

Research Article



장수풍뎅이 유충 추출물이 고지방산 처리 골격근세포의 인슐린 저항성에 미치는 영향

김경 , 심미성 , 광민규 , 장세은 , 오윤신 

을지대학교 식품영양학과

OPEN ACCESS

Received: Feb 3, 2022

Revised: Jun 28, 2022

Accepted: Jul 21, 2022

Published online: Aug 17, 2022

Correspondence to

Yoon Sin Oh

Department of Food and Nutrition, Eulji University, 553 Sanseong-daero, Sujeong-gu, Seongnam 13135, Korea.

Tel: +82-31-740-7287

Email: ysoh@eulji.ac.kr


© 2022 The Korean Nutrition Society

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.


ORCID iDs

Kyong Kim 


<https://orcid.org/0000-0001-9066-8204>

Mi-Seong Sim 


<https://orcid.org/0000-0002-7614-5527>

Min-Kyu Kwak 

<https://orcid.org/0000-0003-0295-613X>

Se-Eun Jang 

<https://orcid.org/0000-0003-3279-0871>

Yoon Sin Oh 

<https://orcid.org/0000-0003-3995-4429>

Funding

This study was supported by Basic Science Research Program grant (NRF-2021R1F1A1050949) provided by the National Research Foundation of Korea (NRF), which is funded by the Ministry of Science, ICT and Future Planning.

The effects of *Allomyrina dichotoma* larval extract on palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle cells

Kyong Kim , Mi-Seong Sim , Min-Kyu Kwak , Se-Eun Jang , and Yoon Sin Oh 

Department of Food and Nutrition, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

ABSTRACT

Purpose: *Allomyrina dichotoma* larvae are one of the approved edible insects with nutritional value and various functional and medicinal properties. Previously we have demonstrated that the *Allomyrina dichotoma* larval extract (ADLE) ameliorates hepatic insulin resistance in high-fat diet (HFD)-induced diabetic mice through the activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK). This study investigated the effects of ADLE on insulin resistance in the skeletal muscle and explored mechanisms for enhancing the glucose uptake in palmitate (PAL)-treated C2C12 myotubes.

Methods: To induce insulin resistance, the differentiated C2C12 myotubes were treated with PAL (0.5 mM) for 24 hours, and then treated with a 0.5 mg/ml concentration of ADLE, and the resultant effects were measured. The expression levels of glucose transporter-4 (GLUT4), AMPK, and the mitochondrial metabolism-related proteins were analyzed by western blotting. The mRNA expression levels of lipogenesis-related genes were determined by quantitative reverse-transcriptase PCR.

Results: The exposure of C2C12 myotubes to 0.5 mg/ml of ADLE increased cell viability significantly compared to PAL-treated cells. ADLE upregulated the protein expression of GLUT4 and enhanced glucose uptake in the PAL-treated cells. ADLE increased the phosphorylated AMPK in both the PAL-treated C2C12 myotubes and HFD-treated skeletal muscle. The reduced expression levels of peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha (PGC1 α) and uncoupling protein 3 (UCP3) due to the PAL and HFD treatment were reversed by the ADLE treatment. The citrate synthase activity was also significantly increased with the PAL and ADLE co-treatment. Moreover, the mRNA and protein expressions of fatty acid synthesis-related factors were reduced in the PAL and HFD-treated muscle cells, and this effect was significantly attenuated by the ADLE treatment.

Conflict of Interest

There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest.

Conclusion: ADLE activates AMPK, which in turn induces mitochondrial metabolism and reduces fatty acid synthesis in C2C12 myotubes. Therefore, ADLE could be useful for preventing or treating insulin resistance of skeletal muscles in diabetes.

Keywords: edible insects; skeletal muscle cell, muscles; insulin resistance; adenosine monophosphate-activated protein kinase

서론

식후 고혈당은 췌장에서 인슐린 분비를 자극하고 혈장 인슐린 농도의 상승은 표적기관인 간, 근육 및 지방조직에 분포된 인슐린 수용체와 결합함으로써 인슐린 신호전달이 이루어진다. 이 과정은 1/3은 간에서, 나머지는 말초조직인 근육과 지방에서 주로 발생한다. 말초조직의 세포 내 포도당흡수는 glucose transporter-4 (GLUT4)에 의해 조절되며 이 과정은 인슐린신호전달계에 의해 통제된다 [1]. 최근 비만 및 당뇨병 관련 질환의 연구에 있어서 골격근의 중요성은 더욱 강조되고 있는데 골격근에서의 인슐린 저항성은 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수 및 대사 감소를 초래하여 혈당을 증가시키는 원인이 된다. 즉, 비만 및 당뇨병 환자의 경우 지방 저장 기능이 증가되어 근육 내 지방 축적의 증가와 함께 지방의 분해 산물인 diacylglycerol이 증가되면서 근육 내에서의 인슐린 저항성을 초래하는 것으로 보고되고 있다 [2].

골격근의 다양한 생체에너지 조절 관련인자 중 에너지 항상성 조절 역할을 하는 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)는 근육세포 내에서 인슐린의 작용과 상관없이 GLUT4의 혈장막으로의 이동을 유도하여 세포 안으로 포도당의 흡수를 증진시킨다 [3,4]. 또한 세포 내 에너지가 부족하면 저장된 중성지방을 분해하여 지방산을 생성하는데, 이 지방산은 근육에서 매우 중요한 에너지원으로 작용한다. 이때 미토콘드리아를 통하여 에너지 생산 과정을 유도하는데, 활성화된 AMPK는 포도당과 지방산의 흡수를 촉진하고 이들을 산화시켜 에너지를 생산하는 과정에 관여한다 [5,6]. 따라서 근육에서 AMPK는 당/지질 대사의 중요한 조절인자로서 최근 비만과 당뇨 등의 대사성 질환과 관련하여 그 중요성이 강조되고 있다 [7,8].

2013년 유엔식량농업기구 (Food and Agriculture Organization of the United Nations)는 인류의 부족한 식량을 대체할 식량자원으로서 식용 곤충을 언급하였다. 식용 곤충은 환경보호 (eco-friendly) 측면뿐 아니라 우수한 영양학적 가치를 인정받았으며, 국내에서는 과학적 안정성이 입증된 벼메뚜기, 누에 번데기, 백강잠, 갈색거저리 유충, 쌍별귀뚜라미, 장수풍뎅이 유충, 흰점박이꽃무지 유충, 왕아메리카거저리를 포함 총 8종이 식품으로 허가되었다 [9].

그 중 장수풍뎅이 유충 (*Allomyrina dichotoma* larvae)은 영양학적 성분 외에 섭취시 항비만/항당뇨 [10,11], 간 보호 [12], 항균 [13], 치매예방 [14] 등의 생리화학적 기능이 있는 것으로 알려져 그에 대한 관심은 증가하고 있다. 본 연구팀은 이전 연구에서 장수풍뎅이 유충추출물 (*A. dichotoma* larvae extract, ADLE)이 고지방 섭취로 유도된 생쥐의 간 인슐린 저항성을 개선하고 췌장 베타세포에서 염증 및 지질독성 예방 효과를 입증했으며 장염증에 의한 장기능장애 개선에도 효과가 있음을 입증했다 [15,16]. 또한 ADLE로부터 극성물질 AF-13

을 분리하여 팔미트산으로 유도된 췌장 베타세포에서 베타세포 보호 및 항염증 효과를 확인하였다 [17,18]. 그러나 말초조직인 골격근에서 인슐린 저항성에 대한 ADLE의 효과에 대한 연구는 진행된 바가 없다. 따라서 본 연구는 분화된 C2C12 골격근 세포를 이용하여 인슐린 저항성에 대한 ADLE의 효과를 조사하고, 그 기전중의 하나로 AMPK 경로를 통한 미토콘드리아 대사와 지방합성 유전자 변화 양상을 조사하였다.

연구방법

재료

Sodium palmitate (PAL)와 bovine serum albumin (fatty acid free)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Duchefa (Haarlem, Netherlands)에서 구입하였다. 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa 1,3-diazol-4yl) amino]-2-deoxyglucose (2-NBDG)는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)을 통해 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS)은 Gibco (Paisley, UK)에서 구입하였고, Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), horse serum (HS), penicillin/streptomycin, trypsin-EDTA와 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)는 WELGENE (Daegu, Korea)에서 구입하였다.

1차 항체로 사용된 anti-AMPK α , anti-pAMPK α (Thr¹⁷²), anti-uncoupling protein 3 (UCP3), anti-peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator (PGC)1 α , anti-acetyl-CoA carboxylase (ACC), anti-fatty acid synthase (FAS), anti- α -tubulin은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 anti-sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1는 Abcam (Cambridge, UK)에서 anti-GLUT4는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며 2차 항체인 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit, anti-mouse)는 PeproTech (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

장수풍뎡이유충 추출물 (ADLE)

본 실험에 사용된 장수풍뎡이 유충 (*A. dichotoma* larvae)은 경상북도 예천군에 위치한 '예천곤충나라'에서 구입하였다. 건조된 시료는 분쇄하여 분말화하였으며 제조한 분말은 70% 에탄올 (v/v)로 60°C에서 8시간씩 3회 추출하여 유효 성분을 추출하고 2회 여과 (Advantec No. 2) 한 후 여과액은 회전식 감압농축기로 감압 농축하고 동결 건조하였다. 획득한 수율은 11.84%였으며 ADLE는 후속 실험을 위해 증류수에 100 mg/mL의 농도로 용해하여 저장 후 실험에 사용하였다.

세포배양 및 지방산 처리

실험에 사용된 세포는 마우스의 골격근세포주 (mouse skeletal muscle cell line)로 미분화상태의 근아세포 (myoblast)인 C2C12 세포를 American Type Culture Collection (CRL-1772; Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였으며 10% FBS 및 1% penicillin streptomycin을 함유한 고농도 포도당 DMEM에서 80% confluence될 때까지 배양하였다. 그 다음 2% HS 및 1% penicillin/streptomycin을 함유한 고농도 포도당 DMEM 배지로 24시간마다 교환하면서 4일간 근세포로 분화를 유도시킨 후 실험에 이용하였다.

BSA-conjugated PAL (5 mM)의 제조는 20 mM sodium PAL를 DPBS에 70°C로 증탕하면서 혼합한 후 1M NaOH를 1% (v/v) 넣어 완전히 용해한 후 5% BSA solution 과 1:3 비율로 혼합하였다. 인슐린 저항성을 유도하기 위하여 분화시킨 C2C12 myotube를 serum-free DMEM 배지에 0.5 mM PAL로 24시간 처리하였으며, 실험군 ADLE의 효과는 PAL과 함께 처리하여 조사하였다.

세포독성평가

C2C12에 대한 시료의 세포생존능 평가는 MTT를 이용하여 측정하였다. C2C12 세포를 1×10^5 cells/mL 농도로 96-well plate에 분주하고 PAL (0.1-1.0 mM), ADLE (0.1-2.0 mg/mL)를 다양한 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 모두 버리고 DPBS에 녹인 1.0 mg/mL MTT를 100 μ L씩 각 well에 처리한 후 2시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 2-propanol 100 μ L를 넣고 Microplate reader (TECAN Group Ltd., Shanghai, China)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 백분율 (% of control)로 나타내었다.

인슐린 저항성 유도 및 포도당 섭취 정도 측정

ADLE 처리에 따른 C2C12 세포의 포도당 섭취 변화는 포도당 형광 탐색 probe인 2-NBDG를 이용하여 수행하였다. 96 well black plate에서 분화된 C2C12 myotubes는 0.5 mM PAL또는 ADLE와 함께 24시간 동안 처리 후 배지는 포도당 농도 측정을 위해 수거하고 세포는 2회 DPBS로 세척 후 2-NBDG (50 μ M)를 넣고 암실에서 6분 반응 후 다시 DPBS로 3회 세척하여 형광 분석기 (TECAN Group Ltd.)를 통해 포도당 흡수 정도를 분석하였다. 소비하고 남은 배지 포도당 양 (glucose consumption)은 glucose assay kit (Asan Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다.

Citrate synthase (CS) 활성도 측정

미토콘드리아 CS 활성측정은 citrate synthase assay kit (Sigma-Aldrich)를 이용하여 제조사의 권장 방법에 따라 측정하였으며 CS 활성도는 단백질 함량으로 표준화하여 대조군에 대한 비율 (fold of control)로 나타내었다.

동물실험

연구에 사용된 실험동물은 을지대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다 (승인번호 EUIACUC-18-7). 4주령의 수컷 C57BL/6 (14-18 g) 마우스를 한국생명공학연구원 (KRIBB, Daejeon, Korea)에서 구입하였으며 정상식이군 (normal fat diet, NFD), 고지방식이군 (high fat diet, HFD)으로 나누고 6주간 자육 공급하였다. NFD군의 사료는 Envigo 사 (Alconbury Huntingdon, UK)의 2018S 사료를 사용하였고, HFD군의 사료는 60%의 지방을 함유하는 Research Diets사 (New Brunswick, NJ, USA)의 D12492 사료를 급여하였다. 6주 후 정상식이군 (NFD, n = 6), HFD를 먹인 마우스를 당뇨병 유발 대조군 (HFD, n = 8), ADLE 100 mg/kg/body weight를 투여한 실험군 (HFD + ADLE, n = 8)으로 나누고 6주간 매일 1회씩 일정 시간에 경구 투여하였다 [15]. 실험 종료 후 희생시켜 종아리 근육 (skeletal muscle) 조직을 분리하였다.

Western blot 분석

세포와 근육 조직에 1× protease inhibitor cocktail과, 1× phenylmethanesulfonyl fluoride를 첨가한 mammalian protein extraction buffer (organic buffer + 10 mM NaCl + detergent, pH 7.5; Sigma)에 넣어 균질화 (cordless pellet pestle; Kimble, DWK Life Sciences, Millville, NJ, USA) 한 후 원심분리 (2,500 × g, 4°C, 10 minutes) 하여 상층액을 회수하였다. 추출한 단백질의 농도는 Bradford method로 측정 후 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gel에서 전기영동하여 전개시킨 후 0.45 μM nitrocellulose membrane (Amersham; GE Healthcare Life Sciences, Solingen, Germany)에 이동시켰다. 항체와 단백질 간의 비특이적인 결합을 차단하기 위하여 membrane은 실온에서 5% skim milk (in TBST)로 blocking 시킨 후, 1차 항체를 blocking buffer (5% skim milk)에 1:1,000–1:2,500 비율로 희석하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 TBS-T 용액으로 3회 세척한 다음 2차 항체를 blocking buffer에 1:2,500–1:10,000 비율로 희석하여 실온에서 2시간 반응시키고 TBS-T 용액으로 3회 세척한 다음 Immunobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)를 사용하여 KODAK X-ray film에 감광시켜 나타나는 밴드로 단백질 발현 정도를 확인하였다. 발현된 단백질은 Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 정량하였다.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction

RNA는 Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 방법으로 추출 후 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 정량하였으며 Primescript™ 1st strand cDNA 합성 키트 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)로 합성하였다. SYBR Premix Ex Taq II, ROX plus (Takara Bio Inc.)와 아래 oligonucleotide primer와 90°C에서 10분 반응 후, denaturation을 위해 95°C에서 15초, annealing을 위해 60°C에서 1분을 1 cycle로 해서 40 cycle 조건으로 ABI (Applied Biosystem Inc., Foster City, CA, USA)를 사용하여 실시간 중합효소 연쇄 반응 (real-time polymerase chain reaction)을 수행하였다. Oligonucleotide primer sequence는 다음과 같다. SREBP-1c는 5'-CTTCTGGAGACATCGCAAAC-3' (forward)와 5'-GGTAGACAACAGCCGCATC-3' (reverse); ACC는 5'-AGGAAGATGGCGTCCCGCTCTG-3' (forward)와 5'-GGTGGAGATGTGCTGGGTCAT-3' (reverse); FAS는 5'-CTTGGGTGCTGACTACAACC-3' (forward)와 5'-GCCCTCCCGTACACTCACTC-3' (reverse); Cyclophilin은 5'-TGGAGAGCACCAAGACAGACA-3' (forward)와 5'-TGCCGGAGTCGACAATGAT -3' (reverse)이다.

통계처리

상기의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복 실험하였으며 모든 실험값은 mean ± SD로 나타내었다. 모든 통계 분석은 SPSS 20.0 소프트웨어 (IBM SPSS ver. 20.0.0 for Windows; IBM Co., Armonk, NY, USA)를 사용하여 수행되었다. 유의성 검정은 one-way analysis of variance 및 Student's t-test를 이용하여 p < 0.05 수준에서 검증하였다.

결과

분화된 근육세포주에서 팔미트산과 ADLE에 의한 세포 독성 변화

팔미트산은 16개의 탄소로 구성되어 혈액 내 유리 지방산 중에서 가장 많은 비율을 차지하는 포화지방산으로 알려져 있다 [19,20]. 비만환자에게서 많은 양 존재한다고 알려진 팔미트산은 인슐린에 의존하는 세포인 심근세포, 평활근세포 및 근육세포에 염증반응, 산화스트레스, 인슐린 저항성, 세포사멸 등을 유도한다 [21]. 분화된 C2C12 근육세포에서 PAL에 의한 독성을 조사한 결과, 대조군 (control, CON)와 비교하여 0.25 mM PAL 농도에서 26% ($p < 0.05$), 0.5 mM 농도에서는 37% ($p < 0.001$), 1.0 mM 농도에서는 71% ($p < 0.001$)의 세포가 독성을 나타냄을 확인하였다 (Fig. 1A). ADLE의 농도별 독성반응을 조사한 결과 24시간 동안 0.1-2.0 mg/mL의 농도범위에서 세포독성은 없음을 알 수 있었다 (Fig. 1B).

분화된 근육세포주에서 팔미트산으로 유도된 세포독성에 대한 ADLE의 세포 보호 효과

Fig. 1A의 결과로부터 팔미트산의 실험 농도는 0.5 mM (PAL)로 하여 ADLE는 0.1-2.0 mg/mL 범위에서 세포생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 PAL에 의한 48% ($p < 0.001$) 정도의 세포사멸은 0.5 mg/mL ADLE 농도부터 유의미한 ($p < 0.01$) 억제효과를 보였다 (Fig. 1C).

분화된 근육세포주에서 팔미트산 유도 포도당 흡수능 감소에 ADLE가 미치는 영향

분화된 근육세포주에서 팔미트산에 의해 유도된 인슐린 저항성을 ADLE가 개선할 수 있는지 여부를 조사하기 위하여 포도당 흡수 관련인자들을 측정하였다. 세포내 전체 GLUT4 발현량을 비교한 결과 (Fig. 2A) 대조군 대비 PAL 처리된 세포에서의 GLUT4 발현량은 유의적으로 감소 ($p < 0.001$)하였고, ADLE를 PAL과 함께 처리 시 GLUT4 발현량은 유의적으로 증가 ($p < 0.05$) 하였다. GLUT4 발현량의 변화가 세포내 포도당 흡수에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 2-NBDG 분석방법을 이용하여 측정하였다. ADLE를 처리 시 대조군과 비교하여 포도당 흡수가 1.2배 ($p < 0.001$) 증가하였으며, PAL을 처리하였을 시 포도당 흡수가 감소됨을 알 수 있었다. 또한 PAL에 의해 감소된 포도당 흡수는 ADLE 처리에 의해 유의적으로 증가 ($p < 0.001$)하였다 (Fig. 2B). PAL과 ADLE에 의해 소비된 포도당 정도를 확인하기 위하여 시료 처리 전후 배지에 남아있는 포도당 양을 측정하였다. 그 결과 PAL 처리군에서 대조군과 비교하여

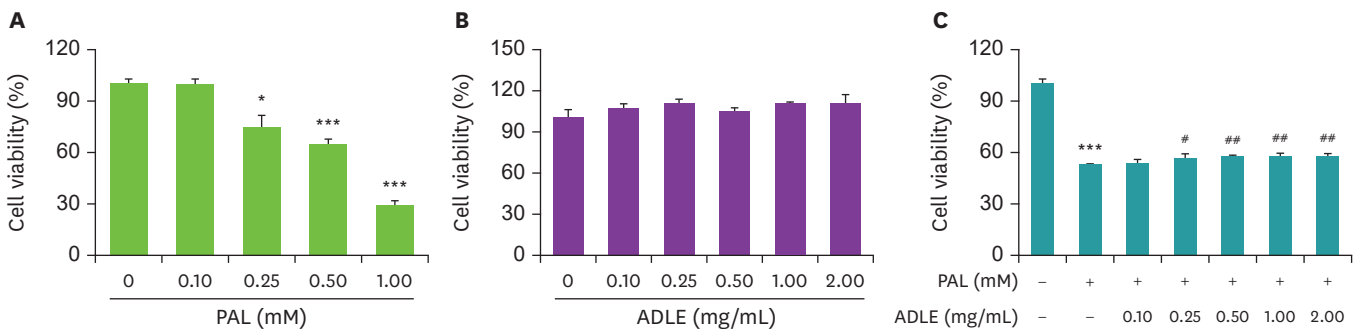


Fig. 1. Effect of ADLE on cell viability in PAL-treated C2C12 myotubes.

(A) Differentiated C2C12 cells were treated with various concentration of PAL for 24 hours. (B) Cells were treated with various concentration of ADLE for 24 hours. (C) Cells were treated with 0.5 mM PAL with or without ADLE for 24 hours and cell viability was determined by MTT assay. Each value indicates mean \pm SD from three independent experiments and normalized to percentage of untreated control.

ADLE, *Allomyrina dichotoma* larvae extract; PAL, palmitate; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. untreated control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. 0.5 mM PAL only.

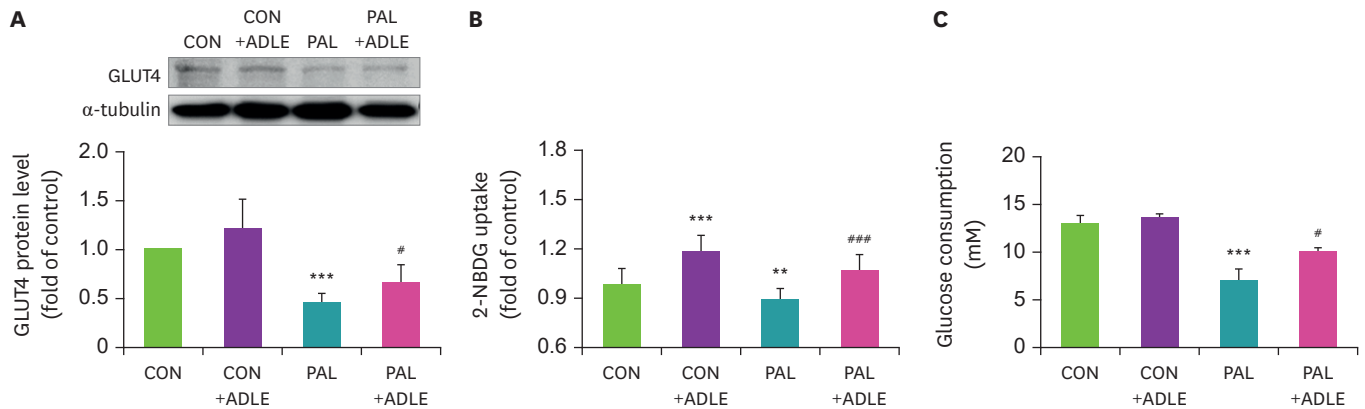


Fig. 2. Effects of ADLE on GLUT4 expression and glucose uptake in palmitate-treated C2C12 myotubes.

Differentiated C2C12 myotubes were incubated with 0.5 mM PAL with or without ADLE (0.5 mg/mL) for 24 hours. (A) The protein expression of GLUT4 was detected with western blot analysis and normalized to α -tubulin. (B) Glucose uptake was performed by reaction with 2-NBDG (50 μ M) for 1 hour. (C) The remaining amount of glucose in the medium was analyzed by glucose assay kit. All experiments were independently repeated at 3 times. Data are presented as the mean \pm SD.

ADLE, *Allomyrina dichotoma* larvae extract; GLUT4, glucose transporter-4; PAL, palmitate; 2-NBDG, 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa 1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxyglucose; CON, control.

p < 0.01, *p < 0.001 vs. CON; #p < 0.05, ###p < 0.001 vs. PAL.

포도당 소비량이 유의하게 감소 ($p < 0.001$)하였으며, ADLE에 의해 소비량이 다시 증가함을 알 수 있었다.

팔미트산을 처리한 근육세포주에서 ADLE가 미토콘드리아 대사와 지방 합성 조절 기전에 미치는 영향

세포의 대사과정에서 에너지 소모 시 활성화된 AMPK는 지질과 포도당 대사의 조절인자로 특히 당뇨와 비만에 있어서 매우 핵심적인 역할을 한다 [22]. AMPK는 포도당 신생합성 과정을 억제할 뿐만 아니라, 인슐린 신호 전달 경로와 별개로 근육세포의 GLUT4 양을 증가시켜 당유입을 증가시키는 등 세포내 에너지 대사 조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 [23,24]. 분화된 C2C12 근육세포에서 PAL과 ADLE에 의한 AMPK 인산화 정도를 확인하였다. 그 결과, ADLE 단독 처리 시 p -AMPK/ t -AMPK는 CON 대비 약 1.4배 유의적 증가 ($p < 0.001$)를 보였고 PAL에 의해 감소 ($p < 0.05$)된 AMPK 인산화는 ADLE 처리에 의해 유의적으로 ($p < 0.01$) 증가하였다 (Fig. 3A). 근육 내 AMPK의 활성화는 PGC1 α 의 발현을 통해 미토콘드리아 관련 유전자들의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있어 [25], PGC1 α 과 미토콘드리아 산화 환원 조절에 필수적인 역할을 하는 UCP3의 단백질 발현량을 조사하고 미토콘드리아의 활동 마커 효소인 CS의 활성도를 측정하였다. 그 결과, PAL은 분화된 C2C12 세포에서 UCP3 및 PGC1 α 의 단백질 발현량을 대조군과 비교하여 각각 57.8% ($p < 0.001$), 54.9% ($p < 0.01$) 억제하였으며, ADLE의 처리에 의해 회복되는 것으로 나타났다 (Fig. 3B). 미토콘드리아 산화효소인 CS 활성도를 측정한 결과, PAL 처리에 의해 22% ($p < 0.001$) 감소를 보인 CS 활성은 ADLE의 처리에 의해 13.5% ($p < 0.05$) 유의적으로 증가하였다 (Fig. 3C). AMPK는 지방산의 합성과 분해를 매개함으로써 지방대사의 조절에도 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으므로 [26,27], 관련 단백질인 ACC, FAS, SREBP-1의 발현량 변화를 조사하였다. 그 결과, PAL 처리에 의해 ACC ($p < 0.01$), FAS ($p < 0.05$), SREBP-1 ($p < 0.01$) 모두 유의적 증가를 보였으며 ADLE 처리에 의해 ACC ($p < 0.05$), SREBP-1 ($p < 0.05$)에서 유의적 감소를 보였다 (Fig. 3D).

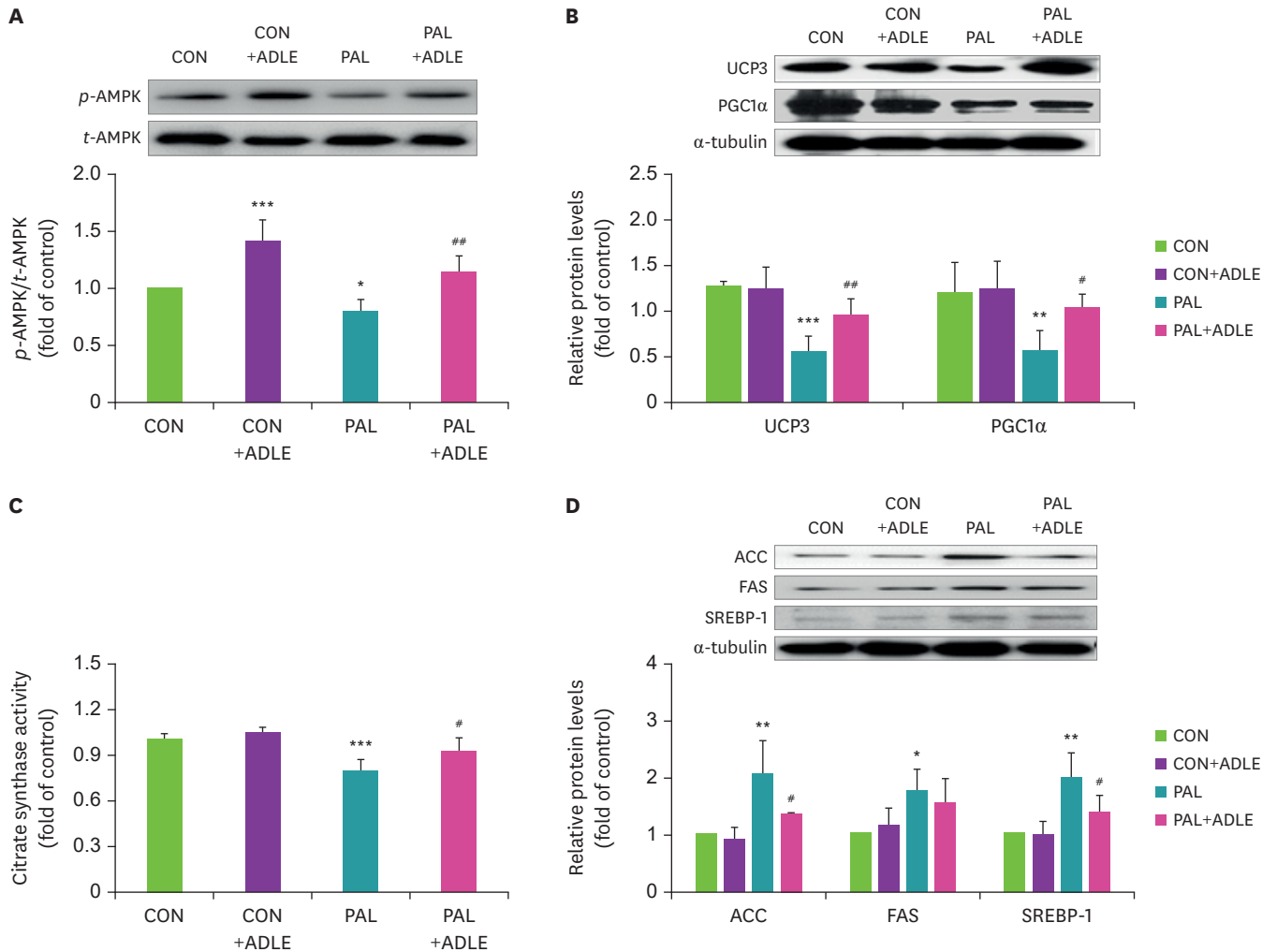


Fig. 3. Effects of ADLE on AMPK activation and its downstream signaling in PAL-treated C2C12 myotubes.

(A) The cells were treated as described in Fig. 2 and the cells were analyzed by western blotting. The band intensity of p-AMPK was normalized to that of AMPK. (B) The band intensity of UCP3 and PGC1α were normalized to that of α-tubulin. (C) CS activity was quantified using an enzymatic method and represented as a fold of CON. (D) The band intensity of ACC, FAS, and SREBP-1 were normalized to that of α-tubulin. All experiments were independently repeated at 3 times. Data are presented as the mean ± SD.

ADLE, *Allomyrina dichotoma* larvae extract; AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; PAL, palmitate; UCP3, uncoupling protein 3; PGC1α, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha; CS, citrate synthase; CON, control; ACC, acetyl-CoA carboxylase; FAS, fatty acid synthase; SREBP, sterol regulatory element-binding protein.

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. CON; #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. PAL.

고지방식을 처리한 마우스 근육 조직에서 ADLE가 에너지 대사 조절기전에 미치는 영향

ADLE가 근육조직에서도 효과를 나타내는지 확인하기 위하여 고지방식을 처리한 마우스에 ADLE를 처리한 후 [15] 근육조직을 분리하여 AMPK 활성화, GLUT4 발현량, 미토콘드리아 대사 및 지방산대사 변화를 조사하였다. 먼저 GLUT4 및 AMPK 활성화를 western blot으로 확인한 결과 (Fig. 4A), HFD 그룹의 근육에서 GLUT4 발현량은 NFD 그룹과 비교하여 유의적으로 (p < 0.001) 낮게 나타났고, HFD + ADLE 그룹은 HFD 그룹과 비교하여 유의적 증가 (p < 0.01)를 보였다 (Fig. 4B). 또한 p-AMPK/t-AMPK의 비율은 NFD 그룹과 비교하여 HFD 그룹에서 유의적 감소 (p < 0.01)를 보였으며 HFD + ADLE 그룹은 HFD 그룹과

비교하여 유의적 ($p < 0.01$)인 발현 증가를 보였다 (Fig. 4C). AMPK 활성화에 의해 조절되는 미토콘드리아 생합성 관련 인자를 확인한 결과 HFD 그룹은 UCP3 ($p < 0.001$), PGC1 α ($p < 0.01$)의 발현정도가 NFD 그룹과 비교하여 유의하게 낮는데 비해, HFD + ADLE 그룹에서는 HFD와 비교하여 PGC1 α 는 297% ($p < 0.01$), UCP3는 196% ($p < 0.01$) 발현의 증가를 보였다 (Fig. 4D and E). CS 활성도를 근육조직에서 측정한 결과 Fig. 4F에서 보여지는 바와 같이, HFD 그룹은 NFD 그룹에 비해 CS 활성도가 약 20% 정도 떨어져 있었으며 ($p < 0.05$) HFD+ADLE 그룹은 HFD와 비교하여 유의성 있는 증가를 보였다 ($p < 0.05$). AMPK 활성화에 의한 지방산 생합성과 관련하여 근육내 지방합성 관련 효소인 ACC, FAS, SREBP-1c의 mRNA 정도를 조사하였다. NFD 그룹에 비해 ACC, FAS, SREBP-1c mRNA level 모두 유의적 증가 ($p < 0.001$)를 보였으며 HFD + ADLE 그룹은 HFD 그룹과 비교하여 증가된 ACC, FAS, SREBP-1c의 mRNA level을 각각 50% ($p < 0.001$), 27% ($p < 0.05$), 45% ($p < 0.001$) 정도 감소시켰다 (Fig. 4G).

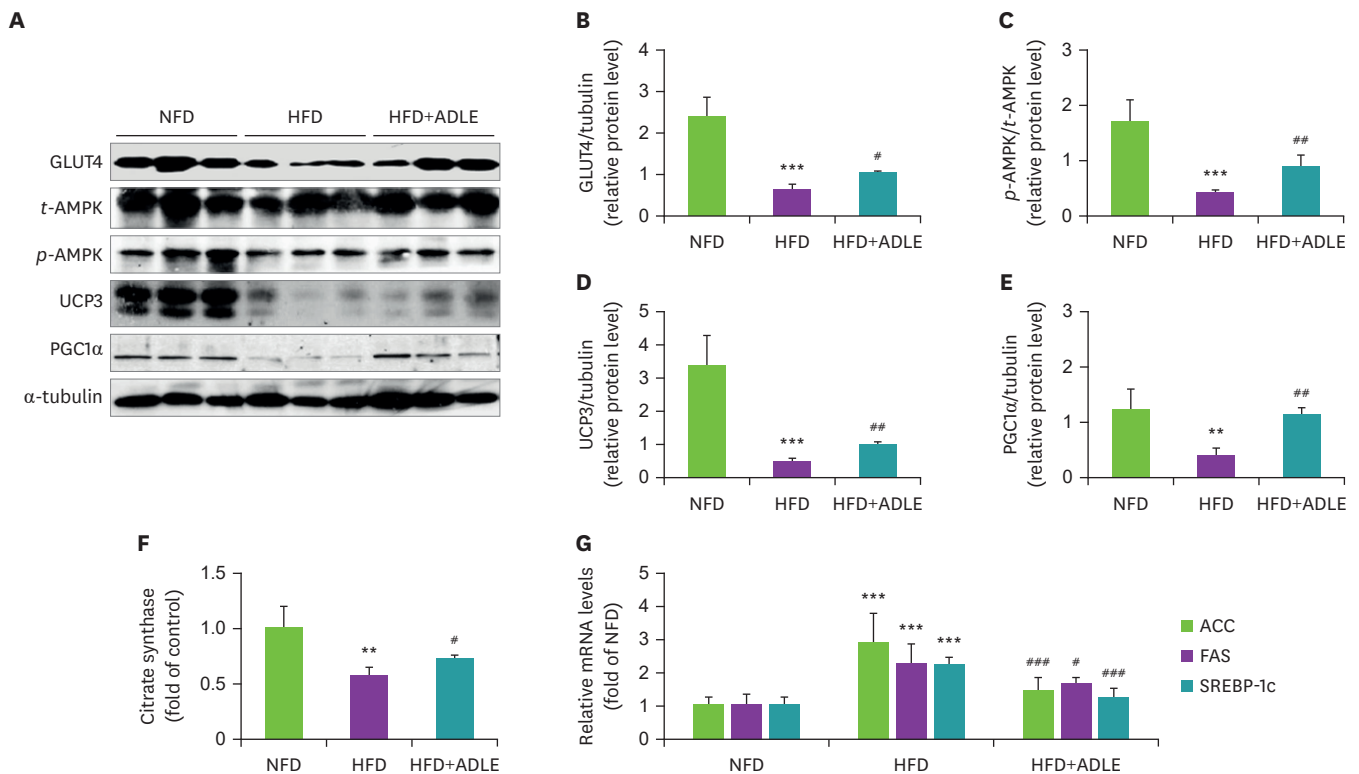


Fig. 4. Effect of ADLE on the expression levels of GLUT4 and AMPK activation in skeletal muscle from HFD-fed mice.

(A) Protein expression levels of UCP3, PGC1 α , p-AMPK, t-AMPK, and GLUT4 were measured by western blot analysis. Quantification of proteins expression was calculated by quantity one software and the band intensity of GLUT4 (B), UCP3 (D) and PGC1 α (E) were normalized to that of α -tubulin. (C) The band intensity of p-AMPK was normalized to that of AMPK. (F) CS activity was quantified using an enzymatic method and expressed as a fold of control. (G) mRNA expression level of ACC, FAS, and SREBP-1c were measured by qRT-PCR analysis. Gene expression was normalized to that of cyclophilin. All experiments were independently repeated at 3 times. Data are presented as the mean \pm SD.

ADLE, *Allomyrina dichotoma* larvae extract; GLUT4, glucose transporter-4; AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; HFD, high fat diet; NFD, normal fat diet; UCP3, uncoupling protein 3; PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha; CS, citrate synthase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; FAS, fatty acid synthase; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. NFD group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. HFD group.

고찰

우리 몸의 약 40-50%을 차지하는 골격근은 혈액 내 포도당을 흡수하여 에너지원으로 사용하는 중요 기관이다 [28]. 인슐린 저항성으로 근육에 포도당이 제대로 전달되지 않으면 근육은 에너지를 내기 위해 지방을 받아들여지게 되고 결국 근육량이 줄고 근육에 지방이 쌓이게 되면서 대사성 질환을 유발하게 된다 [29]. 근육에서의 당 흡수는 크게 두가지 방식으로 일어나는데, 한가지는 인슐린에 의해 당 수송체인 GLUT4의 이동을 촉진시켜 근육 내로 당유입을 증가시키는 것이고 (insulin dependent pathway), 또 하나는 운동에 의한 근수축이나 AICAR (AMPK activator), metformin과 같은 약물에 의한 AMPK 활성화가 GLUT4 양을 증가시켜 근육으로 포도당 이동을 증가시키는 방법이다 (insulin independent pathway) [30].

비만, 제2형 당뇨병 등의 대사성 질환자에서 AMPK 활성화는 골격근에서 포도당 섭취의 증가, 포도당 신생합성억제 등을 통해 혈중 포도당 농도를 감소시키는 기전으로서 당뇨병 치료제로 이용되고 있다 [31]. 따라서 AMPK 활성화를 유도할 수 있으며 부작용이 적은 천연물질에 대한 약물 탐색은 더욱 중요시되고 있으며 현재 대표적 천연물질로는 resveratrol, capsaicin, genistein, catechin, berberine, quercetin, hispidulin, curcumin, Juniperus chinensis, ginsenoside 등이 알려져 있다 [32].

본 연구에서 분화된 근육세포주에서 ADLE가 AMPK 활성화에 의한 포도당 흡수 정도에 미치는 영향을 분석한 결과, ADLE는 AMPK 활성화를 일으켜 GLUT4의 이동을 촉진시킴으로써 포도당의 흡수를 촉진하는 것으로 나타났다. 동물모델을 이용하여 조사하였을 경우에도, 고지방식이에 의해 마우스 근육에서 AMPK 활성화가 감소되어 있었으며, 이는 기존에 보고된 연구결과와 유사한 결과였다 [33]. 또한 ADLE에 의하여 근육조직에서 AMPK가 활성화됨을 확인함으로써, AMPK 인산화가 GLUT4 translocation을 증가시켜 당대사 조절에 도움을 줄 수 있음을 [34] 알 수 있었다.

근육에서 미토콘드리아 기능 이상으로 연료인 포도당과 지방산 대사가 저하되면 인슐린 저항성이 발생하는데 여기서 미토콘드리아의 에너지 발생도 함께 감소하는 것으로 알려져 있다 [35,36]. 실제로, 제2형 당뇨병 또는 인슐린저항성을 갖는 비만인은 정상인에 비해 미토콘드리아의 CS의 활동수준이 20-40% 정도 낮다고 알려져 있다 [37-39]. 미토콘드리아에서 열에너지를 발산하는 데 중요한 인자로 알려진 UCP3는 Choi 등 [40]의 연구에 따르면 UCP3가 과발현된 마우스에서 고지방식으로 비만과 인슐린 저항성을 유도하였을 때 이러한 현상이 개선됨을 발표하였다. PGC1 α 는 미토콘드리아 생합성과 산화 대사에 관여하며, 특히 근육 전사 조절 인자인 MEF2와 결합, 보조 활성인자 활성화를 통해 당 수송체 (GLUT4)의 유전자 발현을 유도시켜 당 섭취를 증가시키는 것으로 보고되고 있다 [41,42]. Lagouge 등 [43]의 연구에서는 레스베라트롤이 고지방식으로 유도된 비만마우스의 에너지 소비를 증가시키고 근육조직에서 NRF1, Tfam, PGC1 α 와 같은 유전자의 발현을 증가시켜 체중감소효과에 영향을 줄을 발표한 바 있다. 본 연구에서도 ADLE는 인슐린저항성이 유도된 근육세포와 근육조직에서 UCP3와 PGC1 α 의 발현증가를 일으켰으며 이는 최종적으로 미토콘드리아의 활성 마커 효소인 CS 활성을 증가시킴을 알 수 있었다.

AMPK 활성화는 중성지방으로 전환에 필수 효소인 ACC와 FAS를 억제하며, 이들의 전사인자로 작용하는 SREBP-1c의 발현을 억제시킨다고 보고되었다 [44,45]. 본 연구에서도 PAL이나 HFD에 의해 유도된 지방합성 유도 인자들이 ADLE에 의해 감소됨을 관찰하였으며, 이상의 결과들은 근육의 당 수송에 관여하는 AMPK의 신호전달 기전은 불분명한 상태이지만 ADLE에 의한 AMPK의 활성화가 미토콘드리아의 에너지 대사의 촉진을 통해 당/지방대사를 활성화함으로써 근육내 당 유입을 촉진시켰을 가능성이 있음을 [46] 의미한다.

식용 곤충의 조단백질 함량은 평균 45-60%로 높고 우수한 지방산 및 각종 무기질 함량이 풍부하다. 특히 장수풍뎡이 유충은 단백질 54.2%, 지방 20.2%, 섬유소 4.0%, 회분 3.88%를 함유하는 것으로 보고되었다 [9]. 본 연구에서는 ADLE의 항인슐린 저항성을 나타내는 효능성분을 밝히지 못한 것을 제한점으로 들 수 있다. 그러나, 곤충을 포함한 살아있는 유기체들은 오랜 기간 열악한 자연환경에 적응하기 위하여 다양한 항산화 방어 물질을 생성하고 있으며 [47,48], 현재 본 연구진들도 ADLE의 효능과 관련하여 용매별 분획화로 활성성분에 대한 품질 분석 및 검증을 진행하고 있다. 일부 극성의 분획물에서 높은 항산화 효과 및 산화 스트레스 감소효과를 보이고 있어 인슐린 저항성 개선의 메커니즘 중 하나가 될 수 있을 것으로 예상된다.

이상의 결과로 ADLE는 PAL에 의해 유도된 인슐린 저항성 상태의 근육세포에서 당 대사 항상성에 중요한 역할을 하는 AMPK의 인산화를 활성화하여 근육 미토콘드리아의 에너지 대사를 촉진하고 지방산 합성을 억제함으로써 세포내 당 유입의 증가를 촉진하여 인슐린 저항성의 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

요약

본 연구는 팔미트산으로 인슐린 저항성을 유도한 C2C12 근육세포주에서 ADLE의 인슐린 저항성 개선 효과를 조사하고 이에 대한 조절 기전을 확인하고자 하였다. C2C12 근육세포주에 ADLE를 처리 시, AMPK의 활성화를 통해 포도당흡수 (glucose uptake)가 증가되었으며, 이는 미토콘드리아-매개 에너지 생합성 조절단백질인 PGC1 α , UCP3, CS 활성을 증가시키고 동시에 지방산 합성인자인 ACC, FAS, SREBP-1의 발현을 억제함을 알 수 있었다. 세포주에서 확인된 결과들을 고지방식이 유도 당뇨마우스의 근육조직에서 조사한 결과, 고지방식이와 ADLE를 동시에 처리한 그룹에서 AMPK 활성화, GLUT4 발현증가와 미토콘드리아 에너지 대사증가, 지방산 합성 감소효과를 보였다. 이상의 결과들로, ADLE가 근육 내 에너지 대사 관련 경로의 상위유전자인 AMPK를 활성화하여 GLUT4의 세포막 이동을 증진시켜 당대사 조절에 관여하는 것을 관찰하였으며, AMPK의 인산화 증가는 PGC1 α 의 활성화에 관여하고, 이를 통해 열 발산 대사와 관련된 UCP3의 증가 및 CS 활성을 증가시키고, 지방산 합성 관련 유전자 발현을 억제시킴을 알 수 있었다. 본 결과로부터 ADLE는 대사증후군에서 공통적으로 나타나는 인슐린 저항성을 개선시킬 수 있으며, 이는 근육세포에서의 AMPK의 활성화를 통한 에너지생성기전과 관련이 있음을 알 수 있었다. ADLE는 비만, 당뇨 등의 다양한 부작용을 가진 약제와는 다른 안전성을 보장할 수 있는 이점을 가지고 있어 인슐린 저항성 및 제2형 당뇨병 치료를 위한 기능성 식품 소재로의 활용 가능성도 충분히 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

1. Defronzo RA. Banting lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2009; 58(4): 773-795.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
2. Dubé JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Sauers SE, Goodpaster BH. Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294(5): E882-E888.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
3. Abbud W, Habinowski S, Zhang JZ, Kendrew J, Elkairi FS, Kemp BE, et al. Stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) is associated with enhancement of Glut1-mediated glucose transport. *Arch Biochem Biophys* 2000; 380(2): 347-352.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
4. Zheng D, MacLean PS, Pohnert SC, Knight JB, Olson AL, Winder WW, et al. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol (1985)* 2001; 91(3): 1073-1083.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
5. Fedirc S, Gaidhu MP, Ceddia RB. Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells. *J Lipid Res* 2006; 47(2): 412-420.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
6. Winder WW, Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 1999; 277(1): E1-E10.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
7. Hardie DG, Sakamoto K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21(1): 48-60.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
8. Wu H, Ballantyne CM. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest* 2017; 127(1): 43-54.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
9. Ghosh S, Lee SM, Jung C, Meyer-Rochow VB. Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *J Asia Pac Entomol* 2017; 20(2): 686-694.
[CROSSREF](#)
10. Yoon YI, Chung MY, Hwang JS, Han MS, Goo TW, Yun EY. *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae confer resistance to obesity in mice fed a high-fat diet. *Nutrients* 2015; 7(3): 1978-1991.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
11. Song MH, Han MH, Kwak KW, Lee S, Kim ES, Park KH, et al. Effect of different diets on growth and development of the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae). *Int J Indust Entomol* 2016; 33(2): 59-62.
[CROSSREF](#)
12. Lee JE, Jo DE, Lee AJ, Park HK, Youn K, Yun EY, et al. Hepatoprotective and anticancer activities of *Allomyrina dichotoma* larvae. *J Life Sci* 2015; 25(3): 307-316.
[CROSSREF](#)
13. Shin CS, Kim DY, Shin WS. Characterization of chitosan extracted from Mealworm Beetle (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*) and Rhinoceros Beetle (*Allomyrina dichotoma*) and their antibacterial activities. *Int J Biol Macromol* 2019; 125: 72-77.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
14. Kim M, Youn K, Yun EY, Hwang JS, Ahn MR, Jeong WS, et al. Effects of solvent fractions of *Allomyrina dichotoma* larvae through the inhibition of in vitro BACE1 and β -amyloid(25-35)-induced toxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Entomol Res* 2014; 44(1): 23-30.
[CROSSREF](#)
15. Kim K, Bae GD, Lee M, Park EY, Baek DJ, Kim CY, et al. *Allomyrina dichotoma* larva extract ameliorates the hepatic insulin resistance of high-fat diet-induced diabetic mice. *Nutrients* 2019; 11(7): 1522.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
16. Kim K, Bae GD, Park EY, Baek DJ, Kim CY, Jang SE, et al. *Allomyrina dichotoma* larval extract attenuates intestinal barrier disruption by altering inflammatory response and tight junction proteins in lipopolysaccharide-induced Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 532(1): 145-150.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
17. Kim K, Park EY, Baek DJ, Kim CY, Oh YS. Anti-inflammatory activity of AF-13, an antioxidant compound isolated from the polar fraction of *Allomyrina dichotoma* larva, in palmitate-induced INS-1 cells. *Life (Basel)* 2021; 11(6): 470.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

18. Kim K, Kwak MK, Bae GD, Park EY, Baek DJ, Kim CY, et al. Allomyrina dichotoma larva extract attenuates free fatty acid-induced lipotoxicity in pancreatic beta cells. *Nutr Res Pract* 2021; 15(3): 294-308.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
19. Guo W, Wong S, Xie W, Lei T, Luo Z. Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(2): E576-E586.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
20. Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J Clin Invest* 2009; 119(9): 2577-2589.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
21. Funaki M. Saturated fatty acids and insulin resistance. *J Med Invest* 2009; 56(3-4): 88-92.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
22. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 2003; 144(12): 5179-5183.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
23. Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, Saintillan Y, Grondin P, Kahn A, et al. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes* 2005; 54(5): 1331-1339.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
24. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action—Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341(4): 248-257.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
25. Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(29): 12017-12022.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
26. Woods A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferré P, et al. Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* 2000; 20(18): 6704-6711.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
27. Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferré P, Foufelle F. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(24): 14767-14771.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
28. Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 2004; 10(7-12): 65-71.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
29. Petersen KF, Shulman GI. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002; 90(5A): 11G-18G.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
30. Stoppani J, Hildebrandt AL, Sakamoto K, Cameron-Smith D, Goodyear LJ, Neuffer PD. AMP-activated protein kinase activates transcription of the UCP3 and HKII genes in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283(6): E1239-E1248.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
31. Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG 4th, Schlattner U, et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2004; 279(42): 43940-43951.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
32. Choi HC. AMP-activated protein kinase activating agent and its implication. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2012; 27(2): 109-115.
[CROSSREF](#)
33. Kuo YH, Lin CH, Shih CC. Ergostatrien-3 β -ol from *Antrodia camphorata* inhibits diabetes and hyperlipidemia in high-fat-diet treated mice via regulation of hepatic related genes, glucose transporter 4, and AMP-activated protein kinase phosphorylation. *J Agric Food Chem* 2015; 63(9): 2479-2489.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
34. Ji L, Zhang X, Liu W, Huang Q, Yang W, Fu F, et al. AMPK-regulated and Akt-dependent enhancement of glucose uptake is essential in ischemic preconditioning-alleviated reperfusion injury. *PLoS One* 2013; 8(7): e69910.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

35. Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 2003; 300(5622): 1140-1142.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
36. Kim JA, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res* 2008; 102(4): 401-414.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
37. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51(10): 2944-2950.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
38. Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J* 1999; 13(14): 2051-2060.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
39. He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 2001; 50(4): 817-823.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
40. Choi CS, Fillmore JJ, Kim JK, Liu ZX, Kim S, Collier EF, et al. Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2007; 117(7): 1995-2003.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
41. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 2005; 1(6): 361-370.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
42. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* 2006; 30(4): 145-151.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
43. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 2006; 127(6): 1109-1122.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
44. Ouchi N, Shibata R, Walsh K. AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. *Circ Res* 2005; 96(8): 838-846.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
45. Park SH, Gammon SR, Knippers JD, Paulsen SR, Rubink DS, Winder WW. Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2002; 92(6): 2475-2482.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
46. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 23): 5479-5487.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
47. Colinet D, Cazes D, Belghazi M, Gatti JL, Poirié M. Extracellular superoxide dismutase in insects: characterization, function, and interspecific variation in parasitoid wasp venom. *J Biol Chem* 2011; 286(46): 40110-40121.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
48. Corona M, Robinson GE. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol Biol* 2006; 15(5): 687-701.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)