

인슐린저항성 HepG2 세포에서 phillyrin의 포도당신생합성 개선효과

이승연# · 이기호# · 김미연 · 채주연 · 김재원 · 정혜광*

충남대학교 약학대학

Phillyrin Ameliorates Gluconeogenesis by Increasing the Phosphorylation of Akt and AMPK in Insulin Resistant HepG2 Cells

Seung Yeon Lee[#], Gi Ho Lee[#], Mi Yeon Kim, Ju Yeon Chae, Jae Won Kim, and Hye Gwang Jeong^{*}

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Daehak-ro 99, 34134, Korea

Abstract – Type II diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disease caused by insulin resistance, and abnormally elevated hepatic gluconeogenesis is characterized. Phillyrin, one of the major active constituents of *Forsythia suspense*, is known to possess the anti-inflammatory and anti-oxidant effects. However, the anti-diabetes mellitus effect of phillyrin and its molecular mechanisms are unclear. The aim of the current study was to investigate the role of phillyrin on gluconeogenesis in insulin resistant HepG2 cells. Phillyrin suppressed high glucose (HG)-induced glucose production. In addition, phillyrin reduced HG-induced the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose 6-phosphatase (G6Pase), major genes in hepatic gluconeogenesis. Phillyrin treatment attenuated HG-induced nucleus protein levels of FOXO1 and HDAC5 and increased the phosphorylation of Akt, AMPK, HDAC5, and FOXO1. The block of AMPK and Akt activity did not exert the inhibitory effect of phillyrin on gluconeogenesis in insulin resistant HepG2. Taken together, these results suggest that phillyrin inhibits gluconeogenesis of hepatocytes to improve glucose metabolism, through the regulation of LKB1/AMPK/HDAC5 and PI3K/AKT/FOXO1 pathway. These results indicate that phillyrin may be useful in improving hepatic gluconeogenesis associated with insulin resistant and T2DM.

Keywords – Phillyrin, Gluconeogenesis, FOXO1, Akt, AMPK

인슐린의 기능 및 분비 장애로 인한 혈중 포도당 농도의 조절이 제한되는 특징을 가진 제2형 당뇨병(type 2 diabetes mellitus)는 세계적인 만성 대사 질환문제로 인식되며 삶의 질을 저하시킨다.¹⁾ 인슐린 저항성(insulin resistance)은 인슐린 민감도의 저하, 포도당 흡수 감소를 야기하며, 특히 혈중 포도당 농도가 높음에도 불구하고 간세포에서의 포도당 신생합성(gluconeogenesis) 과정을 촉진시켜 고혈당증을 유발한다.²⁾ 간의 포도당신생합성 증가로 인한 고혈당증은 제2형 당뇨병의 초기 주요 병태생리학적 요인으로 보고되며, 궁극적으로 췌장의 베타세포(β -cells)의 손상 및 세포 사멸(apoptosis) 유도를 통해 혈중 포도당 농도를 지속적으로 높게 유지하도록 함으로써 제2형 당뇨병의 발병 및 진행을 촉진시킨다.³⁾ 따라서 인슐린 저항성에서 포도당신생합성의 역할은 고혈당증 조절에서 매우 중요한 역할을 하며 제2형 당

뇨의 예방 및 개선에 필수적인 치료전략으로 제시되어 왔다.

인슐린 저항성은 Forkhead Box O1(FOXO1)의 전사활성을 증가시켜 포도당신생합성에서 핵심적인 역할을 하는 포도당신생합성 효소인 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)와 glucose-6-phosphatase(G6Pase)의 발현 유도를 통해 간세포에서의 포도당 생합성을 촉진시킨다.⁴⁾ 인슐린 수용체 매개 신호전달경로는 포도당 대사 조절을 통해 혈당 항상성 유지에 밀접하게 관여하며,⁵⁾ 특히 인슐린 수용체에 의해 활성이 조절되는 phosphatidylinositol 3-kinase /protein kinase B(PI3K/Akt)는 포도당신생합성 조절에서 주요 매개자 역할을 한다.⁶⁾ 세포내 에너지 센서인 AMP-activated protein kinase(AMPK)는 포도당 흡수(glucose uptake), 지방산 산화(fatty acid oxidation), 포도당신생합성 등 생체내 다양한 대사과정에 관여함으로써 인슐린 감수성 및 혈중 포도당 농도의 항상성을 조절한다.⁷⁾ 당뇨병 치료를 위해 사용되는 메트포르민(Metformin)은 세포내 AMPK의 활성을 증가시켜 포도당신생합성 관련 효소의 발현을 억제시킴으로써 간에서의

[#]These authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): hgjeong@cnu.ac.kr

(Tel): +82-42-821-5936

고혈당증을 개선시킨다고 보고되었다.⁸⁾

당개나리(*Forsythia suspensa* (Thunb.))는 오리(Oleaceae)과 식물로 노란 꽃과 열매를 피우며 한국, 중국, 일본에 걸쳐 동아시아 지역에 넓게 분포한다.^{9,10)} 연교(連翹)는 당개나리의 열매로 전통적으로 한방에서 발열, 림프선염, 중기, 습진 등의 치료에 사용되었으며,¹¹⁾ 최근 연구에서 항알러지,¹²⁾ 항산화¹³⁾ 및 항염¹⁴⁾ 효과를 나타낸다고 보고되었다. 당개나리에 존재하는 활성성분인 phillyrin은 항염증 및 항산화 효과가 나타나는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 본 연구실에서는 고혈당 유도 HepG2 세포에서 phillyrin의 지질 축적 억제효과를 보고한 바 있다.¹⁶⁾ 이러한 phillyrin 약리적인 활성에도 불구하고 제 2형 당뇨병과 관련한 phillyrin의 포도당신생합성에 대한 억제 효과 및 작용 기전 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 고농도의 포도당(High glucose, HG)으로 유도된 인슐린 저항성 HepG2 세포에서 phillyrin의 포도당신생합성에 대한 억제 효과 및 관련 작용 기전에 대한 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약 - Minimum Essential Media(MEM)과 FBS(Fetal bovine serum)는 Welgene Bioscience(Gyeongsan, Korea)사에서 구입하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)와 Cytotoxicity Detection Kit(LDH), Phillyrin($\geq 98\%$ HPLC), Dorsomorphin(Compound C; $\geq 95\%$ HPLC), LY294002($\geq 98\%$ HPLC)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사에서 구입하여 사용하였다. G6Pase, PEPCk, HDAC5, IRS-1, p-IRS-1(Ser307), Lamin B1 및 β -actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입했다. p-HDAC5(Ser498), FOXO1, p-FOXO1(Ser256), Akt, p-Akt(Ser473), LKB1, p-LKB1(Ser428), AMPK, p-AMPK(Thr172)에 대한 항체 및 2차 항체(HRP-linked anti-rabbit IgG)는 Cell Signaling Technologies(Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, enhanced chemiluminescence(ECL) 용액은 Advansta Inc.(San Jose, CA, USA)에서 구입하였다.

세포배양 및 인슐린저항성 모델 - 인간 간세포 HepG2 세포는 American Type Culture Collection(Bethesda, MD, USA)에서 얻었다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 MEM 배지에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 사용하여 배양하였다. 인슐린저항성 모델은 Xia 등의 연구에서 보고한 방법을 참조하였다.¹⁷⁾ 요약하면, HepG2 세포가 80% 정도 찬 상태에서 50 mM 포도당이 함유된 MEM 배지로 교환하여 24시간 동안 배양한 후 세포를 회수하기 전에 100 nM의 인슐린을 10분 동안 추가로 처리하였다.

세포 독성 측정 - HepG2 세포에서 phillyrin의 세포 독성을 확인하기 위하여 MTT 측정 키트와 LDH 측정 키트를 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 HepG2 세포를 48 well plate에서 배양 후 phillyrin을 농도 별로 희석하여 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 0.2 mg/ml 농도의 MTT 용액 500 μ L씩 각 well에 분주하고 반응시킨 후 상층액을 제거하고, 100 μ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 마이크로플레이트 분석기(BioTek Synergy HT microplate reader, BioTek Instruments, winooski, vt)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 같은 조건으로 배양된 세포를 96 well plate에 50 μ L씩 분주하고 LDH 측정 키트 혼합 용액 50 μ L씩 분주하여 반응시킨 후, 마이크로플레이트 분석기로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot 분석 - HepG2 세포를 60 mm dish에서 배양하고 phillyrin을 농도 별로 처리한 후 phosphate-buffered saline(PBS)를 이용하여 수집하였다. 세포는 CETi lysis buffer(120 mM NaCl, 40 mM Tris pH 8, 0.1% NP40)를 얼음에서 30분 동안 용해하고 13,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 채취하였다. 채취한 상층액은 protein assay kit(Pro-Measure, iNtRON Biotechnology, Seongnam, Gyeonggi, Korea)을 사용하여 595 nm에서 단백질 농도를 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 5분 끓이고 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에 전기영동한 후, PVDF membrane(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)으로 이동시켰다. Membrane을 실온에서 약 1시간 동안 5% skim milk로 blocking하고 1차 항체를 4°C에서 overnight으로 반응시킨 후, 2차 항체를 상온에서 3시간동안 반응시켰다. 단백질을 ECL 용액으로 반응시키고 LAS-4000 mini(Fujifilm Life Science, Cambridge, MA)을 이용하여 발현을 분석하였다.

Quantitative real-time PCR 분석 - HepG2 세포를 6 well plate에서 배양하고 phillyrin을 농도 별로 처리한 후 RNAiso reagent(Takara, Japan)을 이용하여 RNA를 수집하고 추출하였다. 추출된 RNA는 Nanodrop 기기를 사용하여 농도 및 순도를 측정하고 reverse transcription system을 사용하여 cDNA를 합성하였다. Applied biosystems사의 7500 Real Time PCR system을 이용하여 Real-time PCR을 수행하였다. Housekeeping gene으로는 GAPDH를 사용하였고 각 유전자의 mRNA 수준은 GAPDH와 비교하여 정규화되었다. 사용된 각 프라이머의 sequence는 다음과 같다. GAPDH forward primer: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3', GAPDH reverse primer: 5'-CTCCCGTTCTCAGCCATGTA-3', G6Pase forward primer: 5'-GCTGTGATTGGAGACTGGCTCA-3', G6Pase reverse primer: 5'-GTCCAGTCTCACAGGTTACAGG-3', PEPCk forward primer: 5'-CATTGCCTGGATGAAGTTTCAG-

3', PEPCK reverse primer: 5'-GGGTTGGTCTTCACTGAAGTCC-3'.

포도당 생성 측정 - HepG2 세포를 12 well plate에서 배양한 후 FBS free MEM으로 배지를 교체한 후 phillyrin을 농도 별로 처리하여 배양하여 HepG2 세포에서 phillyrin의 포도당신생합성에 대한 영향을 조사하였다. 그 후 포도당이 없는 MEM 배지에 20 nM sodium lactate, 2 mM sodium pyruvate를 첨가한 배지로 교체하여 세포배양기에서 3시간 동안 배양한 다음 배지를 회수하여 포도당 측정 키트 (Biovision, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리 - 통계는 GraphPad InStat@Version 3.06(GraphPad Software Inc, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 결과의 통계적 유의성은 one-way ANOVA 분석을 시행하였고, Tukey-Kramer test를 사용하여 평가하였으며, 유의성은 $p < 0.01$ 수준에서 검정하였다. 통계적인 분석을 위해 본 연구는 3회 이상 반복 수행하여 얻어진 시험결과는 평균치와 표준편차로 표시하였다.

결과 및 고찰

인슐린 저항성은 생체내 인슐린 감수성이 정상보다 저하되어 있는 상태로, 비만 및 고지방식으로 인한 내당능장애

로부터 야기되고 혈당의 상승과 함께 제2형 당뇨병의 진행을 촉진시킨다.¹⁸⁾ 본 연구에서는 phillyrin이 HG로 유도된 인슐린 저항성 HepG2세포에서 포도당신생합성에 미치는 영향 및 작용 기전에 대한 영향을 평가하였다. 먼저, HepG2 세포에서 phillyrin의 세포 독성에 대한 영향을 조사하기 위해 MTT 및 LDH 분석을 실시한 결과, phillyrin 1-50 μ M 농도에서 세포 생존율 및 세포 독성에 대한 영향은 나타나지 않았다(Fig. 1B, 1C). 따라서 이후 실험은 독성이 나타나지 않은 10-30 μ M 농도에서 실시하였다.

제2형 당뇨병을 유발하는 인슐린 저항성은 간에서 비정상적으로 포도당신생합성을 증가시켜 고혈당증을 유도한다.¹⁹⁾ G6Pase와 PEPCK는 포도당신생합성에서 중요한 역할을 하는 효소로, 본 연구결과에서 phillyrin은 HG로 유도된 G6Pase 및 PEPCK의 mRNA와 단백질 발현을 효과적으로 감소시켰으며(Fig. 2A-C), HG 유도 인슐린저항성 HepG2 세포에서 유의하게 포도당 생산을 억제하였다(Fig. 2D). FOXO1은 간에서 인산화 및 아세틸화를 통해 핵내 이동 및 전사활성이 조절되며,²⁰⁾ G6Pase 및 PEPCK 유전자 프로모터에 직접적으로 결합하여 유전자 발현을 증가시킴으로써 포도당신생합성에 밀접하게 관여한다.²¹⁾ 본 연구결과에서 phillyrin의 처리는 HG로 유도된 FOXO1 및 HDAC5의 핵 내 수준을 감소시켰으며(Fig. 3A), HG로 감소된 HDAC5 및 FOXO1의 인산화를 현저하게 증가시켰다(Fig. 3B). FOXO1 및 HDAC5

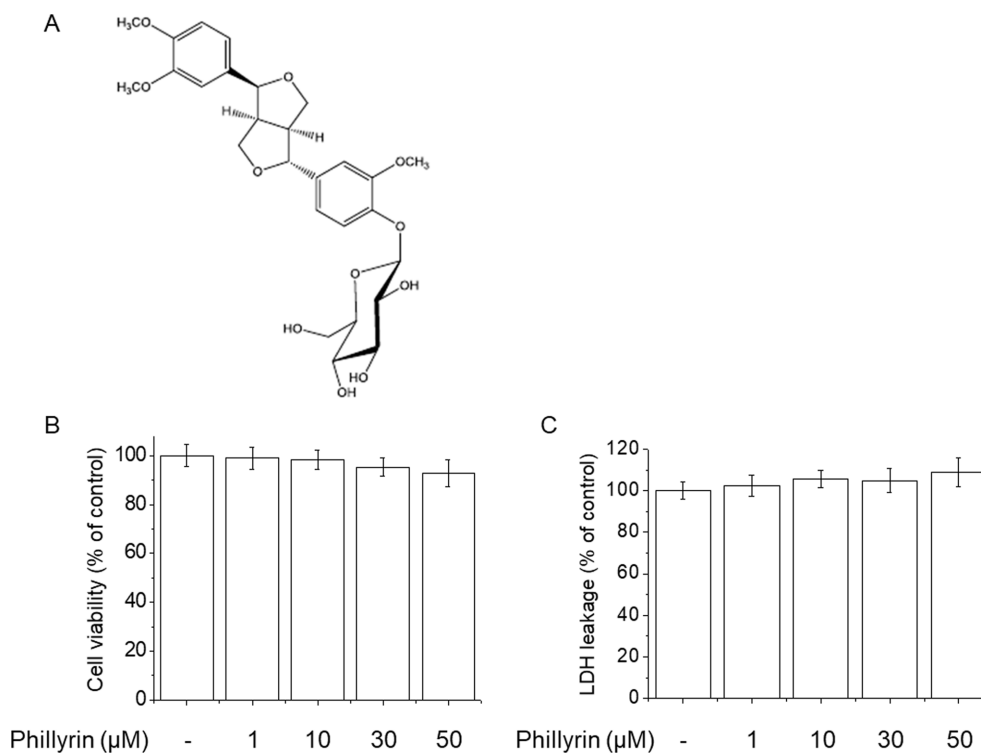


Fig. 1. Effects of phillyrin on the cell viability and cytotoxicity of HepG2 cells. Cells were treated with 1-50 μ M phillyrin for 24 h. (A) Chemical structure of phillyrin. (B) Cell viability and (C) cytotoxicity were measured by MTT and LDH assay.

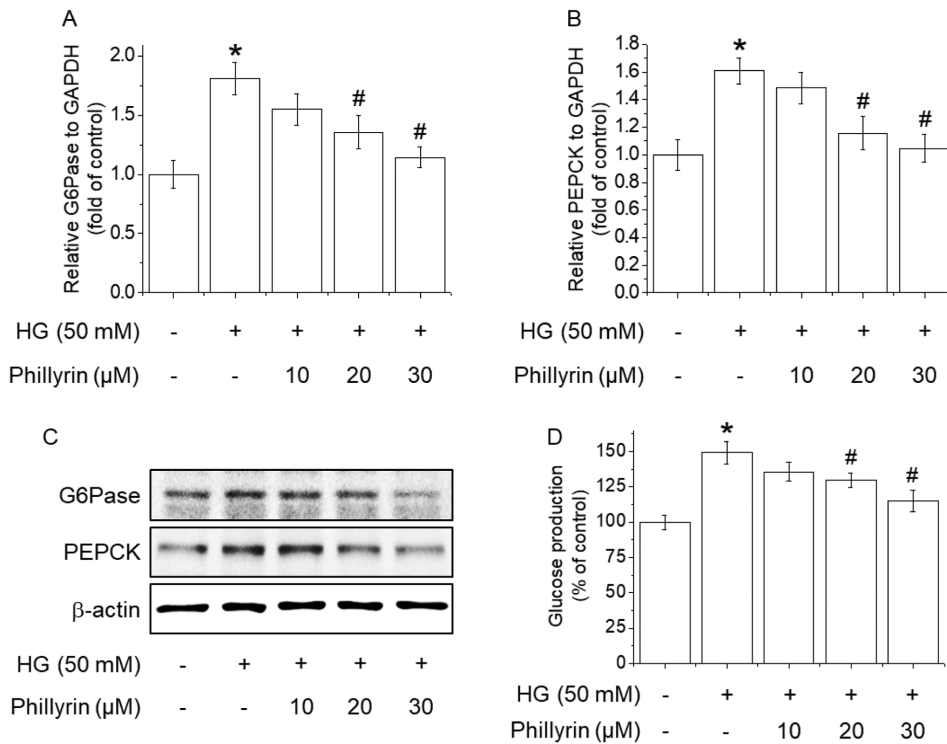


Fig. 2. Effect of phillyrin on the G6Pase and PEPCK expression, and glucose production in insulin resistant HepG2 cells. Cells were seeded and cultured in MEM medium to about 80% confluence. After overnight serum starvation, cells were incubated in serum-free MEM for 24 h without or with 10-30 μM phillyrin in the absence or presence of high glucose. (A, B) PCR image showing mRNA expression of G6Pase and PEPCK, (C) western blot image showing G6Pase and PEPCK proteins, (D) glucose production. The data shown are the means of three independent experiments. *Significantly different from control at P < 0.01. #Significantly different from high glucose-treated cells at P < 0.01.

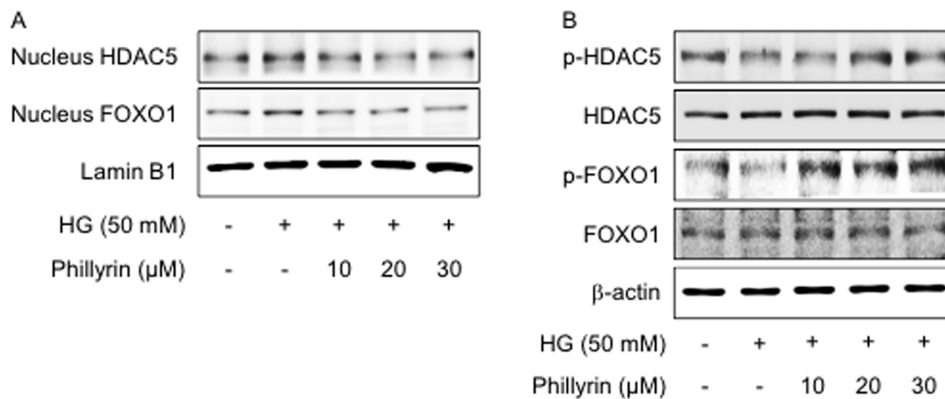


Fig. 3. Effect of phillyrin on the nucleus protein level and phosphorylation of FOXO1 and HDAC5 in insulin resistant HepG2 cells. Cells were seeded and cultured in MEM medium to about 80% confluence. After overnight serum starvation, cells were incubated in serum-free MEM for 1 h without or with 10-30 μM phillyrin in the absence or presence of high glucose. (A) Western blot image showing HDAC5 and FOXO1 nucleus proteins levels, and (B) the phosphorylation of HDAC5 and FOXO1.

의 인산화는 이들의 핵내 이동을 억제하는 것으로 알려져 있다.²²⁻²⁴ 또한, HDAC5를 비롯한 Class IIa histone deacetylases (HDACs)는 FOXO1의 탈아세틸화를 통해 전사활성을 유도함으로써 간의 포도당신생합성을 증가시킴이 보고되었다.^{24,25} 본 연구 결과들은 phillyrin이 FOXO1의 핵내 수준을 감소

시키고 G6Pase 및 PEPCK의 발현을 억제하여 HG로 유도된 인슐린저항성 HepG2에서 포도당신생합성을 억제할 수 있으며, HDAC5에 의한 FOXO1의 탈아세틸화가 기여할 수 있음을 시사한다.

FOXO1의 전사활성은 PI3K/Akt 및 AMPK 신호경로에

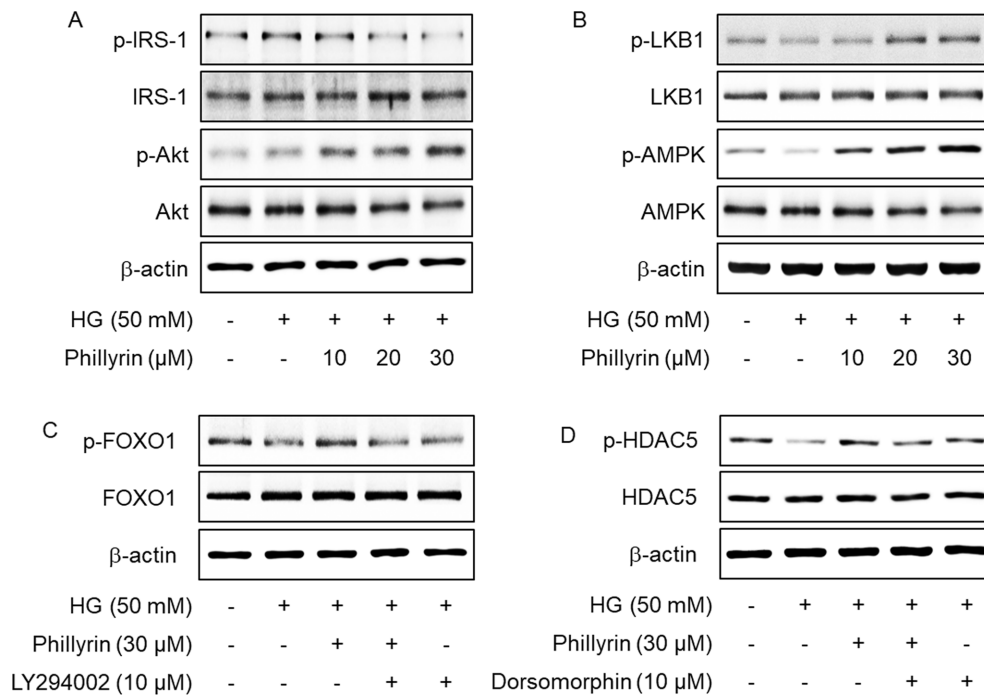


Fig. 4. Effect of phillyrin on Akt and AMPK phosphorylation in insulin resistant HepG2 cells. Cells were seeded and cultured in MEM medium to about 80% confluence. (A, B) After overnight serum starvation, cells were incubated in serum-free MEM for 1 h without or with 10-30 μM phillyrin in the absence or presence of high glucose. IRS-1, Akt, LKB1 and AMPK phosphorylation were measured by western blotting. (C, D) Cells were pre-treated with LY204002 10 μM or Dorsomorphin 10 μM for 1 h, and then were incubated in serum-free MEM for 1 h without or with 30 μM phillyrin in the absence or presence of high glucose. FOXO1 phosphorylation and HDAC5 phosphorylation were measured by western blotting.

의해 조절된다.^{26,27)} FOXO1의 상위 조절자인 Akt는 간 및 골격근의 글리코겐 침착, 지방 생성 자극 및 지방 분해 억제, 간에서의 포도당 생성 억제와 같은 인슐린의 많은 대사 작용과 관련이 있다.^{28,29)} 본 연구결과에서 phillyrin은 HG로 유도된 HepG2세포에서 IRS-1의 Ser307 인산화는 억제시켰으나, Akt 인산화를 유의적으로 증가시켰다(Fig. 4A). 또한, PI3K/Akt 억제제인 LY294002의 처리는 phillyrin에 의해 증가된 FOXO1의 인산화를 억제하였으며, phillyrin에 의해 감소된 G6Pase, PEPCK의 유전자 발현과 포도당신생합성을 증가시켰다(Fig. 4C 및 Fig. 5A, 5C). HG는 인슐린 수용체 기질 1(IRS1)의 Ser307 인산화를 유도하여 IRS1의 기능을 억제시키고 인슐린 저항성을 야기하는 것으로 알려져 있다.³⁰⁾ 감식초 유래 폴리페놀은 인슐린 저항성 모델에서 IRS1의 Ser307 인산화를 억제시키고 IP3K/Akt 신호경로를 활성화하여 간세포의 포도당 소비와 포도당신생합성을 개선시킨다고 보고되었다.¹⁷⁾ PI3K/Akt 신호경로는 FOXO1의 인산화를 증가시켜 FOXO1의 전사활성을 억제함으로써 G6Pase 및 PEPCK의 발현 감소를 통해 포도당신생합성을 억제하는 것으로 알려져 있다.³¹⁾ 또한, FOXO1의 전사활성은 Class IIa HDAC에 의한 탈아세틸화에 의해서 조절되며,²⁵⁾ Class IIa HDAC의 한 종류인 HDAC5는 AMPK에 의해 인산화되어

세포질에서 핵내 이동이 억제됨으로써 FOXO1의 전사활성을 감소시키고 포도당신생합성관련 유전자의 발현을 억제함이 보고되었다.^{24,32)} 본 연구에서 HG로 감소된 LKB1 및 AMPK 인산화가 phillyrin에 의해 증가됨을 확인하였다(Fig. 4B). 또한, AMPK 억제제인 Dorsomorphin(Compound C)의 처리는 phillyrin에 의해 증가되었던 HDAC5의 인산화가 억제되었으며, phillyrin의 G6Pase 및 PEPCK mRNA 발현 억제 효과가 상쇄되었다(Fig. 4D 및 Fig. 5B). 그리고 AMPK 억제제인 Dorsomorphin의 처리는 phillyrin의 포도당신생합성 억제효과를 저해하였다(Fig. 5C). Baicalin은 PI3K/Akt 및 AMPK신호전달 경로를 통하여 G6Pase 및 PEPCK 발현을 억제함으로써 인슐린 저항성 HepG2 세포 모델에서 포도당신생합성 개선 효능이 보고되었다.³³⁾ 또한, *Spirulina* 해조류 추출물인 C-Phycocyanin는 Akt 및 AMPK 신호경로를 활성화하여 FOXO1의 전사활성을 억제함으로써 포도당신생합성 효소들의 발현을 감소시켜 인슐린저항성 모델에서 포도당의 소비 및 생산을 개선시켰다.³⁴⁾ 따라서 본 연구 결과는 Akt 및 AMPK 신호경로가 phillyrin이 FOXO1의 전사활성을 억제하여 인슐린 저항성 모델에서 포도당신생합성을 개선시키는데 있어서 매우 중요하다는 것을 의미한다.

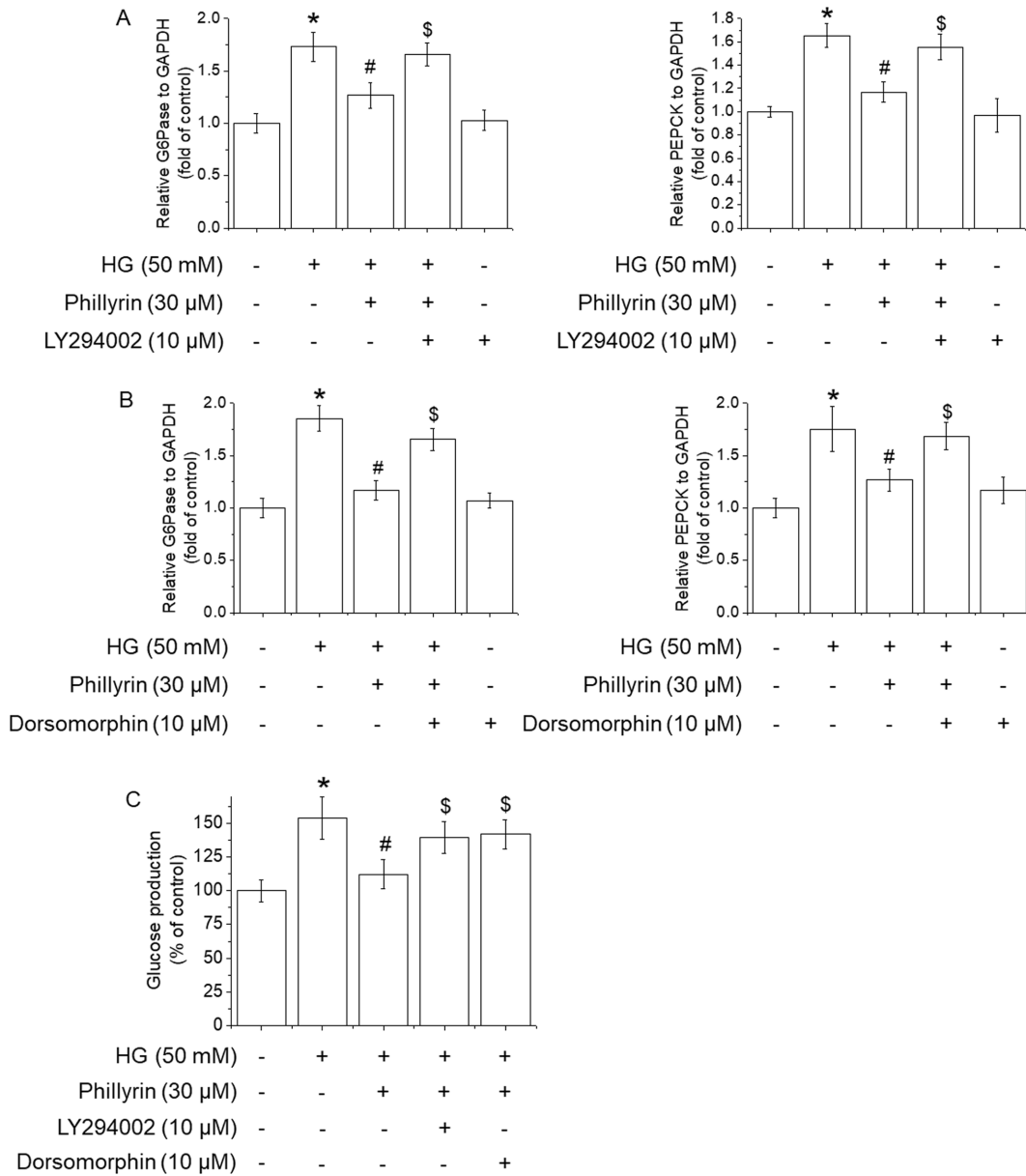


Fig. 5. Effect of phillyrin on the expression of G6Pase and PEPCK mRNA, and glucose production through Akt and AMPK signaling pathway in insulin resistant HepG2 cells. Cells were seeded and cultured in MEM medium to about 80% confluence. After overnight serum starvation, cells were pre-treated with 10 μM LY294002 or 10 μM Dorsomorphin for 1 h, and then were incubated in serum-free MEM for 24 h without or with 30 μM phillyrin in the absence or presence of high glucose. (A, B) PCR image showing mRNA expression of G6Pase and PEPCK, (C) glucose production. *Significantly different from control at $P < 0.01$. #Significantly different from high glucose-treated cells at $P < 0.01$. \$Significantly different from phillyrin-treated cells at $P < 0.01$.

결론

본 연구에서는 인슐린 저항성 HepG2 세포에서 phillyrin의 포도당신생합성에 대한 개선 효과를 조사하였다. Phillyrin은 PEPCK 및 G6Pase 발현을 감소시켰으며, HG 로 유도된 포도당신생합성을 억제하였다. Phillyrin은 Akt 인산화 증가를 통해 FOXO1의 인산화를 유도하여 핵내 이동 및 전사활성을

억제함으로써, PEPCK 및 G6Pase 발현을 감소시켰다. 또한, phillyrin에 의해 활성화된 AMPK는 HDAC5의 인산화 증가 및 핵내 이동을 억제하여, PEPCK 및 G6Pase 발현을 감소시켰다. 이러한 결과들은 phillyrin이 인슐린 저항성으로 인한 포도당신생합성을 억제하여 고혈당증을 개선시킬 수 있음을 의미하며, 인슐린 저항성 관련 질환의 예방 및 치료의 잠재적인 약물 타겟 후보가 될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 충남대학교 학술연구비에 의해 지원을 받아 수행된 연구임.

인용문헌

- Ahmad, K. (2014) Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus. *J. Tradit. Chin. Med.* **34**: 234-237.
- Aji, G., Huang, Y., Ng, M. L., Wang, W., Lan, T., Li, M., Li, Y., Chen, Q., Li, R., Yan, S., Tran, C., Burchfield, J. G., Couttas, T. A., Chen, J., Chung, L. H., Liu, D., Wadham, C., Hogg, P. J., Gao, X., Vadas, M. A., Gamble, J. R., Don, A. S., Xia, P. and Qi, Y. (2020) Regulation of hepatic insulin signaling and glucose homeostasis by sphingosine kinase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**: 24434-24442.
- Tomita, T. (2016) Apoptosis in pancreatic beta-islet cells in type 2 diabetes. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **16**: 162-179.
- Gu, L., Ding, X., Wang, Y., Gu, M., Zhang, J., Yan, S., Li, N., Song, Z., Yin, J., Lu, L. and Peng, Y. (2019) Spexin alleviates insulin resistance and inhibits hepatic gluconeogenesis via the FoxO1/PGC-1alpha pathway in high-fat-diet-induced rats and insulin resistant cells. *Int. J. Biol. Sci.* **15**: 2815-2829.
- Sharma, M. D., Garber, A. J. and Farmer, J. A. (2008) Role of insulin signaling in maintaining energy homeostasis. *Endocr. Pract.* **14**: 373-380.
- Smith, G. C. and Turner, N. (2017) FOXO1 Is the headline Akt regulating hepatic glucose metabolism. *Endocrinology* **158**: 2436-2438.
- Hardie, D. G., Ross, F. A. and Hawley, S. A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**: 251-262.
- Agius, L., Ford, B. E. and Chachra, S. S. (2020) The metformin mechanism on gluconeogenesis and AMPK activation: The metabolite perspective. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: 3240.
- Choi, I. Y., Moon, P. D., Koo, H. N., Myung, N. Y., Kim, S. J., Lee, J. H., Han, S. H., Moon, G., Seo, S. Y., Sung, H. J., Park, R. K., Jeong, H. J., Um, J. Y., Kim, H. M. and Hong, S. H. (2007) Observations of *Forsythia koreana* methanol extract on mast cell-mediated allergic reactions in experimental models. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **43**: 215-221.
- Chen, L., Yan, Y., Chen, T., Zhang, L., Gao, X., Du, C. and Du, H. (2019) Forsythiaside prevents beta-amyloid-induced hippocampal slice injury by upregulating 2-arachidonoylglycerol via cannabinoid receptor 1-dependent NF-kappaB pathway. *Neurochem. Int.* **125**: 57-66.
- Wang, Z., Xia, Q., Liu, X., Liu, W., Huang, W., Mei, X., Luo, J., Shan, M., Lin, R., Zou, D. and Ma, Z. (2018) Phytochemistry, pharmacology, quality control and future research of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl: A review. *J. Ethnopharmacol.* **210**: 318-339.
- Hao, Y., Li, D., Piao, X. and Piao, X. (2010) Forsythia suspensa extract alleviates hypersensitivity induced by soybean beta-conglycinin in weaned piglets. *J. Ethnopharmacol.* **128**: 412-418.
- Wang, T., Wen, X., Zhang, Z., Xie, M. and Zhou, J. (2021) Phillyrin ameliorates diabetic nephropathy through the PI3K/Akt/GSK-3beta signalling pathway in streptozotocin-induced diabetic mice. *Hum. Exp. Toxicol.* **40**: S487-S496.
- Lee, D. G., Lee, S. M., Bang, M. H., Park, H. J., Lee, T. H., Kim, Y. H., Kim, J. Y. and Baek, N. I. (2011) Lignans from the flowers of *Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus* and their inhibition effect on NO production. *Arch. Pharm. Res.* **34**: 2029-2035.
- Du, Y., You, L., Ni, B., Sai, N., Wang, W., Sun, M., Xu, R., Yao, Y., Zhang, Z., Qu, C., Yin, X. and Ni, J. (2020) Phillyrin mitigates apoptosis and oxidative stress in hydrogen peroxide-treated RPE cells through activation of the Nrf2 signaling pathway. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2020**: 2684672.
- Do, M. T., Kim, H. G., Choi, J. H., Khanal, T., Park, B. H., Tran, T. P., Hwang, Y. P., Na, M. and Jeong, H. G. (2013) Phillyrin attenuates high glucose-induced lipid accumulation in human HepG2 hepatocytes through the activation of LKB1/AMP-activated protein kinase-dependent signalling. *Food Chem.* **136**: 415-425.
- Xia, T., Duan, W., Zhang, Z., Fang, B., Zhang, B., Xu, B., Cruz, C. B. V. D. L., El, S. H., Simal, G. J., Wang, S., Wang, M. and Xiao, J. (2021) Polyphenol-rich extract of Zhenjiang aromatic vinegar ameliorates high glucose-induced insulin resistance by regulating JNK-IRS-1 and PI3K/Akt signaling pathways. *Food Chem.* **335**: 127513.
- Shulman, G. I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**: 171-176.
- Hatting, M., Tavares, C. D. J., Sharabi, K., Rines, A. K. and Puigserver, P. (2018) Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.* **1411**: 21-35.
- Daitoku, H., Sakamaki, J. and Fukamizu, A. (2011) Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**: 1954-1960.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C. J., Yoon, J. C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D. and Spiegelman, B. M. (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**: 550-555.
- Zhang, X., Gan, L., Pan, H., Guo, S., He, X., Olson, S. T., Mesecar, A., Adam, S. and Unterman, T. G. (2002) Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J. Biol. Chem.* **277**: 45276-45284.
- Takamura, H., Yoshida, K., Okamura, H., Fujiwara, N. and

- Ozaki, K. (2016) Porphyromonas gingivalis attenuates the insulin-induced phosphorylation and translocation of forkhead box protein O1 in human hepatocytes. *Arch. Oral. Biol.* **69**: 19-24.
24. Seo, W. D., Lee, J. H., Jia, Y., Wu, C. and Lee, S. J. (2015) Saponarin activates AMPK in a calcium-dependent manner and suppresses gluconeogenesis and increases glucose uptake via phosphorylation of CRTC2 and HDAC5. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**: 5237-5242.
25. Mihaylova, M. M., Vasquez, D. S., Ravnskjaer, K., Denechaud, P. D., Yu, R. T., Alvarez, J. G., Downes, M., Evans, R. M., Montminy, M. and Shaw, R. J. (2011) Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell* **145**: 607-621.
26. Saline, M., Badertscher, L., Wolter, M., Lau, R., Gunnarsson, A., Jacso, T., Norris, T., Ottmann, C. and Snijder, A. (2019) AMPK and AKT protein kinases hierarchically phosphorylate the N-terminus of the FOXO1 transcription factor, modulating interactions with 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.* **294**: 13106-13116.
27. Greer, E. L., Banko, M. R. and Brunet, A. (2009) AMP-activated protein kinase and FoxO transcription factors in dietary restriction-induced longevity. *Ann. NY Acad. Sci.* **1170**: 688-692.
28. Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J. and Rishi, A. K. (2011) Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**: 1978-1986.
29. Newsholme, E. A., and Dimitriadis, G. (2001) Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **109 Suppl 2**: S122-134.
30. Gual, P., Marchand, B. Y. L. and Tanti, J. F. (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* **87**: 99-109.
31. Liu, Y., Qiu, Y., Chen, Q., Han, X., Cai, M. and Hao, L. (2021) Puerarin suppresses the hepatic gluconeogenesis via activation of PI3K/Akt signaling pathway in diabetic rats and HepG 2 cells. *Biomed. Pharmacother.* **137**: 111325.
32. Cho, H. M., Seok, Y. M., Lee, H. A., Song, M. and Kim, I. (2018) Repression of transcriptional activity of forkhead box O1 by histone deacetylase inhibitors ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 3539.
33. Wang, T., Jiang, H., Cao, S., Chen, Q., Cui, M., Wang, Z., Li, D., Zhou, J., Wang, T., Qiu, F. and Kang, N. (2017) Baicalin and its metabolites suppresses gluconeogenesis through activation of AMPK or AKT in insulin resistant HepG-2 cells. *Eur. J. Med. Chem.* **141**: 92-100.
34. Ren, Z., Xie, Z., Cao, D., Gong, M., Yang, L., Zhou, Z. and Ou, Y. (2018) C-Phycocyanin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via activating Akt and AMPK in insulin resistance hepatocytes. *Food Funct.* **9**: 2829-2839.

(2022. 7. 29 접수; 2022. 8. 15 심사;
2022. 8. 26 게재확정)