

필발 추출물의 포도당 흡수능에 대한 효과

김미성 · 권강범 · 송제호^{1*}

원광대학교 의과대학 대사기능제어 연구센터, 1: 원광대학교 자연과학대학 스포츠산업복지학과

Effects of *Fructus Piperis Longi* Extracts on Glucose Uptake in Adipocyte

Mi Seong Kim, Kang Beom Kwon, Je Ho Song^{1*}

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

Glucose uptake plays a pivotal role in maintaining whole body glucose homeostasis in adipocytes and skeletal muscles. In the present study we have shown that *Fructus Piperis Longi* Extracts (FPLE) can stimulate glucose uptake in OP9 adipocytes. The increasing effects of FPLE on glucose uptake were inhibited by compound C pretreatment, which means that the glucose uptake effects by FPLE were carried out by AMP-activated protein kinase (AMPK) activation. Further studies revealed that FPLE stimulated glucose transport occurs through a mechanism involving extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activation.

Key words : *Fructus Piperis Longi*, glucose uptake, adipocytes

서 론

필발은 후추과(胡椒科; Piperaceae)에 속한 多年生草質藤本인 필발의 미성숙한 科穗로 辛, 熱, 無毒하고 胃, 大腸經에 작용하며 溫中散寒, 下氣止痛의 효능이 있어 腕腹疼痛, 嘔吐 등의 병증에 치료하는 것으로 알려져 있다¹⁾.

실험적으로 필발 추출물은 OVA로 유도된 천식 모델 생쥐에서 폐포내 호산균 침윤 및 증식 억제 효과²⁾, Th1/Th2 싸이토카인 생성에 대한 억제 효과³⁾, IgE와 histamine 생성에 대한 억제 효과⁴⁾ 등이 보고되었으나 포도당 흡수능 (glucose uptake)에 대한 연구는 보고되지 않았다.

포도당 흡수는 식후에 혈중에 증가하는 포도당을 세포내로 이동시켜주는 기능으로 혈중 포도당 농도를 일정하게 유지시켜주는 데 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 포도당 흡수는 인슐린 의존적으로 지방과 골격근 조직에서 일어나며, 이 두 조직에서만 발현하는 것으로 알려진 glucose transporter 4 (GLUT4)에 의해 포도당의 흡수가 일어난다⁵⁾. GLUT4는 세포질

에 존재하다가 인슐린의 자극이 있을 경우 세포막으로 이동하여 포도당의 흡수를 매개한다^{6,7)}. 최근의 연구에 의하면 GLUT4의 세포막으로의 이동 기전에 AMP-activated protein kinase (AMPK)가 관여하는 것으로 보고되었다⁸⁾.

그 동안 지방세포와 관련된 연구는 대부분 3T3-L1 지방세포를 이용하였으나, 지속적인 개대 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 있다⁹⁾.

본 논문에서는 필발 추출물(Fructus Piperis Longi Extracts, FPLE)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 U/ml

* 교신저자 : 송제호, 전북 익산시 익산대로 460 원광대학교 자연과학대학

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

· 접수 : 2013/12/30 · 수정 : 2014/02/04 · 채택 : 2014/02/09

penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 함유한 MEM-α 배지에서 5% CO₂를 함유하며, 37°C를 유지하는 세포배양기에서 배양하였다.

2. 필발 추출물의 분리

필발 추출물은 한국식물추출물은행(<http://extract.pdrc.re.kr>)에서 구입하여 사용하였다. 간략하게 설명하면, 필발(Piperis Longi Fructus, 분양번호:CA04-079, Bar code:PBC-413A)을 95% ehtyl alcohol에 3일 동안 노출시킨 후 무형광 슝을 이용하여 여과한 후 침전물이 생기지 않도록 45°C에서 Rotary Evaporator(N-1000SWD, EYELA, JAPAN)를 이용하여 농축한 다음 건조하고, 그 추출물을 -4°C에서 보관한다.

3. 지방세포 분화 유도

1.5×10⁵ 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, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 함유한 MEM-α 배지에서 2일 동안 배양한 후 10% FBS, 175 nM insulin, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 함유한 MEM-α 배지에서 3일 동안 배양하였다.

4. 세포 독성 시험 (EZ-CyTox assay)

OP9 세포를 2×10⁵ cells/ml의 농도로 96 well plate에 이식한 후 다양한 농도의 필발 추출물을 처리한 후 배양하였다. 정해진 시간 동안 필발 추출물을 노출시킨 후 10 µl의 EZ-CyTox 용액 (Daeil Lab Service Co., Ltd, Seoul, Korea)을 각 well에 첨가한 후 3시간 동안 37°C를 유지하는 세포배양기에 배양한 후 ELISA reader (Molecular Device, USA)로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. Glucose uptake assay

12well에서 분화된 OP9 세포를 4시간 동안 serum starvation 시킨 후 100 nM insulin (positive control) 또는 다양한 농도의 필발 추출물을 처리 한 후 37°C 배양기에서 각각 30분, 24시간 동안 배양하였다. 정해진 시간 동안 필발 추출물을 노출시킨 후 PBS로 wash한 다음 0.25 µCi/ml 2-deoxy D-[³H]-glucose 가 포함된 Krebs-Ringer-Pphosphat (KRP) buffer (pH7.4) containing 121 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 0.33 mM CaCl₂, 12 mM HEPES를 첨가했다. 5분 후 ice-cold PBS로 3번 washing 한 후 1% SDS 로 세포를 분해시켰다. Liquid scintilation counter (Beckman Coulter, LS6500, Fullerton, CA, USA)로 동위원소를 측정하였다.

6. Western blot analysis

분화가 된 OP9 cells (4.5 × 10⁵/ml)을 serum starvation 4시간 시킨 후 insulin 100 nM, 필발 추출물 20 µg/ml을 30분 처리

후에 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포내 단백질은 M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 분리하였다. 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°C 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 농도의 필발 추출물(FPLE)을 OP9 지방세포에 처리한 후 세포 독성을 조사한 결과 세포 독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

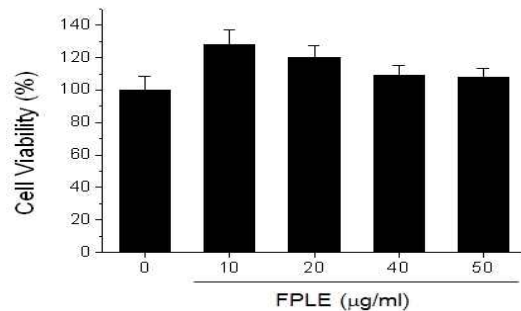


Fig. 1. Effects of Fructus Piperis Longi Extracts(FPLE) on cell viability in OP9 cells. Cells were treated with various concentrations of FPLE for 24 hours after differentiations were completed. For differentiation of OP9 cells, cells were cultured in MEM-α medium containing 175 nM insulin, 0.25 µM dexamethasone and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine for 2 days, and then in MEM-α 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 ± SD values of at least three independent experiments.

세포 독성이 나타나지 않은 농도에서 포도당 흡수에 대한 효과를 조사하기 위하여 지방세포로의 분화가 끝난 OP9세포에 10, 20, 40, 50 µg/ml의 필발 추출물을 24시간 동안 처리하였으며 양성대조군으로 100 nM insulin(INS)을 처리하였다. 그 결과 40, 50 µg/ml의 필발 추출물을 처리한 군에서 대조군에 비하여 유의한 포도당 흡수의 증가를 나타냈다(Fig. 2).

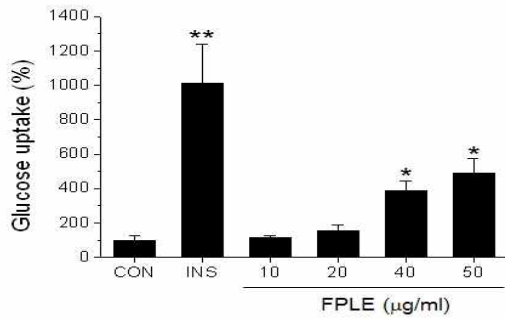


Fig. 2. Effects of Fructus Piperis Longi Extracts(FPLE) on glucose uptake in OP9 cells. OP9 cell differentiation conditions are same as Fig. 1 legends. After differentiation, OP9 adipocytes were treated with 100 nM insulin (INS) and various concentrations of FPLE for 24 hours. Glucose uptake assay were accomplished as described in Materials and Methods. Data are mean \pm SD values of at least three independent experiments. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ vs. CON group. CON: control, INS: 100nM insulin.

필발 추출물의 포도당 흡수 증가에 대한 기전을 조사하기 위하여 50 $\mu\text{g/ml}$ 필발 추출물을 24시간 동안 처리하기 1시간 전에 insulin 신호 전달기전의 억제제인 LY294002, mitogen activated protein kinase(MAPK) 억제제인 PD980509, AMP-activated protein kinase(AMPK) 억제제인 compound C를 처리한 후 포도당 흡수능에 대한 효과를 조사하였다. 그 결과 LY294002와 PD980509를 처리한 군에서는 필발 추출물의 포도당 흡수능 증가 효과에 대하여 변화가 나타나지 않았으나, compound C를 전처리한 군은 처리한 농도에 비례하여 포도당 흡수의 증가가 유의하게 억제되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 단백질 발현양상을 조사한 군에서도 확인되었다.

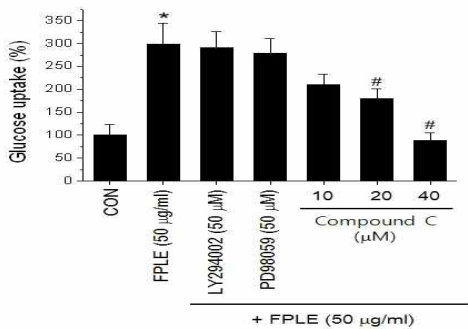


Fig. 3. Effects of inhibitors on Fructus Piperis Longi Extracts(FPLE)-induced glucose uptake increase in OP9 cells. OP9 cell differentiation conditions are same as Fig. 1 legends. After differentiation, OP9 adipocytes were pretreated with LY294002, PD980509, and compound C for 1 hour, and then treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ FPLE 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. 4A에서 나타났듯이 100 nM insulin(INS)을 처리한 군에서는 AKT의 인산화가 일어났으나 필발 추출물을 처리한 군에서는 AKT의 인산화가 일어나지 않았다. 또한 AMPK의 인산화를 저해하는 compound C를 처리한 군에서는 필발 추출물에 의한 AMPK의 인산화를 억제하였으며, 그 하위 신호 전달 단백질인 ERK의 인산화 역시 억제되었다(Fig. 4B).

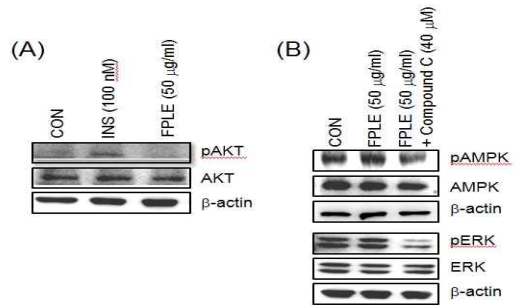


Fig. 4. Effects of Fructus Piperis Longi Extracts(FPLE) on glucose uptake-involved signal molecules in OP9 cells. OP9 cell differentiation conditions are same as Fig. 1 legends. After differentiation, (A) OP9 adipocytes were treated with 100 nM insulin (INS) and 50 $\mu\text{g/ml}$ FPLE for 30 mins. (B) OP9 adipocytes were pretreated with compound C for 1 hours, and then treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ FPLE for 60 mins. 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^{10,11}. 많은 연구들에서 인슐린 수용체(insulin receptor), PI3Ks(phosphatidylinositol 3-kinases), GLUT4와 같은 인슐린 신호전달 단백질들이 포도당 대사와 인슐린 저항성을 유발하는데 중요한 물질임이 보고되고 있다^{12,13}. 필발 추출물을 지방세포로의 분화가 끝난 OP9 세포에 처리할 경우 처리한 농도에 비례하여 세포내로의 포도당의 흡수를 증가하였다(Fig. 2). 이러한 효과는 GLUT4의 세포내로의 이동이 증가함을 시사한다. 이러한 필발 추출물의 포도당 흡수능 증가효과 기전을 조사하기 위하여 다양한 억제제들을 전 처리한 후 필발 추출물을 처리하여 포도당 흡수능에 대한 효과를 조사하였다. Fig. 3에서 나타났듯이 PI3K 억제제인 LY294002와 MAPK 억제제인 PD980509를 전 처리한 군에서는 필발 추출물의 포도당 흡수능 증가 효과를 억제하지 못하였다. 이러한 결과는 필발 추출물의 포도당 흡수능에 대한 효과 기전에 인슐린 신호 전달기전과 MAPK 기전은 관여하지 않음을 시사한다. 인슐린 신호 전달 기전 중의 하나로 알려진 AKT의 인산화 역시 필발 추출물에 의해서 일어나지 않았다(Fig. 4A). 그러나 AMPK 억제제인 compound C를 전처리한 군에서는 필발 추출물의 포도당 흡수능 증가 효과가 처리한 농도에 비례하여 억제되었다(Fig. 3). 최근의 연구에 의하면 활성화된 AMPK는 세포질에서 세포막으로의 GLUT4의 이동을 억제하는 AS160 단백질을 불활성화 시킴으로써 GLUT4의 세포막으로의 이동을 촉진하는 것으로 보고되었다¹⁴. 이는 필발 추출물의 포도당 흡수능 증가효과는 AMPK의 활성화를 통한 GLUT4의 세포막으로의 이동에 기인한 것으로 사료된다. 또한 GLUT4의 세포막 이동 기전에 AMPK의 하위 신호 전달기전으로서 ERK의 활성화가 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁵. 필발 추출물을 지방세포에 처리하기 1시간 전에 AMPK 억제제인 compound C를 전처리한 후 필발 추출물을 처리했을 때 AMPK의 인산화와 ERK의 인산

화가 억제되었다(Fig. 4B). 이러한 결과는 필발 추출물의 포도당 흡수능 증가효과에 AMPK의 활성화가 관여함을 시사한다.

지금까지 필발 추출물의 실험적 연구 보고들은 주로 알리지 반응을 억제하는 것^{2,4)}으로 알려져 있으나 당뇨병에 대한 연구는 없었다. 위 논문은 필발 추출물이 제2형 당뇨병의 원인으로 알려진 인슐린 저항성을 개선시키는데 실험적으로 효과가 있으며 그 기전에 AMPK의 활성화가 관여한다는 보고로 다양한 in vivo 모델에서 효과가 연구된다면 제2형 당뇨병 치료제의 후보 물질이 될 것으로 사료된다.

결 론

필발 추출물(Fructus Piperis Longi Extracts, FPLE)이 OP9 지방세포에서 포도당 흡수에 대한 효과를 조사하고 그 기전을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

필발 추출물은 세포독성을 나타내지 않았다. 필발 추출물은 지방세포에서 포도당 흡수를 유의하게 증가시켰다.

필발 추출물의 포도당 흡수 증가 기전에 AMPK의 활성화가 관여하였다.

이상의 결과를 토대로 in vivo, 임상 실험을 수행한다면 제2형 당뇨병 치료제로 개발될수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

“이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2011-0013528)”

참고문헌

1. 신민교. 임상본초학. 서울, 남산당, pp 316-317, 1986.
2. 이영철. OVA로 유도된 천식 모델 생쥐에 대한 필발의 폐포내 호산구 침윤 및 증식 억제효과. 대한본초학회지 19(4):17-25, 2004.
3. 이영철. OVA로 유도된 천식 모델 생쥐에서 필발의 Th1/Th2 cytokines 생성 및 유전자 발현에 미치는 영향. 대한본초학회지 20(1):1-8, 2005.
4. 이영철, 김승형. 천식 모델 생쥐에서 필발이 CD25+ T 세포수, IgE, Histamine 생성량과 in vitro에서 Th1/Th2 Cytokine Balance에 미치는 영향. 대한본초학회지 24(1):79-88, 2009.
5. 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, 1988.

6. 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.
7. 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.
8. Fujii, N., Jessen, N., Goodyear, L.J. (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. Am J Physiol Endocrinol Metab 291: E867-877, 1992.
9. 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.
10. 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: 168178, 2010.
11. Hayden, M.R. and Sowers, J.R.: Treating hypertension while protecting the vulnerable islet in the cardiometabolic syndrome. J Am Soc Hypertens. 2: 239-266, 2008.
12. 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.
13. 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.
14. Kramer, H.F., Witczak, 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.
15. 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-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport. J Biol Chem 277: 23554-23562, 2002.