

# OP9 세포에서 포도당 흡수능에 대한 대계 추출물의 효과

김미성 · 송제호<sup>1\*</sup>

원광대학교 의과대학 대사기능제어 연구센터, 1: 원광대학교 자연과학대학 스포츠산업복지학과

## Effects of *Herba Cirsii* Extracts on Glucose Uptake in OP9 Cells

Mi Seong Kim, Je Ho Song<sup>1\*</sup>

1: Center for Metabolic Function Regulation, Wonkwang University School of Medicine,  
2: Department of Sports Industry & Welfare, College of Natural Science, Wonkwang University

Although the *Herba Cirsii* is known to possess beneficial health effects, the anti-diabetic effects and the mechanism of action have not been elucidated. In the present study we have shown that *Herba Cirsii* Extract (HCE) can stimulate glucose uptake in OP9 adipocytes. Unlike insulin, HCE did not stimulate the Ser473 phosphorylation and activation of Akt. The increasing effects of HCE on glucose uptake were inhibited by PD680509 and compound C pretreatment, which means that the glucose uptake effects by HCE were carried out by extracellular signal-regulated kinase1/2(ERK1/2) and AMP-activated protein kinase (AMPK) activation. Further studies revealed that HCE stimulated glucose transport occurs through a mechanism involving ERK1/2 activation and AMPK activation.

Key words : *Herba Cirsii* Extract, glucose uptake, AMPK, ERK1/2, OP9 cell

### 서 론

大薊은 국화과에 속한 다년생 초본인 영경귀 *Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum. 및 동속 근연식물의 전초를 건조한 것으로 성미는 甘 · 苦 · 涼 · 無毒하고 心 · 肝經에 작용하며, 涼血止血 · 祛瘀消腫 등의 효능이 있어 각종 출혈병을 치료하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 박 등은 dimethylnitrosamine으로 유발된 간염유화 동물 모델에 유의한 억제효과를 보고하였으며<sup>2)</sup>, 大薊 약침액의 항산화 효과<sup>3)</sup>, 급성 산화적 간손상에 대한 보호 효과<sup>4)</sup>가 보고되었으나 지방세포에서 포도당 흡수능에 대한 효과는 없었다.

당뇨(Diabetes Mellitus, DM)는 혈중 내 높은 glucose를 유지하는 상태로써 인슐린 저항성(insulin resistance)을 근간으로 한다. 인슐린 저항성이란 인슐린을 필요로 하는 지방, 골격근 조직에서 정상적인 인슐린 농도에서 반응을 보이지 않는 상태로 포도당과 지질 대사를 유지하지 못하는 것을 말한다<sup>5,6)</sup>. 인슐린 의존적으로 포도당을 흡수하는 조직으로 알려진 지방, 골격근 조

직에서 포도당의 흡수를 매개하는 단백질로 알려진 glucose transporter 4(GLUT4)가 발현되어 포도당의 흡수가 일어난다<sup>7)</sup>.

GLUT4는 세포질에 존재하다가 인슐린의 자극이 있을 경우 세포막으로 이동하여 포도당의 흡수를 매개한다<sup>8,9)</sup>. 최근의 연구에 의하면 GLUT4의 세포막으로의 이동 이전에 AMP-activated protein kinase (AMPK)가 관여하는 것으로 보고되었다<sup>10)</sup>.

그 동안 지방세포와 관련된 연구는 대부분 3T3-L1 지방세포를 이용해왔으나, 지속적인 계대 배양이 어렵고 지방세포로 분화시키는데 8-10일 정도가 소요되는 단점이 있어 새로운 지방세포 모델의 필요성이 대두되어 왔다. 그러한 3T3-L1 지방세포의 단점을 극복하고자 마우스에서 OP9 세포주가 제작되어 지방세포를 이용한 많은 연구에 이용되고 있다<sup>11)</sup>.

본 논문에서는 大薊 추출물(*Herba Cirsii* Extract, HCE)이 OP9 지방세포에서 포도당 흡수에 대한 효과를 조사하고 그 기전을 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 세포배양

OP9 세포주는 미국 세포주 은행 (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA; catalog no. CRL-2749)에서 구입해서 사용하였으며, 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 100

\* To whom correspondence should be addressed at : Je Ho Song

College of Natural Science, Wonkwang University, #460 Iksan Dae-ro, Iksan-city Jellabuk-do, Republic of Korea, 570-749

· E-mail : sjhao@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6895

· Received : 2014/03/25 · Revised : 2014/04/10 · Accepted : 2014/04/17

U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 함유한 MEM-α 배지에서 5% CO<sub>2</sub>를 함유하며, 37℃를 유지하는 세포배양기에서 배양하였다.

## 2. 大薊 추출물의 분리

大薊 추출물은 한국식물추출물은행(<http://extract.pdrc.re.kr>)에서 구입하여 사용하였다. 간략하게 설명하면, 大薊(Cirsii Herba, 분양번호:CA04-083)을 95% ethyl alcohol에 3일 동안 노출시킨 후 무형광 흡을 이용하여 여과한 후 침전물이 생기지 않도록 45℃에서 Rotary Evaporator(N-1000SWD, EYELA, JAPAN)를 이용하여 농축한 다음 건조하고, 그 추출물을 -4℃에서 보관한다.

## 3. 지방세포 분화 유도

1.5×10<sup>5</sup>cells/ml의 OP9 세포를 2일 동안 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 MEM-α 배지에서 배양한 후 분화를 유도하였다. 분화 유도는 10% FBS, 175 nM insulin, 0.25 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin을 함유한 MEM-α 배지에서 2일 동안 배양한 후 10% FBS, 175 nM insulin, 2 mM L-glutamine, 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 함유한 MEM-α 배지에서 3일 동안 배양하였다.

## 4. 세포 독성 시험 (EZ-CyTox assay)

OP9 세포를 2×10<sup>5</sup>cells/ml의 농도로 96 well plate에 이식한 후 다양한 농도의 大薊 추출물을 처리한 후 배양하였다. 정해진 시간 동안 大薊 추출물을 노출시킨 후 10 µl의 EZ-CyTox 용액(Daeil Lab Service Co., Ltd, Seoul, Korea)을 각 well에 첨가한 후 3시간 동안 37℃를 유지하는 세포배양기에 배양한 후 ELISA reader (Molecular Device, USA)로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

## 5. Glucose uptake assay

12 well에서 분화된 OP9 세포를 2시간 동안 serum starvation 시킨 후 10 nM insulin (positive control) 또는 다양한 농도의 大薊 추출물을 처리한 후 37℃ 배양기에서 각각 60분, 24시간 동안 배양하였다. 정해진 시간 동안 大薊 추출물을 노출시킨 후 PBS로 wash한 다음 0.25 µCi/ml 2-deoxy D-[3H]-glucose가 포함된 Krebs-Ringer-Pphosphat (KRP) buffer (pH7.4) containing 121 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM HEPES를 첨가했다. 5분 후 ice-cold PBS로 3번 washing 한 후 1% SDS 로 세포를 분해시켰다. Liquid scintillation counter (Beckman Coulter, LS6500, Fullerton, CA, USA)로 동위원소를 측정하였다.

## 6. Western blot analysis

분화가 된 OP9 cells (4.5 × 10<sup>5</sup>/ml)을 serum starvation 2시간 시킨 후 insulin 100nM, 大薊 추출물 100 µg/ml을 조건에 따른 시간동안 처리 한 후에 37℃ 배양기에서 배양하였다. 세포내 단백질은 M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 분리하였다. Plasma Membrane은 EzSubcell Extract kit(ATTO Corporation, Japan)을 사용하여 얻었다. 단백질의 농도는 Bradford method을 사용하여 조사하였다. 샘플 (20 µg)은 12% 아크릴아마이드와 함께 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 분리하였고, Hybond TM-polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 이동하였다. 각각의 membrane은 2% bovine serum albumin 또는 5% skim milk 를 사용하여 2시간 동안 블로킹 하였고, 일차항체는 1:2000으로 희석하여 4℃ 냉장고에서 24시간 동안 노출시켰다. 이차항체는 HRP-conjugated IgG (1:2000 dilution)를 사용하였다. 단백질 발현양은 image analyzer (Fuji-Film, Tokyo, Japan)를 사용하여 확인하였다.

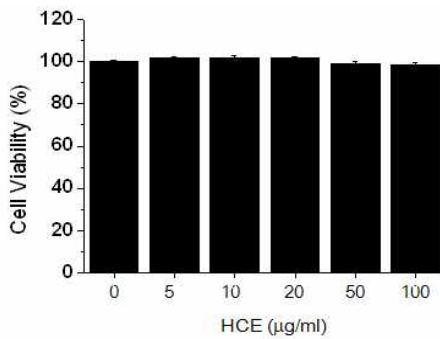
## 7. 통계처리

실험 결과는 mean±S.E.M으로 표시하였으며 유의성의 검정은 One-Way Anova test (Microcal Origin; version6.0; Microsoft; USA)에 의하였으며 p< 0.05인 것만 유의한 것으로 하였다.

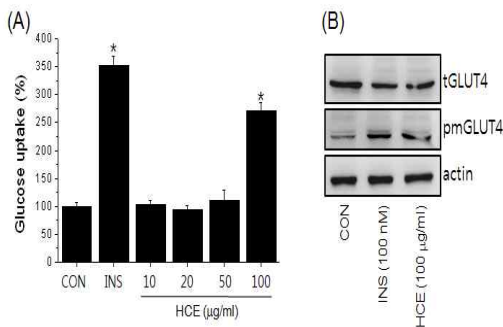
## 결 과

다양한 농도 (0-100 µg/ml)의 大薊 추출물을 OP9 지방세포에 처리한 후 세포 독성을 조사한 결과 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1). 세포 독성이 나타나지 않은 농도에서 포도당 흡수에 대한 효과를 조사하기 위하여 5일 동안 분화시킨 OP9세포에 10, 20, 50, 100 µg/ml의 大薊 추출물을 24시간 동안 처리하였으며 양성대조군으로 100 nM insulin(INS)을 처리하였다. 그 결과 100 µg/ml의 大薊 추출물을 처리한 군에서 대조군과 비교하여 유의한 포도당 흡수의 증가를 나타냈으며, 이러한 효과는 insulin을 처리한 군과 유사하였다(Fig. 2A). 포도당 흡수능 증가는 GLUT4의 세포막으로의 이동을 의미한다. 大薊 추출물 처리군의 plasma membrane에서 GLUT4검출이 INS처리 군과 비슷한 양상을 보였다(Fig. 2B). 大薊 추출물의 포도당 흡수 증가에 대한 기전을 조사하기 위하여 100 µg/ml 大薊 추출물을 10분, 1시간 동안 처리 후 배양하기 2시간 전에 insulin 신호 전달기전과 관련된 단백질로 알려진 Akt/P13K의 억제제 LY294002, extracellular signal-regulated kinase(ERK1/2)의 억제제 PD980509, AMP-activated protein kinase(AMPK)의 억제제 compound C를 처리한 후 포도당 흡수능에 대한 효과를 조사하였다. 그 결과 LY294002를 처리한 군에서는 大薊 추출물의 포도당 흡수능 증가 효과에 대하여 변화가 나타나지 않았으나, PD980509와 compound C를 전처리한 군은 大薊 추출물에 의한 포도당 흡수의 증가가 유의하게 억제되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 단백질

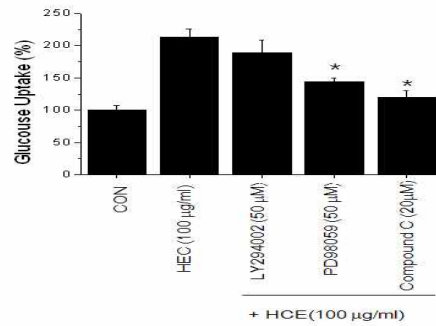
발현양상을 조사한 군에서도 확인되었다. Fig. 4A에서 나타났듯이 100 nM insulin(INS)을 처리한 군에서는 AKT의 인산화가 일어났으나 대개 추출물을 처리한 군에서는 AKT의 인산화가 일어나지 않았다. 반면에 양성대조군인 berberine(AMPK activator)를 처리한 군에서는 AMPK의 인산화가 일어났다. 대개 추출물은 100 nM insulin(INS)을 처리한 실험군과 비슷하게 extracellular signal-regulated kinase(ERK1/2)의 인산화를 나타내고 있으나 대개 추출물에 의한 ERK1/2 인산화는 PD980509를 처리함으로써 감소되는 경향을 보여주었다(Fig. 4B). AMPK의 억제제인 compound C에 의한 포도당의 흡수능은 감소하였으나(Fig. 3), Fig. 4C에서 보여주듯이 대개 추출물에 의한 AMPK의 인산화 증가는 compound C에 의해 억제되지 않았다. 대개 추출물을 compound C와 함께 처리할 경우 OP9 지방세포의 모양이 변화되는 것이 관찰되는데(data not shown), 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.



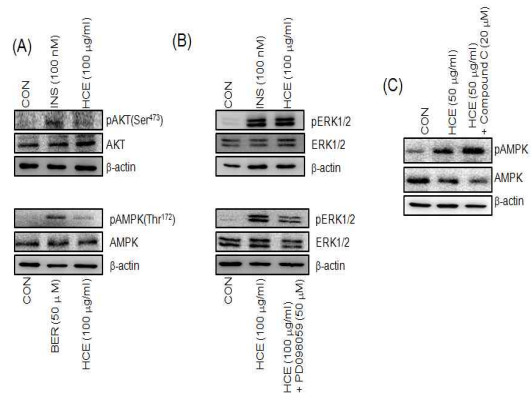
**Fig. 1. Effects of Herba Cirsii Extract(HCE) on cell viability in OP9 cells.** Cells were treated with various concentrations of HCE for 24 hours after differentiations were completed. For differentiation of OP9 cells, cells were cultured in MEM- $\alpha$  medium containing 175 nM insulin, 0.25  $\mu$ M dexamethasone and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine for 2 days, and then in MEM- $\alpha$  medium containing 175 nM insulin for 3 days. The cell viability was evaluated by EZ-CyTox assay as described in Materials and Methods. Data are mean  $\pm$  SD values of at least three independent experiments.



**Fig. 2. Effects of Herba Cirsii Extract(HCE) on glucose uptake in OP9 cells.** OP9 cell differentiation conditions are same as Fig. 1 legends. (A)After differentiation, OP9 adipocytes were treated with 100 nM insulin (INS) and various concentrations of HCE for 24 hours. Glucose uptake assay were accomplished as described in Materials and Methods. (B)After differentiation, OP9 adipocytes were treated with 100 nM insulin (INS) and HCE(100ug/ml) for 1 hours. Plasma Membrane proteins was obtained by using ATTO EzSubcell Extract kit. Data are mean  $\pm$  SD values of at least three independent experiments. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01 vs. CON group. CON: control, INS: 100nM insulin.



**Fig. 3. Effects of inhibitors on Herba Cirsii Extract(HCE)-induced glucose uptake increase in OP9 cells.** OP9 cell differentiation conditions are same as Fig. 1 legends. After differentiation, OP9 adipocytes were pretreated with LY294002, PD980509, and compound C for 2 hour, and then treated with 100  $\mu$ g/ml HCE for 24 hours. Glucose uptake assay were accomplished as described in Materials and Methods. Data are mean  $\pm$  SD values of at least three independent experiments. \*, p<0.05 vs CON group; #, p<0.05 vs FPLE group. CON: control.



**Fig. 4. Effects of Herba Cirsii Extract(HCE) on glucose uptake-involved signal molecules in OP9 cells.** OP9 cell differentiation conditions are same as Fig. 1 legends. (A) OP9 adipocytes were treated with 100 nM insulin (INS) or berberine(Ber) 50uM and 100  $\mu$ g/ml HCE for 30 mins, 4hrs and 1hrs, respectively. (B) Differentiated OP9 were treated with 100 nM insulin (INS) or 100ug/ml HCE for 10mins. PD098059 was pretreated for 2hrs before add HCE. HCE induced ERK activation in adipocytes. (C) Differentiated OP9 were treated with 100ug/ml HCE for 60mins. Compound C was pretreated for 2hrs before add HCE. The Western blots for proteins detection were carried out as described in Materials and Methods.

## 고찰

비만과 인슐린 저항성(insulin resistance)은 제2형 당뇨병의 특징이다. 특히 인슐린 저항성은 제2형 당뇨병과 다양한 부작용을 일으키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>12,13</sup>. 많은 연구들에서 인슐린 수용체(insulin receptor), PI3Ks(phosphatidylinositol 3-kinases), GLUT4와 같은 인슐린 신호 전달 단백질들이 포도당 대사과 인슐린 저항성을 유발하는데 중요한 물질임이 보고되고 있다<sup>14,15</sup>. 이번 연구에서 지방 세포로 분화를 시킨 OP9세포에서 100 ug/ml 대개 추출물을 처리한 군에서 포도당 흡수능이 증가함을 확인하였다(Fig. 2A). 이러한 대개 추출물에 의한 포도당의 흡수능의 증가는 세포 안으로 포도당을 전달해주는 glucose transporter 4(GLUT4)의 세포막으로 이동에

의한 것임이 확인되었다(Fig. 2B). 이러한 大薊 추출물의 포도당 흡수능 증가 효과 기전을 조사하기 위하여 다양한 억제제들을 전 처리한 후 大薊 추출물을 처리하여 포도당 흡수능에 대한 효과를 조사한 결과 PI3K 억제제인 LY294002에서는 大薊 추출물의 포도당 흡수능 증가에 대한 억제효과가 관찰 되지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과는 大薊 추출물 포도당 흡수능에 대한 효과 기전에 인슐린 신호 전달기전인 Akt/PI3K가 관여하지 않음을 시사한다. 인슐린 신호 전달 기전 중의 하나로 알려진 Akt의 인산화 역시 大薊 추출물 의해 나타나지 않았다(Fig. 4A). 그러나 AMPK 인산화의 양성 대조군(berberine)과 비교했을 때 大薊 추출물을 처리한 군에서도 AMPK의 인산화를 관찰할 수 있었다(Fig. 4A). 또한 ERK1/2 억제제인 PD980509와 AMPK 억제제인 compound C를 전처리한 군에서는 HCE의 포도당 흡수능 증가 효과가 억제되었다(Fig. 3). ERK1/2 억제제인 PD059098을 처리한 군에서 ERK1/2의 인산화가 감소되는 경향을 관찰하였다(Fig. 4B). 최근의 연구에 의하면 활성화된 AMPK는 세포질에서 세포막으로의 GLUT4의 이동을 억제하는 AS160 단백질을 불활성화 시킴으로서 GLUT4의 세포막으로의 이동을 억제하는 것으로 보고되었다<sup>16)</sup>. 또한 GLUT4의 세포막 이동 기전에 AMPK의 하위 신호 전달기전으로서 ERK의 활성화가 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. 이는 大薊 추출물의 포도당 흡수능 증가효과는 AMPK의 활성화를 통한 GLUT4의 세포막으로의 이동에 기인한 것으로 사료된다.

大薊 추출물을 지방세포에 처리하기 2시간 전에 AMPK 억제제인 compound C를 전처리한 후 大薊 추출물을 처리할 경우 AMPK의 인산화를 확인하였다(Fig. 4C). 그 결과 compound C를 처리한 군에서 AMPK의 인산화가 大薊 추출물을 처리한 군과 비교했을 때 증가하는 경향을 나타냈다. Compound C는 大薊 추출물에 의한 포도당의 흡수능의 증가를 유의하게 억제하였으나(Fig. 3), AMPK의 인산화는 억제하지 않았다. 이러한 결과는 compound C에 의한 AMPK 활성화의 억제 효과이외에 다른 물질에 영향을 준 것으로 사료되며 이에 대한 연구가 필요하다.

## 결 론

지금까지 大薊 추출물에 대한 실험적 연구 보고들은 항산화 효과와 간섬유화에 대한 억제 효과가 알려져 있으나 당뇨병에 대한 연구는 없었다. 위 논문의 연구 결과 大薊 추출물이 제2형 당뇨병의 가장 큰 특징인 인슐린 저항성을 개선시키는데 실험적으로 효과가 있으며 그 기전에 ERK1/2와 AMPK의 활성화가 관여한다는 보고로 다양한 동물 모델에서 효과적인 결과를 나타낸다면 제2형 당뇨병 치료제를 개발하는데 중요한 한약 추출물 후보 물질이 될 것으로 사료된다.

## 감사의 글

“이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2011-

0013528)”

## References

1. 신민교. 임상본초학. 서울, 남산당, pp 495-496, 1986.
2. 박성규, 이은주, 길재호, 배현수, 홍무창, 신민규. DMN으로 유발된 흰쥐의 간섬유화에 미치는 大薊의 효과. 동의생리병리학회지 18(2):413-418, 2004.
3. 이정주, 문진영. 大薊 약침액의 항산화 효능. 대한경락경혈학회지 22(4):57-65, 2005.
4. 이정주, 문진영. 간수·중완의 大薊 약침이 급성 산화적 간손상에 미치는 효과. 대한경락경혈학회지 20(4):41-52, 2003.
5. Krentz, A.J. Insulin resistance. BMJ 313: 1385-1389, 1996.
6. Cefalu, W.T. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. Exp Biol Med 226: 13-26, 2001.
7. James, D.E., Brown, R., Navarro, J., Pilch, P.F. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. Nature 333: 183-185, 1998.
8. Cushman, S.W., Wardzala, L.J. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. J Biol Chem 255: 4758-4762, 1980.
9. Marette, A., Richardson, J.M., Ramlal, T., Balon, T.W., Vranic, M., et al. Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. Am J Physiol 263: C443-452, 1992.
10. Fujii, N., Jessen, N., Goodyear, L.J. AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. Am J Physiol Endocrinol Metab 291: E867-877, 2006.
11. Wolins, N.E., Quaynor, B.K., Skinner, J.R., Tzekov, A., Park, C., et al. OP9 mouse stromal cells rapidly differentiate into adipocytes: characterization of a useful new model of adipogenesis. Journal of Lipid Research 47: 450-460, 2006.
12. Abdin, A.A., Baalash, A.A and Hamooda, H.E. Effects of rosiglitazone and aspirin on experimental model of induced type 2 diabetes in rats: focus on insulin resistance and inflammatory markers. J Diabetes Complications. 24: 168-178, 2010.
13. Hayden, M.R., Sowers, J.R. Treating hypertension while protecting the vulnerable islet in the cardiometabolic syndrome. J Am Soc Hypertens. 2: 239-266, 2008.
14. Fukushima, T., Arai, T., Ariga-Nedachi, M., et al. Insulin receptor substrates form high-molecular-mass complexes that modulate their availability to insulin/insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinases. Biochem Biophys Res Commun. 404: 767-773, 2011.

15. Zhu, Y., Pereira, R.O., O'Neill, B.T., et al. Cardiac PI3K-Akt impairs insulin-stimulated glucose uptake independent of mTORC1 and GLUT4 translocation. *Mol Endocrinol.* 27: 172-184, 2013.
16. Kramer, H.F., Wiczak, C.A., Fujii, N., Jessen, N., Taylor, E.B., et al. Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes* 55: 2067-2076, 2006.
17. Chen, H.C., Bandyopadhyay, G., Sajan, M.P., Kanoh, Y., Standaert, M., et al. Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-riboside (AICAR)-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 277: 23554-23562, 2002.