 용액을 3T3-L1 지방세포에는 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, L6 근육세포에는 80 μM 농도로 첨가하였다. 30분 후에 PBS로 2회 세척하고 VICTOR3™ Multilabel Counter (PerkinElmer, MA, Boston, USA)의 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 형광을 측정하여 control 값에 대한 비율로 계산하였다.

Western blot

실험이 종료된 세포를 PBS 용액으로 2회 세척한 후 lysis buffer (PRO-PREP protein extraction solution, 인트론바이오 테크놀로지, 서울, 한국)를 넣고 4°C에서 10분간 용해시킨다. 세포를 수거하여 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 회수하여 단백질을 정량하였다. 각각의 상층액에서 단백질을 30 μg 를 취하여 SDS loading buffer (60 mM Tris, 25% glycerol, 2% SDS, 0.5% 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 혼합 후 10% SDS polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 이후에 membrane은 5% 무지분유가 첨가된 TTBS (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% tween 20) 용액에 넣고 상온에서 1시간 동안 blocking 시킨다. TTBS 용액으로 10분간 3회 세척한 후 일차 항체(p-IRS1, IRS1, p-AKT, AKT, GLUT4, p-AMPK, AMPK 1:1000)로 2시간 동안 반응시킨 다음에 다시 TTBS 용액으로 3회 세척하였다. 그 다음에 peroxidase가 포함된 2차항체(goat anti mouse 1:2000, goat anti rabbit 1:2000)로 1시간 동안 반응시켰고 항체의 검출은 chemiluminescent substrate 용액을 이용하여 가시화하고 UVP (Image acquisition and analysis software, Visionwork™LS)로 분석하였다. 단백질 발현의 결과는 각각의 total 단백질 및 β -actin으로 비교 정량화하였다.

제브라피쉬 사육 및 당 흡수능

서울과학기술대학교 환경독성보건연구실로부터 분양 받은 wild type의 성체 zebrafish는 14 h light/10h darkness의 cycle 주기, 28°C 수온과 pH 7.0을 유지하면서 순환하는 여과 시스템 (Zebtec Stand Alone, Italy)의 수조에 10-15마리 정도 넣은 후 제브라피쉬용 먹이 Gemma Micro ZF 300 (Skretting Zebrafish; Tooele, UT, USA)를 하루에 3번 주면서 사육하였다. Embryo 채취는 성체 zebrafish 암수를 실험 24시간 이전에 embryo 채취용 수조에 넣고 다음날 광주기 시작 2시간 이내에 embryo를 채취하였다. 채취된 embryo는 수정 후 약 6 hpf (hours post-fertilization) 일 때 96-well plate 각각의 well에 200 μL 의 E2 배지(zebrafish embryo medium)를 넣은 후 well당 1마리의 embryo를 옮긴 후 7 dpf (day post-fertilization)까지 성장시켰다. Zebrafish larvae에 COE 추출물을 24시간 동안 노출시킨 후 생존율과 기형 정도를 관찰하였다. 당 섭취능도 동일한 조건에서 실험을 진행한 후, well당 600 μM 2-NBDG 용액을 3시간 동안 노출시킨 후 E2 배지를 이용하여 3번 정도 세척한 다음에 COE 추출물을 노출시킨 다음에 디지털 카메라가 장착된 형광현미경(Leica, Wetzlar, Germany)으로 관찰하고 촬영하였다. Zebrafish larvae의 형광 강도는 ImageJ program을 사용하여 정량화하였다.

통계 분석

모든 실험결과는 3회 이상 반복하였으며, 평균 \pm 표준오차(standard error, SE)로 표현하였다. 각 군 간의 차이는 Graphpad Prism의 One way-ANOVA (analysis of variance) 처리 후 사후검정은 Dunnett's test를 이용하였으며, $p < 0.05$ 수준에서 유의성 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

COE의 DPP-IV와 PTP1B 효소 활성 억제효과

음식을 섭취하게 되면 위장관의 혈당 조절 호르몬인 glucagon-like peptide-1 (GLP-1)가 분비되어 췌장 베타세포의 증식 및 인슐린 분비능을 촉진시켜 혈중의 포도당 농도를 조절한다[17]. 하지만 GLP-1 같은 호르몬의 반감기는 2분 정도로 매우 짧으며 이를 분해하는 효소가 바로 DPP-IV이다[18]. DPP-4 억제제는 포도당 농도에 비례하여 인슐린 분비를 증가시키고 2형 당뇨병의 근본적인 병인인 췌장 베타세포의 기능 저하를 개선시킬 수 있는 약물이다. COE 추출물은 시료를 첨가하지 않는 대조군에 비해 DPP-IV 효소 활성 억제효과를 유의적으로 나타냈으며, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 DPP-IV 활성이 20% 정도 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 1A).

췌장에서 분비된 인슐린은 인슐린 수용체(insulin receptor, IR)와 결합하면 인슐린 수용체 기질 1 (IRS-1)의 타이로신(tyrosine) 잔기 인산화가 증가되고 인슐린 신호전달이 활성화되어 당 수송체 GLUT4 단백을 세포막으로 유도하여 혈중 포도당을 세포 내로 흡수시켜 혈중 포도당 농도를 조절한다[19-21]. PTP1B는 인슐린 신호전달기작에서 IR 및 IRS-1의 타이로신 잔기 인산화

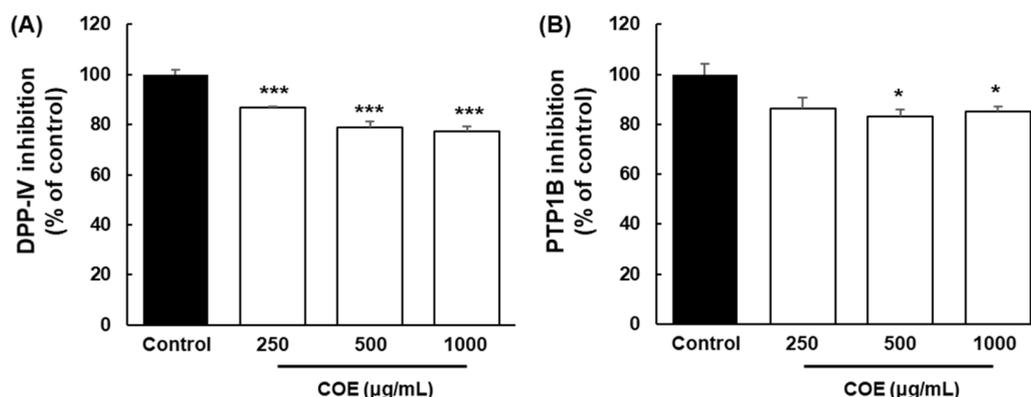


Fig. 1 Effect of COE on DPP-IV (A) and PTP1B (B) enzyme activities. Data displayed reflect the mean SE (n=6) of the three independent experiments and analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus control

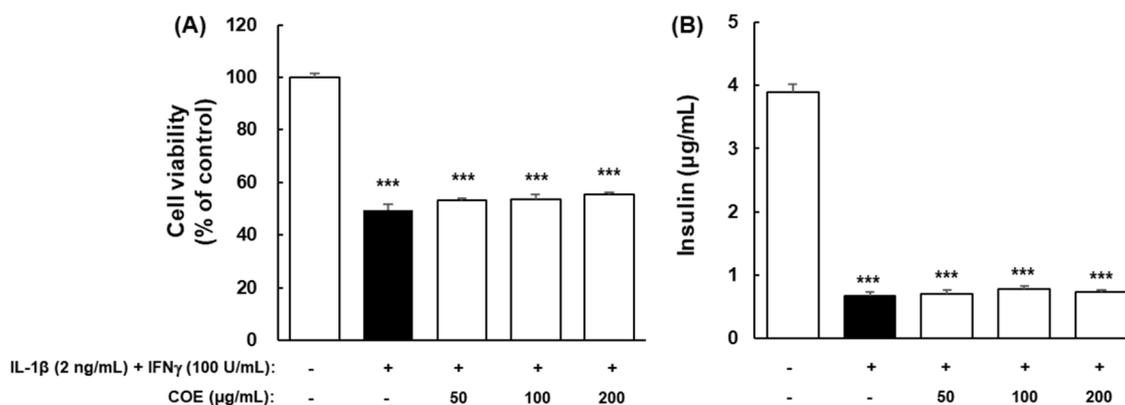


Fig. 2 Effect of COE on cell viability (A) and insulin secretion (B) in RIN-m5F pancreatic beta cells. RIN-m5F cells (1×10^5 or 2×10^5) cultured in 96- or 6-well plates were treated with the indicated concentration of COE for 3 h, followed by stimulation with IL-1 β (2 ng/mL) and IFN γ (100 U/mL) for 48 h. Cell viability was determined using MTT assay and insulin secretion in the culture medium was measured using rat insulin ELISA kit. Data displayed reflect the mean \pm SE (n=6) of the three independent experiments and analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus normal (without treatment)

반응을 방해하여 인슐린의 신호전달 반응을 억제시키므로 제2형 당뇨병 치료제 개발의 타겟기전으로 알려져 있다[22,23]. COE 추출물은 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 PTP1B 효소 활성을 감소시키는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의적인 감소 효과를 보이지 않았다(Fig. 1B). 결론적으로 COE 추출물은 DPP-IV와 PTP1B 효소 활성 억제효과를 통해 혈중 포도당 농도를 조절할 수 있는 작용기전을 지닌 천연소재라고 여겨진다.

COE의 RIN-m5F 췌장베타세포의 사이토카인에 의한 세포독성 감소 및 인슐린 분비 조절효과

제2형 당뇨병이 진행되는 동안 당 독성과 만성염증으로 인해 췌장 베타세포의 기능이 지속적으로 저하되어 인슐린 분비기능이 감소된다[24]. 임상적으로 제2형 당뇨병 환자에게 인슐린민감성을 증가시키는 경구용 혈당강하제 로지글리타존(rosiglitazone)을 투여하면 베타세포 기능이 상당히 개선되는 것으로 보고된 바 있다[25]. 췌장 베타세포인 RIN-m5F 세포의 사이토카인(IL-1 β 2 ng/mL, IFN- γ 100 U/mL) 노출에 의한 세포독성을 측정 한 결과, 사이토카인 단독 첨가군의 세포생존율은 정상군에 비

해 50% 정도 감소되었다(Fig. 2A). 사이토카인에 COE 추출물을 함께 처리한 경우의 세포생존율은 사이토카인 단독 처리군에 비해 약간 증가하는 경향을 보이지만 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 2A). 사이토카인 노출에 의해 감소된 인슐린 분비량은 COE 추출물을 첨가하여도 아무런 변화를 보이지 않았다(Fig. 2B). COE 추출물은 2형당뇨의 만성 염증반응에 따른 췌장 베타세포의 사멸기전을 미비하게 억제시키지만 인슐린 분비 촉진 효과에는 아무런 영향을 미치는 않는 것으로 확인되었다.

COE의 3T3-L1 지방세포에서의 당 흡수 및 인슐린 신호전달 단백질 발현 증가 효과

인슐린 표적세포인 지방세포에서 인슐린은 포도당과 유리 지방산 흡수를 자극하고 지방분해를 감소시키며 sterol regulatory element-binding protein-1c 및 peroxisome proliferator-activated receptor γ 를 포함한 다양한 전사인자의 유전자 발현을 향상시켜 지방세포의 분화 및 인슐린 감수성을 증가시킨다[26,27]. 김소희 등은 황백추출물이 3T3-L1 지방세포에서 인슐린 신호전달 phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 인산화 및 당 수송체

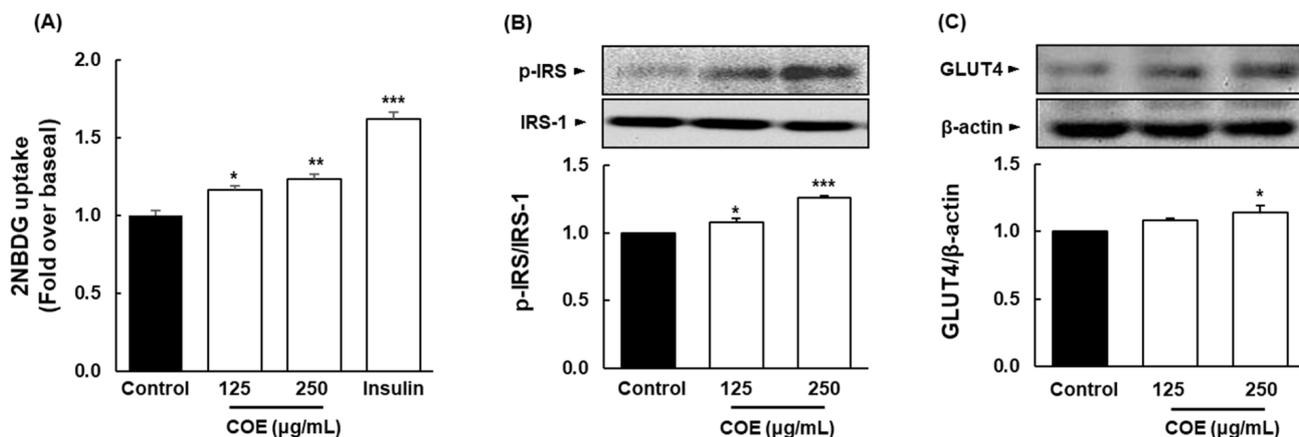


Fig. 3 Effect of COE on glucose uptake (A) and protein expression of p-IRS (B) and GLUT4 (C) in 3T3-L1 adipocytes. Confluent 3T3-L1 preadipocytes were differentiated into adipocytes for 6 days (from day 0 to day 6). Fully differentiated 3T3-L1 adipocytes were treated with COE for 24 h followed by treatment with or without 2-NBDG, a fluorescent derivative of glucose as a glucose analogue for 30 min. Glucose uptake was measured using fluorescence reader. The expression of GLUT4 was determined using western blot techniques. Insulin (100 nM) was used as a positive control. Data displayed reflect the mean ± SE (n = 6) of the three independent experiments and analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett’s test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 versus control

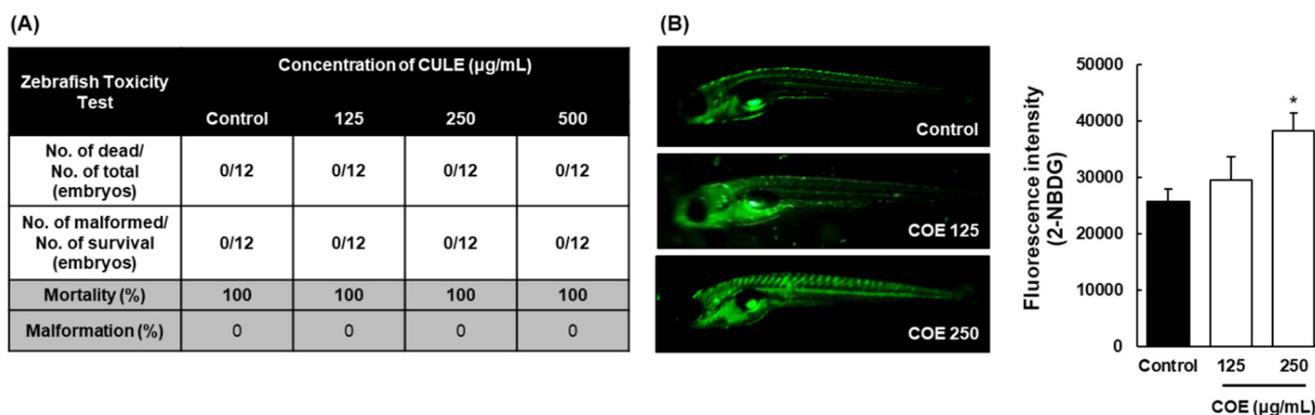


Fig. 4 Effect of COE on mortality and malformation (A) and glucose uptake (B) of zebrafish larvae. The fertilized eggs were collected and placed in 96-well culture plates. After 7 dpf, the larvae were treated with COE (125, 250, and 500 µg/mL) and 2-NBDG (600 µM) for 12 or 24 hpf, and then the mortality and malformation were observed. Whole-larvae images were detected by fluorescence microscope. Green color is the signal of fluorescence. Data are presented as the mean ± standard error of the three independent experiments and analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett’s test. Magnification is 80. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 versus control

GLUT4 활성화를 통해 당 흡수를 촉진시키는 것으로 보고한 바 있다[28]. COE 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 500 µg/mL 농도까지는 세포독성을 나타내지 않았다. 3T3-L1 지방세포에서 COE 추출물(125와 250 µg/mL)은 인슐린 수용체 기질 IRS의 인산화 활성화와 당 수송체 GLUT4의 전이를 증가시켜 당 흡수를 매우 효과적으로 조절하는 것으로 확인되었다(Fig. 3). COE 추출물은 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 농도 의존적으로 당 흡수를 증가시켰으나 양성대조물인 인슐린(100 nM) 처리군에 비해서는 낮은 수치를 보였다(Fig. 3A). 또한, COE 추출물은 인슐린 수용체 기질의 타이로신 인산화 및 당 수송체 GLUT4의 발현을 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 유의적으로 향상시켰다(Fig. 3B와 C). 본 연구결과로 인하여 COE 추출물은 인슐린과 인슐린 수용체의 민감성 향상 및 당 수송체

단백의 전이를 증가시켜 지방세포내로 당 흡수를 개선시키므로 2형 당뇨의 당 대사 및 인슐린저항성 개선효과에 매우 유용한 천연소재라고 사료된다.

COE의 zebrafish larvae에서의 당 흡수 증가 효과

제브라피쉬(zebrafish, *Danio rerio*)는 잉어과에 속하는 열대어로서 척추동물의 특징을 갖고 있다. 제브라피쉬는 인간의 유전자와 매우 유사한 구조적 특징을 지니고 있기 때문에 당뇨병을 비롯한 대사질환의 병리학적 연구 및 치료 후보약물의 효능을 검증하는데 활용될 수 있는 동물모델이다[29,30]. Zebrafish larvae의 독성평가를 위해 수정 후 7 dpf (days post-fertilization) 일 때 COE 추출물을 125, 250, 500 µg/mL 농도로 24시간 동안 노출시켰으나 생존율과 기형현상은 관찰되지 않았다(Fig. 4A).

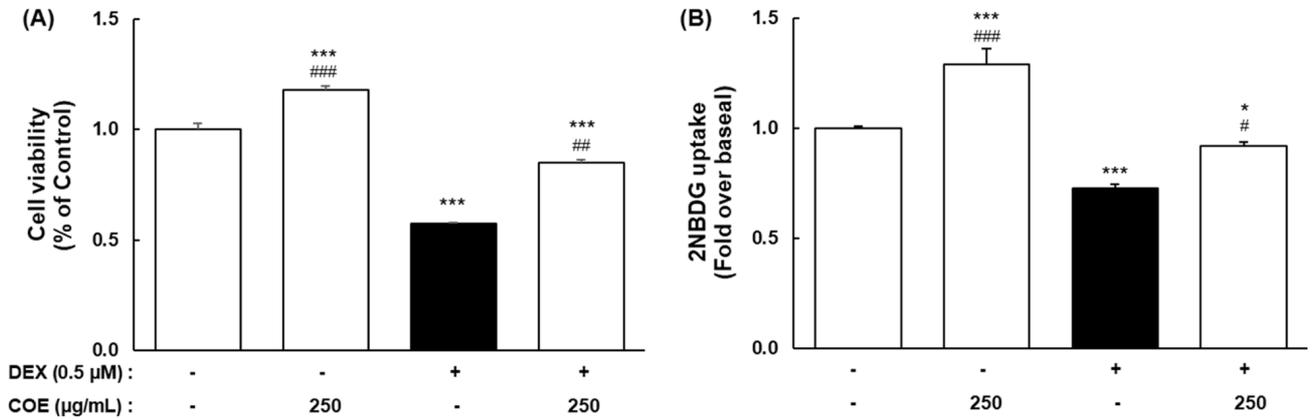


Fig. 5 Effect of COE on cell cytotoxicity (A) and glucose uptake (B) in L6 myotubes. L6 cells were induced to differentiate with 2% horse serum (HS) and treated as indicated. After 24 h exposure with 0.5 μM dexamethasone (DEX), L6 myotubes were further treated with or without 250 μg/mL of COE for 24 h. Cell viability was determined using WST assay at 450 nm and glucose uptake was measured using 2-NBDG. COE 250; addition to 250 μg/mL of COE, DEX 0.5; addition to 0.5 μM of dexamethasone. Data displayed reflect the mean ± SE (n=6) of the three independent experiments and analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett’s test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 versus normal (without treatment); #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 versus DEX

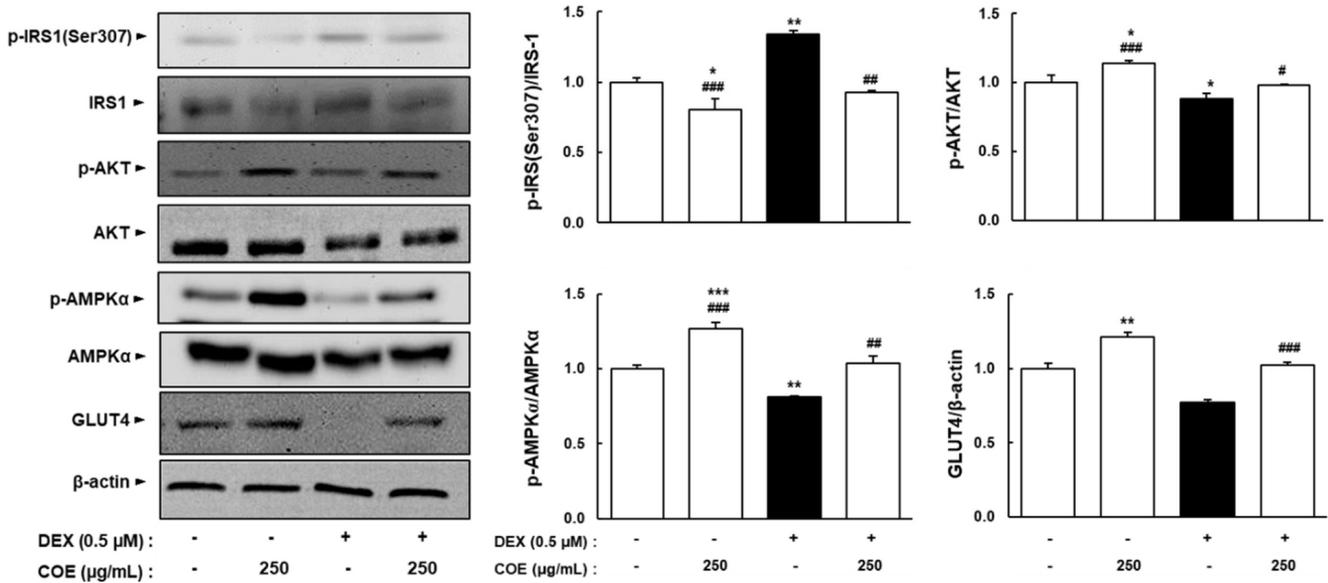


Fig. 6 Effects of COE on expression levels of various regulatory proteins in dexamethasone induced insulin resistance model of L6 myotubes. L6 cells were induced to differentiate with 2% horse serum and treated as indicated. After 24 h exposure with 0.5 μM dexamethasone (DEX), L6 myotubes were further treated with or without 250 μg/mL of COE for 24 h. COE 250; addition to 250 μg/mL of COE, DEX 0.5; addition to 0.5 μM of dexamethasone. Data are presented as the mean ± standard error (n=3) and analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett’s test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 versus normal (without treatment); #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 versus DEX

제브라피쉬 수정 후 7 dpf일째에 COE 추출물(125와 250 μg/mL)과 2-NBDG 물질을 함께 처리하였더니 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 당 흡수율이 뚜렷하게 증가되는 것으로 관찰되었다(Fig. 4B). 그러므로 COE 추출물은 세포실험 결과와 마찬가지로 제브라피쉬 동물실험에서도 혈액 내 포도당 대사의 항상성 조절기전에 기여하는 유용한 천연소재임이 증명되었다.

COE의 덱사메타손(dexamethasone) 유래 인슐린저항성 L6 근육세포에서의 당 흡수 및 인슐린 신호전달 단백질의 발현 증가 효과

인슐린저항성은 골격근, 지방세포 및 간과 같은 인슐린 표적조직에 인슐린 작용이 손상되었음을 의미하는데 골격근에서의 당 대사장에는 제2형 당뇨병의 대표적 특징이라 말할 수 있다

[31,32]. 인슐린저항성은 인슐린 수용체, 인슐린 수용체 기질 및 PI3K-AKT 인슐린 신호 전달의 활성을 감소시킴으로써 인슐린 매개 세포내 포도당 흡수를 감소시킨다[33]. Mo 등은 C2C12 근육세포와 마우스의 텍사메타손 유래 제2형 당뇨병모델에서 쿠마린(coumarins) 성분이 인슐린 신호전달 protein kinase B (AKT)와 당 수송체 GLUT4의 활성화, 생체 에너지와 당 대사 조절에 중요한 역할을 수행하는 AMPK의 활성도를 증가시켜 혈당을 개선시킨다고 보고한 바 있다[34]. 본 실험에서도 텍사메타손 유래 인슐린저항성 모델을 이용하여 COE 추출물의 인슐린저항성 개선 메커니즘을 분석하였다. L6 근육세포에 0.5 μM 텍사메타손 처리시 정상군에 비해 당 흡수와 세포생존율이 유의하게 감소되었으나 COE 추출물 첨가군에서는 이러한 증상이 유의하게 회복되어지는 것이 관찰되었다(Fig. 5). IRS-1 세린(serine) 잔기의 인산화는 인슐린 신호 전달을 감소시키므로 인슐린저항성이 유발되었음을 의미하는 기전이다. L6 근육세포의 텍사메타손 유래 인슐린저항성 모델에서 IRS-1 (Ser 307) 인산화가 촉진되었으나 COE 추출물(250 μg/mL) 첨가에 의해 유의하게 감소되었다(Fig. 6). 또한, 텍사메타손 노출에 의해 감소된 AKT, AMPK, GLUT4의 발현이 COE 추출물 첨가에 의해 유의하게 증가되는 것이 확인되었다(Fig. 6). 그러므로 COE 추출물은 인슐린 표적세포인 근육세포에서 인슐린 수용체, 인슐린 신호전달, 당 수송체 및 AMPK의 활성화를 통해 인슐린저항성을 개선시키고 당 흡수를 촉진시키는 것으로 확인되었다.

결론적으로 COE 추출물은 음식 섭취 후 상승된 혈중 포도당 농도를 조절하는데 관여하는 DPP-IV 효소의 활성을 감소시키고, 인슐린 표적세포인 지방과 근육세포에서 인슐린 신호전달 IRS-1과 AKT 활성화 및 AMPK 단백질 발현의 증가를 통해 당 수송체 GLUT4의 활성을 촉진시켜 당 대사를 조절하는 것으로 확인되었다. 이러한 COE 추출물의 당 대사 조절 효과는 제브라피쉬 실험에서도 동일한 결과로 나타났다. 그러나 2형 당뇨의 특징인 췌장 베타세포의 인슐린 분비 감소에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 볼 때 COE 추출물은 인슐린 민감성을 개선시켜 당 대사를 효율적으로 조절하는데 기여할 수 있는 건강기능식품 또는 의약품 개발의 유용한 천연소재라고 여겨진다.

초 록

이 연구의 목적은 *Caulerpa okamurae* 에탄올 추출물(COE)이 제2형 당뇨병 치료의 약물 표적 중 하나인 당 대사 및 인슐린 민감성에 미치는 영향을 평가하는 것이다. COE는 *in vitro* 실험에서 단백질 티로신 포스타제 1B (PTP1B)와 디펩티딜 펩티데이즈-IV (DPP-IV) 효소 활성을 유의하게 억제시켰다. 또한, COE는 3T3-L1 지방세포와 제브라피쉬에서 당 흡수, 인슐린 수용체 기질(IRS-1) 및 당 수송체(GLUT4) 단백질 발현을 대조군에 비해 유의하게 향상시켰다. L6 근육세포의 텍사메타손(dexamethasone)으로 유도된 인슐린 저항성 모델에서도 COE는 인슐린 신호전달 및 당 흡수 단백질 발현을 효과적으로 증가시켰다. 더불어 인슐린 저항성 지표로 알려진 IRS-1 Ser307의 인산화 활성도 COE 첨가에 의해 유의하게 억제되었다. 그러나 COE는 췌장 베타세포의 인슐린 분비에는 아무런 영향을 미치지

않았다. 결론적으로 COE는 인슐린 표적세포와 제브라피쉬에서 인슐린 신호전달과 당 수송체 GLUT4 단백질 발현의 조절을 통해 당 대사 및 인슐린 민감성을 개선시키는 것으로 밝혀졌다.

Keywords 3T3-L1 지방세포 · L6 근육세포 · 옥당골 · 인슐린 민감성 · 제2형 당뇨병 · 제브라피쉬

Acknowledgments This research was supported by a grant from the Basic Science Research Program (2015R1D1A1A09060557) through the National Research Foundation (NRF), funded by the Ministry of Education, Science and Technology, Republic of Korea. Also, this Research was supported by Research Funds of Mokpo National University in 2019.

References

- Oguntibeju OO (2019) Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 11(3): 45–63
- Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB (2012) Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J* 27(4): 269–273
- Lee YS, Jun HS (2014) Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells. *Metabolism* 63(1): 9–19
- Park YS, Ahn SH, Park DJ, Kim HH (2014) Effects of metabolic surgery on glucose homeostasis in type 2 diabetes. *J Metab Bariatr Surg* 3(2): 25–32
- Cha BS, Park SE (2006) Insulin resistance and PPARγ. *J Korean Diabetes Assoc* 30(5): 317–323
- Maratou E, Raptis SA (2011) Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* 93: S52–S59
- Ramnanan CJ, Edgerton DS, Kraft G, Cherrington AD (2011) Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab* 13: 118–125
- Dey L, Attele AS, Yuan CS (2002) Alternative therapies for type 2 diabetes. *Alternative Medicine Review* 7(1): 45–58
- Hollander P (2007) Anti-diabetes and anti-obesity medications: effects on weight in people with diabetes. *Diabetes Spectr* 20(3): 159–165
- Prabhakar PK, Doble M (2011) Mechanism of action of natural products used in the treatment of diabetes mellitus. *Chin J Integr Med* 17(8): 563–574
- Choi CG, Hwang EK, Sohn GH (2000) Culture studies on the green alga, *Caulerpa Okamurae* I. growth and regeneration. *J Aquaculture* 13(3): 253–258
- Nguyen VT, Ueng JP, Tsai GJ (2011) Proximate composition, total phenolic content, and antioxidant activity of seagrape (*Caulerpa lentillifera*). *J Food Sci* 76(7): C950–C958
- Vanderlei ESO, Patoilo KKNR, Lima NA, Lima APS, Rodrigues JAG, Silva LMC, Lima MEP, Lima V, Benevides NMB (2010) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *Int immunopharmacol* 10(9): 1113–1118
- Carneiro JG, Rodrigues JAG, de Sousa Oliveira Vanderlei E, Souza RB, Quinderé ALG, Coura CO, de Araujo IWF, Chaves HV, Bezerra MM, Benevides NMB (2014) Peripheral Antinociception and Anti-Inflammatory Effects of Sulphated Polysaccharides from the Alga *Caulerpa mexicana*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 115(4): 335–342
- Sharma BR, Kim HJ, Rhyu DY (2015) *Caulerpa lentillifera* extract ameliorates insulin resistance and regulates glucose metabolism in C57BL/KsJ-*db/db* mice via PI3K/AKT signaling pathway in myocytes. *J Transl Med* 13(1): 1–10
- Sharma BR, Kim HJ, Kim MS, Park CM, Rhyu DY (2017) *Caulerpa*

- okamurae* extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and prevents high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Nutr Res* 47: 44–52
17. Lee YS, Jun HS (2014) Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells. *Metabolism* 63(1): 9–19
 18. Gallwitz B (2019) Clinical use of DPP-4 inhibitors. *Front Endocrinol*. doi: 10.3389/fendo.2019.00389
 19. Kasuga M (2006) Insulin resistance and pancreatic β cell failure. *J Clin Invest* 116(7): 1756–1760
 20. Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO (2008) Insulin signaling in the pancreatic β -cell. *Annu Rev Nutr* 28: 233–251
 21. Cerf ME (2013) Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol*. doi: 10.3389/fendo.2013.00037
 22. Zhang S, Zhang ZY (2007) PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug discov today* 12(9–10): 373–381
 23. Sun J, Qu C, Wang Y, Huang H, Zhang M, Li H, Zhang Y, Wang Y, Zou W (2016) PTP1B, a potential target of type 2 diabetes mellitu. *Mol Biol*. doi: 10.3389/fnagi.2017.00007
 24. Vilsbøll T, Holst JJ (2004) Incretins, insulin secretion and type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 47(3): 357–366
 25. Buchanan TA (2003) Pancreatic beta-cell loss and preservation in type 2 diabetes. *Clin Ther* 25: B32–B46
 26. Hamm JK, Park BH, Farmer SR (2001) A role for C/EBP β in regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 276(21): 18464–18471
 27. Kim JB, Park JY (2002) Molecular insights into fat cell differentiation and functional roles of adipocytokines. *Endocrinol Metab* 17(1): 1–8
 28. Kim SH, Shin EJ, Hyun CK (2005) Enhancing effects of extracts of *Phellodendri Cortex* on glucose uptake in normal and insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Kor J Pharmacogn* 36(4): 291–298
 29. Tabassum N, Tai H, Jung DW, Williams DR (2015) Fishing for nature's hits: establishment of the zebrafish as a model for screening antidiabetic natural products. *Evid Based Complement and Alternat Med* doi: 10.1155/2015/287847
 30. Zang L, Maddison LA, Chen W (2018) Zebrafish as a model for obesity and diabetes. *Fron Cell Dev Biol* 6: doi.org/10.3389/fcell.2018.00091
 31. Abdul-Ghani, MA, DeFronzo, RA (2010) Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010: 476279
 32. Czech, MP (2017) Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med* 23(7): 804
 33. Beale, EG (2013) Insulin signaling and insulin resistance. *J Investig Med* 61(1): 11–14
 34. Mo, Z, Li, L, Yu, H, Wu, Y, Li, H (2019) Coumarins ameliorate diabetogenic action of dexamethasone via Akt activation and AMPK signaling in skeletal muscle. *J Pharmacol Sci* 139(3): 151–157