



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

석사학위논문

L6 근육세포에서 포도당 및 지질  
대사에 미치는 제주조릿대 (*Sasa  
quelpaertensis* Nakai) 추출물과  
*p*-coumaric acid의 영향

제주대학교 대학원

생물학과

윤 선 아

2013년 2월

L6 근육세포에서 포도당 및 지질  
대사에 미치는 제주조릿대 (*Sasa  
quelpaertensis* Nakai) 추출물과  
*p*-coumaric acid의 영향

지도교수 김 세 재

윤 선 아

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2013년 2월

윤선아의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_ ①

위 원 \_\_\_\_\_ ①

위 원 \_\_\_\_\_ ①

제주대학교 대학원

2013년 2월

Effect of *Sasa quepaertensis* extract and  
its *p*-coumaric acid on glucose and lipid  
metabolism in L6 muscle cells

Seon-A Yoon

(Supervised by professor Se-Jae Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the  
degree of Master of Science

2013. 2.

This thesis has been examined and approved.

---

Thesis director, Won-Taek Kim of Biology

---

---

(Name and signature)

---

Date

DEPARTMENT OF BIOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# ABSTRACT

This study was performed to investigate whether the extract of *Sasa queipaertensis* Nakai (Jeju dwarf bamboo extract, JBE) and its main compound, *p*-coumaric acid (CA) could modulate glucose and lipid metabolism in L6 muscle cells. JBE stimulated uptake of 2-NBD glucose (2-NBDG). JBE also increased the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and acetyl-CoA carboxylase (ACC), but decreased the phosphorylation of Akt. Furthermore, JBE increased the expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), fatty acid translocase (FAT/CD36) and PPAR $\alpha$ . In oleic acid-treated cells, JBE suppressed oleic acid-induced intracellular triglyceride (TG) contents by decreasing the expression of sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) and fatty acid synthase (FAS). Also, it increased the phosphorylation of AMPK and ACC, and the expression of PPAR $\alpha$ . A major compound of JBE, *p*-coumaric acid (CA) increased not only the phosphorylation of AMPK and ACC but also the expression of carnitine palmitoyltransferase-1 (*CPT-1*) gene. In addition, CA significantly decreased oleic acid-induced intracellular TG contents, and increased uptake of 2-NBDG. Treatment of Compound C (AMPK inhibitor) resulted in a decrease of ACC phosphorylation and an increase of TG contents as well as a decrease of 2-NBDG uptake, while these inhibitions were recovered by CA treatment. In conclusion, these results suggest that JBE and CA may have potential for natural resource to prevent and improve type 2 diabetes by regulating glucose and lipid metabolism via AMPK signaling pathway in L6 muscle cells.

**Key words:** L6 muscle cells, *Sasa queipaertensis* Nakai, *p*-coumaric acid, AMP-activated protein kinase (AMPK), glucose and lipid metabolism

# 목 차

A B S T R A C T	-----	1
목 차	-----	2
LIST OF TABLE	-----	4
LIST OF FIGURES	-----	5
I. 서 론	-----	7
II. 재 료 및 방 법	-----	11
1. 채집, 추출 및 시료 준비	-----	11
2. 세포 배양	-----	11
3. 분화 유도 및 지질 축적 유도	-----	11
4. 세포 독성 측정	-----	12
1) 세포 증식률 (MTT assay)	-----	12
2) 세포 독성 (LDH assay)	-----	13
5. Western Blotting	-----	13
6. Oil-Red-O 염색 및 triglycerides (TG) 함량 측정	-----	14
7. RNA 분리 및 Real-time PCR	-----	15
8. 2-NBDG uptake	-----	18

9. 통계 처리	-----	18
<b>III. 결</b>	<b>과</b> -----	<b>19</b>
1. 제주조릿대 추출물 (JBE)이 포도당과 지질 대사에 미치는 영향	----	19
1) 포도당 흡수 촉진 활성	-----	19
2) 지방산 흡수 조절 작용	-----	23
3) 지방산 산화 조절 작용	-----	23
4) 지질 합성 저해 활성	-----	27
2. <i>p</i> -Coumaric acid (CA)가 포도당과 지질 대사에 미치는 영향	-----	29
1) AMPK 활성화 작용	-----	29
2) 지방산 산화 활성화 작용	-----	32
3) 지질 합성 저해 활성	-----	32
4) 포도당 흡수 촉진 활성	-----	32
5) AMPK 활성화 저해제 실험	-----	36
<b>IV. 고</b>	<b>찰</b> -----	<b>39</b>
<b>V. 참</b>	<b>고 문 헌</b> -----	<b>43</b>
<b>VI. 요</b>	<b>약</b> -----	<b>52</b>

## LIST OF TABLE

Table 1. The primer sequences of the genes used in Real-time PCR analysis and the expected sizes of PCR products -- 17



## LIST OF FIGURES

Figure 1. Effect of Jeju dwarf bamboo extract (JBE) on cell viability and cytotoxicity in L6 muscle cells and oleic acid-treated L6 muscle cells	-----	20
Figure 2. Effect of JBE on 2-NBDG uptake in L6 muscle cells	--	21
Figure 3. Effect of JBE on Akt and AMPK phosphorylation in L6 muscle cells	-----	22
Figure 4. Effect of JBE on AMPK phosphorylation and PPAR $\gamma$ , CD36 expression in L6 muscle cells	-----	24
Figure 5. Effect of JBE on ACC phosphorylation and PPAR $\alpha$ expression in L6 muscle cells	-----	25
Figure 6. Effect of JBE on AMPK and ACC phosphorylation and PPAR $\alpha$ expression in oleic acid-treated L6 muscle cells	-	26
Figure 7. Effect of JBE on triglyceride accumulation in oleic acid-treated L6 muscle cells	-----	28
Figure 8. Effect of <i>p</i> -coumaric acid (CA) on cell viability and cytotoxicity in L6 muscle cells and oleic acid-treated L6 muscle cells	-----	30

Figure 9. Effect of CA on AMPK phosphorylation in L6 muscle cells	-----	31
Figure 10. Effect of CA on ACC phosphorylation and CPT-1 mRNA expression in L6 muscle cells	-----	33
Figure 11. Effect of CA on triglyceride accumulation in oleic acid-treated L6 muscle cells	-----	34
Figure 12. Effect of CA on 2-NBDG uptake in L6 muscle cells	---	35
Figure 13. Effect of Compound C on AMPK and ACC phosphorylation by CA in L6 muscle cells	-----	37
Figure 14. Effect of Compound C on triglyceride accumulation and 2-NBDG uptake by CA in L6 muscle cells	-----	38

# I. 서 론

에너지 대사에 많은 부분을 차지하고 있는 근육은 인슐린이 작용하는 대표적인 조직으로 포도당을 흡수하고 산화시켜 에너지를 생산 (Klip and Pâquet, 1990; Sinacore and Gulve, 1993) 할 뿐만 아니라 중성지방이 분해되어 생성되는 유리지방산 (free fatty acid)도 흡수하고 산화시키는 등의 지질 대사에도 관여한다고 알려져 있다 (Cortright *et al.*, 1997; Kiens, 2006).

포도당은 포도당 수송체 (glucose transporter)인 GLUT4가 세포막으로 전이 (translocation)되면서 근육세포내로 흡수된다. 특히, 근육에서의 GLUT4 전이는 인슐린에 반응하여 일어나는 인슐린 자극 경로 (insulin-stimulating pathway)와 AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성화 경로 (AMPK-activating pathway)에 의해 이루어진다 (Ryder *et al.*, 2001). 혈중에 포도당의 농도가 증가하면 췌장에서부터 인슐린이 분비되고, 이는 근육에 있는 인슐린 수용체를 인식하여 insulin receptor substrate (IRS)의 인산화에 따른 하위 경로인 Akt의 인산화를 유도한다. 최종적으로, 세포막에 있는 GLUT4는 인슐린 자극 경로의 신호를 받아 세포막으로 전이됨으로써 포도당이 근육 내로 흡수된다 (Chang *et al.*, 2004; Ryder *et al.*, 2001). 반면, AMPK의 활성화에 따른 GLUT4의 전이는 인슐린 작용과는 상관없이 세포 내 활성화된 AMPK가 증가함에 따라 일어나 포도당의 흡수를 유도한다 (Aschenbach *et al.*, 2002; Jørgensen *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2002)

세포 내 에너지 부족 현상이 나타나면 저장되어 있는 중성지방이 분해되어 지방산이 생성되는데, 이러한 지방산은 근육에서 매우 중요한 에너지원으로 이용될 수 있다 (Fediuc *et al.*, 2006). 하지만 근육 내에 중성지방이 과도하게 많은 것은 병적인 상태로 간주하며 근육의 중성지방이 분해되거나 주위 다른 조직 (e.g. 지방조직, 간)의 중성지방이 분해되어 생성되는 지방산이 혈중에 과도하게 존재하면 인슐린 저항성 및 제 2형 당뇨병과 같은 대사성 질환이 나타나게 된다 (Bergeron *et al.*, 2001; Hulver *et al.*, 2003; Kiens, 2006). 이러한 질환에 대

한 예방 및 개선을 위한 적절한 치료가 이루어지지 않으면 심각한 합병증을 초래하게 된다 (Harris *et al.*, 2003; Wing *et al.*, 2001). 최근, 건강한 삶에 대한 욕구 향상에 따라 운동 및 식이요법을 병행한 약물 치료에 관심이 집중되고 있어 지질 대사 이상이나 당뇨병을 해결할 수 있는 물질의 탐색 및 연구가 활발히 진행되고 있다 (Khan *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2004; Szkudelska and Szkudelski, 2010). 가장 잘 알려진 당뇨병 치료제는 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR)와 metformin이 있으며, 이들은 AMPK의 활성화를 통해 지질과 포도당 대사에 영향을 미친다. 따라서, AMPK는 지질 대사 이상인 비만이나 인슐린이 정상적으로 작용하지 못하는 제 2형 당뇨병 치료의 주요한 인자로 각광받고 있다 (Bergeron *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001).

AMPK는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 의 서로 다른 subunit으로 구성되며, AMPK의 활성화는  $\alpha$  subunit의 threonin-172 잔기에 인산화가 유도되면서 이루어진다 (Hardie, 2003; Long and Zierath, 2006). 에너지 항상성 조절 역할을 하는 AMPK는 세포 내 포도당이나 지질의 양이 적어지는 대사성 스트레스의 경우, 미토콘드리아를 통하여 에너지 생산 과정을 유도한다. 이때, 활성화된 AMPK는 포도당과 지방산을 흡수하고, 이들을 산화시켜 에너지를 생산하는 과정을 빠르게 진행한다 (Fediuc *et al.*, 2006; Viollet *et al.*, 2009; Winder and Hardie, 1999).

세포막에 위치한 fatty acid translocase (FAT/CD36)는 지방산을 세포 내로 유입되게 하며 (Abumrad *et al.*, 1998; Bonen *et al.*, 2004; Frayn *et al.*, 2006), 세포막으로의 CD36 전이는 AMPK 활성화의 영향을 받는다 (Koonen *et al.*, 2005). 그리고 peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) 중의 하나인 PPAR $\gamma$ 는 FAT/CD36의 발현을 조절하는 전사인자로 알려져 있다 (Chen *et al.*, 2009).

한편, 세포 내로 유입된 지방산은 중성지방을 생성하는 과정에 사용되거나 에너지를 생산하는 과정인  $\beta$ -oxidation에 사용된다 (Glatz *et al.*, 2010; Kamei *et al.*, 2008). 활성화된 AMPK는 sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c)의 발현을 억제시킨다 (Zhou *et al.*, 2001). 중성지방으로 전환하는데 영향을 미치는 효소는 acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 fatty

acid synthase (FAS)가 알려져 있으며, 이들의 발현은 SREBP-1c가 조절하는데 특히 68 kDa 크기의 성숙한 SREBP-1c가 ACC와 FAS의 전사인자로 작용한다 (Osborne, 2000; Shimano, 2001).

인산화된 AMPK는 연쇄적 반응에 따라 세포 내 ACC를 불활성화시켜 acetyl CoA가 malonyl CoA로 전환되는 양을 감소시킨다 (Watt *et al.*, 2006A). Malonyl CoA는 미토콘드리아에서 지방산의 흡수와 산화를 조절하는 carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1)의 작용에 영향을 미치는 효소로서, malonyl CoA의 영향을 받지 않은 CPT-1은 미토콘드리아 내로 지방산 유입을 유도하여 지방산  $\beta$ -oxidation이 일어나도록 조절한다 (Abu-Elheiga *et al.*, 2001; Bergeron *et al.*, 2001; Holloway *et al.*, 2006). 또한, 세포 내 CPT-1의 발현은 전사인자인 PPAR $\alpha$ 의 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2006). 앞서 언급하였던 PPAR $\gamma$ 와 PPAR $\alpha$ 의 작용은 근육세포 내 지방산 대사에 관여하는 과정을 통해 궁극적으로 지질 이상 질환이나 제 2형 당뇨병의 예방 및 개선에 주요한 역할을 할 것으로 기대된다 (Chen *et al.*, 2009).

L6 세포는 rat의 골격근에서 유래한 세포주로 단핵성의 근원세포 (myoblasts)가 빠른 속도로 증식하여 분화과정을 수행하고, 최종적으로 세포막의 융합 과정을 통하여 다핵성의 근관세포 (myotubes)를 형성하는 형태적 분화를 수행한다 (Wakelam, 1985). 분화된 L6 세포는 완전한 근육과 같은 대사기능을 가지며, 포도당 대사와 관련된 실험뿐만 아니라 세포 내 지방산 유입과 산화에 관련된 지질 대사 연구에도 널리 쓰이고 있다 (Hwang *et al.*, 2008; Palanivel and Sweeney, 2005; Zhang *et al.*, 2011)

제주조릿대 (*Sasa quepaertensis* Nakai)는 한라산에만 분포하는 식물로, 활용 가치가 부각되면서 성분 분리와 분석 (Sultana and Lee, 2009; 2010)에 관련된 연구 및 생리활성 연구들이 활발히 진행되고 있다. RAW 264.7 세포에서의 항염 효과 (Hwang *et al.*, 2007)와 HL-60 세포에서의 항암 작용 (Jang *et al.*, 2008)이 보고되었다. 또한, Kang 등 (2012)은 제주조릿대 추출물이 고지방 식이로 유도된 비만한 쥐의 간 (liver) 지질 축적 감소와 분화된 지방세포의 AMPK 활성화를 보여줌으로써 지질 대사에 영향을 미친다고 보고하였다. 그러나 제주조릿대가 L6 근육세포의 지질과 포도당 대사에 미치는 영향에 관한 보고는

전무한 실정이다. 또한, 제주조릿대 추출물의 주요 성분으로 함유된 *p*-coumaric acid는 mushroom tyrosinase의 활성 억제 (Sultana and Lee, 2009), 멜라닌형성 억제 (An *et al.*, 2008)와 에탄올로 유도된 간독성 보호 (Lee *et al.*, 2008)등이 보고되었다. 또한, 혈소판 활성 억제 (Luceri *et al.*, 2007), doxorubicin로 유도된 산화 스트레스 보호 (Abdel-Wahab *et al.*, 2003), 항산화 (Zang *et al.*, 2000) 등이 선행 연구에 의해 수행되었지만 근육세포의 대사 활성에 관하여 보고된 바는 없다.

따라서, 본 연구에서는 많은 연구에 의해 대사 활성에 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있는 제주조릿대 추출물과 *p*-coumaric acid가 L6 근육세포에서 포도당과 지질대사에 미치는 영향을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 채집, 추출 및 시료 준비

본 연구에 사용된 제주조릿대 잎은 2011년 4월 조천읍 교래리에서 채집하였다. 채집한 시료는 세척하여 건조한 후, 추출하기 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 건조된 제주조릿대 잎을 파쇄하여 분말시료를 얻었고, 이 중 400 g의 분말에 4 L 물을 첨가하여 4시간 동안 열수 추출하고 여과하였다. 감압회전농축기 (Buchi, R-200, Switzerland)로 수차례 농축 한 후, 동결건조하여 시료를 획득하였다. 시료는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관하였으며, 세포 실험 사용 시에는 phosphate buffered saline (PBS; Sigma, USA)에 완전히 녹여서 사용하였다. 또한, *p*-coumaric acid는 Sigma에서 구입하였으며, dimethylsulfoxide (DMSO; Amresco, USA)에 녹여 실험에 사용하였다.

### 2. 세포 배양

Rat 유래 L6 골격근 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC; USA)에서 구입하였다. 세포는 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)과 1% penicillin/streptomycin (P/S; Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, USA)에서 배양하였고,  $37^{\circ}\text{C}$ 의 5%  $\text{CO}_2$  조건을 유지하였다. 또한 세포를 1~2일 배양하여 flask 바닥에 70%가 되었을 때 계대 배양을 실시하였다.

### 3. 분화 유도 및 지질 축적 유도

L6 세포의 분화 유도는 6 well culture plate 또는 12 well culture plate에

L6 세포를 접종 ( $1.0 \times 10^5$  cells/mL)하고 3~4일 유지하였다. 세포가 90~100% 정도 찼을 때 2% (v/v) FBS가 함유된 DMEM 배지로 교환하여 실험에 사용하기 전까지 이틀마다 배지를 교환하였다. 분화된 L6 세포는 0.5% bovine serum albumin (BSA; Amresco, USA)이 포함된 serum-free DMEM으로 4시간 또는 16시간 동안 절식 배양한 후 실험에 사용하였다. 한편, L6 세포의 지질 축적을 유도하기 위한 실험에서는 절식 배양된 L6 세포에 oleic acid (Sigma, USA)를 1 mM 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다.

#### 4. 세포 독성 측정

##### 1) 세포 증식률 (MTT assay)

L6 세포를 DMEM 배지를 이용하여  $1.0 \times 10^5$  cells/mL로 접종하고, 분화유도 6~8일 후에 시료를 농도별 (제주조릿대 추출물 : 125, 250, 500 및 1000  $\mu$ g/mL; *p*-coumaric acid : 12.5, 25, 50 및 100  $\mu$ M)로 처리하였다. 지방산을 처리하여 수행한 실험의 경우, oleic acid를 24시간 처리하고 시료를 48시간 배양한 후 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Amresco, USA) 용액을 400  $\mu$ g/mL의 농도가 되도록 첨가하여 4시간 더 배양하였다. Formazan이 형성된 세포의 배지를 제거하고, 100~200  $\mu$ L의 DMSO를 첨가하여 완전히 용해시켰다. 595 nm의 파장에서 microplate reader (Bio-tek, USA)를 이용해 흡광도를 측정하였다. 세포 증식률은 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도 값과 비교하여 다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 - [(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}} \times 100]$$

OD<sub>control</sub> : 시료를 처리하지 않은 세포 배지의 흡광도

OD<sub>sample</sub> : 시료를 처리한 세포 배지의 흡광도



## 2) 세포 독성 (LDH assay)

시료가 L6 세포에 미치는 세포 독성 평가는 Lactate dehydrogenase (LDH) Cytotoxicity Detection kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 수행하였다. L6 세포를 DMEM 배지를 이용하여  $1.0 \times 10^5$  cells/mL로 접종하고, 분화유도 6~8일 후에 시료를 농도별 (제주조릿대 추출물 : 125, 250, 500 및 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; *p*-coumaric acid : 12.5, 25, 50 및 100  $\mu\text{M}$ )로 48시간 동안 처리하였다. 지방산을 처리하여 수행한 실험의 경우, oleic acid를 24시간 처리하고 시료를 처리하였다. 이후 배양액 50  $\mu\text{L}$ 에 LDH 측정 혼합액 50  $\mu\text{L}$ 를 넣고 5~10분간 반응시켜 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 세포에 Triton X-100 (Sigma, USA)을 최종 1%가 되도록 처리한 세포 배양액을 사용하였으며 세포 독성 비율은 다음과 같은 식으로 산출하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 \times (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{control}}) / (\text{OD}_{\text{positive}} - \text{OD}_{\text{control}})$$

$\text{OD}_{\text{control}}$  : 시료와 Triton X-100을 처리하지 않은 세포 배지의 흡광도

$\text{OD}_{\text{sample}}$  : 시료를 처리한 세포 배지의 흡광도

$\text{OD}_{\text{positive}}$  : Triton X-100을 처리한 세포 배지의 흡광도

## 5. Western Blotting

시료를 처리한 L6 세포를 1×PBS로 1~2회 세척 후 1×RIPA (Upstate Biotechnology, USA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma, USA), 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM NaF, 1  $\mu\text{g/mL}$  aprotinin (Amresco, USA), 1  $\mu\text{g/mL}$  leupeptin (Amresco, USA) 및 1  $\mu\text{g/mL}$  pepstatin (Amresco, USA)이 포함된 RIPA Lysis buffer를 이용하여 세포를 수거하였다. 원심분리 (15,000×g, 4°C, 20분)하여 단백질이 포함된 상층액을 획득한 후, 단백질의 농도는 BSA를 표준으로 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 정량하였다. 25~50  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 6~10% SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)에

전기영동하고 poly vinylidene difluoride (PVDF; Milipore, USA) membrane으로 200 mA에서 2시간 동안 전이시켰다. 전이된 단백질이 있는 PVDF membrane은 상온에서 5% skim milk (Difco, USA) 또는 5% BSA로 1시간 동안 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 이때, phospho-AMPK<sup>Thr172</sup> (1:2,000, Cell Signaling, USA), AMPK (1:5,000, Cell Signaling, USA), phospho-ACC<sup>Ser79</sup> (1:1,000, Cell Signaling, USA), ACC (1:1,000, Cell Signaling, USA), PPAR $\gamma$  (1:500, Santa Cruz, USA), CD36 (1:1,000, Santa Cruz, USA), PPAR $\alpha$  (1:1,200, Santa Cruz, USA), SREBP-1c (1:1,000, Santa Cruz, USA), FAS (1:1,000, Santa Cruz, USA) 및 phospho-Akt<sup>Ser473</sup> (1:2,000, Santa Cruz, USA)는 4°C에서 하루 밤 (16시간) 동안 반응시켰고, Akt (1:1,000, Cell Signaling, USA)와  $\beta$ -actin (1:10,000, Sigma, USA)은 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 PVDF membrane은 0.1% Tween 20이 포함된 Tris-saline (TTBS) 용액으로 세척한 후, peroxidase-conjugated된 2차 항체 (Jackson immunoResearch, USA)를 1:5,000 또는 1:10,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시키고 세척하였다. 단백질은 WEST-ZOL Western Blot Detection System (iNtRON Biotechnology, Korea)으로 반응시켜 감광하여 결과를 확인하였다.

## 6. Oil-Red-O 염색 및 triglycerides (TG) 함량 측정

Oleic acid를 처리하여 지질 축적을 유도한 L6 세포에 시료를 처리하였을 때 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 Koopman 등 (2001)의 방법을 수정하여 Oil-Red-O 염색을 수행하였다. 분화 유도된 L6 세포에 시료를 처리하여 배양한 후, 1×PBS로 1회 세척하였다. 이후, PBS에 희석된 3.7% formalin (Sigma, USA)으로 약 40분 동안 고정하고 증류수로 2회 세척하였다. 그리고 완전히 물기를 제거하여 증류수로 희석한 Oil-Red-O 염색액 (Sigma, USA)을 넣어 약 40분 동안 염색하였다. 이때, Oil-Red-O 염색액은 증류수와 6:4 비율로 희석하였으며, syringe filter로 여과하여 사용하였다. 세포 염색 후, 증류수로 3회 세척하

여 광학현미경하에서 관찰하였다. 염색된 지질 축적의 함량을 정량하기 위해서 4% NP-40 (Amresco, USA)이 포함된 isopropanol (Amresco, USA)를 첨가하여 Oil-Red-O를 다시 용해시킨 후, 520 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

## 7. RNA 분리 및 Real-time PCR

Total RNA는 6 well culture plate에서 배양된 세포 ( $1.0 \times 10^5$  cells/mL)에 total RNA extraction reagent (RNAiso Plus; TaKaRa, Japan)를 첨가하여 분리하였다. Instruction에 따라 세포를 수거하고 상온에서 10분간 반응시켰다. RNA가 포함된 용액을 새로운 tube로 옮기고 chloroform (Merck, Germany)을 0.2배 첨가하여 4°C, 12,000×g 조건에서 15분간 원심분리를 하였다. RNA가 포함되어 있는 상층액을 새로운 tube로 회수하고 차가운 isopropanol을 첨가하여 상온에서 반응시킨 후, 4°C, 12,000×g 조건에서 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 제거하여 남은 RNA에 DEPC (Amresco, USA)로 희석한 75% 에탄올을 첨가하고 2~3번 원심분리 (4°C, 12,000×g)를 실시하여 세척하였다. 완전히 건조시킨 RNA에 nuclease-free water (NF DW; Amresco, USA)로 용해시킨 후, nanodrop ND 2000 spectrometer (Nanodrop, USA)를 이용하여 RNA 흡광도를 측정하였다. A260/A280 nm 파장의 ratio가 1.8~2.0 사이의 값을 갖는 RNA 시료를 cDNA 합성에 사용하였다.

cDNA 합성은 Maxime RT PreMix kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 수행하였다. Maxime RT PreMix tube에 NF DW를 첨가하여 2분간 반응시킨 후, 1 µg의 RNA를 첨가하여 총 20 µL가 되도록 하였다. cDNA 합성이 일어나는 과정 (45°C, 60분)과 RNase를 불활성화 시키는 과정 (95°C, 5분)을 수행하여 얻은 cDNA는 NF DW로 희석하여 Real-time PCR에 사용하였다.

Real-time PCR은 DyNAmo™ ColorFlash SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, USA)을 이용하여 수행하였다. 2×Master Mix, 10 pmole primer, cDNA를 혼합하여 총 12 µL가 되도록 NF DW로 부피를 맞추었다.

DNA polymerase를 활성화시키는 과정을 95℃에서 5분간 진행하였고, 95℃ (20초) - 63℃ (20초) - 72℃ (30초)의 조건으로 49회 반복하여 DNA를 증폭하였다. 모든 반응이 완료된 후 65℃에서 95℃까지 온도가 증가하도록 조건을 맞추어 melting curve를 확인하였고, 이를  $\beta$ -actin과 상대비교를 하여 값을 정량화하였다. PCR 반응은 Chromo4 real time PCR (Bio-Rad, USA)를 이용하여 수행하였으며, 실험에 사용된 prime 염기서열과 PCR 결과로 생성되는 product의 크기는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. The primer sequences of the genes used in Real-time PCR analysis and the expected sizes of PCR products

Gene	Primer sequences	Size (bp)
CPT-1	Forward 5'-GCA AAC TGG ACC GAG AAG AG-3'	169
	Reverse 5'-CGA CCT TTG TGG TAG ACA GC-3'	
$\beta$ -actin	Forward 5'-CCC ACA CTG TGC CCA TCT AT-3'	153
	Reverse 5'-CAC GCA CGA TTT CCC TCT CA-3'	

## 8. 2-NBDG uptake

세포 내로 유입되는 포도당을 측정하기 위하여 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxyglucose (2-NBDG; Invitrogen, USA)를 세포에 처리하여 확인하였다 (Zou *et al.*, 2005). 분화 유도된 L6 세포에 0.5% BSA가 포함된 low-glucose DMEM으로 12~16시간 배양한 후, 시료와 2-NBDG를 동시에 처리하였다. 이후, 세포 내로 유입되지 않은 포도당을 제거하기 위해  $1\times$ PBS로 2회 세척하였다. 형광 값은 excitation 485 nm과 emission 520 nm의 파장에서 fluorescence micro reader (FLUOstar OPTIMA; BMG LABTECH, Germany)로 측정하였으며, 3번 반복실험을 하여 수치를 나타내었다.

## 9. 통계 처리

모든 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고, student's *t*-test로 검정을 하여  $p<0.05$  일때 유의성 있는 값으로 판단하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 제주조릿대 추출물 (JBE)이 포도당과 지질 대사에 미치는 영향

우선 세포 실험에 사용할 JBE의 적절한 처리 농도를 결정하기 위하여 MTT와 LDH 분석을 수행하였다. L6 근육세포에 JBE를 여러 농도 (125, 250, 500 및 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리한 결과, 모든 처리 군에서 세포 독성은 관찰되지 않았다 (Figure 1A). 지질 축적을 유도하기 위해 oleic acid를 처리하면 세포 증식률이 유의적으로 증가하지만, 세포 독성에는 영향을 미치지 않았다 (Figure 1B). 따라서 JBE 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 최고 농도로 설정하여 이후 진행되는 세포실험을 수행하였다.

##### 1) 포도당 흡수 촉진 활성

L6 근육세포에서 JBE가 포도당 흡수에 어떠한 영향을 미치는지 2-NBDG를 사용하여 분석하였다. L6 근육세포에 JBE를 처리한 후, 시간이 지남에 따라 포도당 흡수가 현저히 증가하였다. 특히, JBE 처리 후 12시간 경과된 실험군에서 대조군에 비해 유의적으로 포도당 흡수가 증가하였다 (Figure 2A). 또한, JBE를 250, 500 및 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 24시간 처리하였을 때 포도당 흡수율은 각각  $119.73 \pm 7.58$ ,  $121.47 \pm 5.70$ ,  $133.79 \pm 5.06\%$ 의 값을 나타내어 농도 의존적인 증가 양상을 나타내었다 (Figure 2B).

JBE에 의한 포도당 흡수 촉진 효과가 인슐린 자극 경로 혹은 AMPK 활성화 경로에 매개되는지 확인하기 위하여 JBE 처리 후 시간별 (12, 24 및 48시간)로 Akt와 AMPK 인산화 양상을 분석하였다. Akt의 인산화는 각 시간의 대조군과 비교하여 감소하는 양상을 나타내었다 (Figure 3A). 반면, AMPK의 인산화는 시간이 지남에 따라 증가하였고, JBE 처리 후 48시간에 가장 큰 증가를 보였다 (Figure 3B).

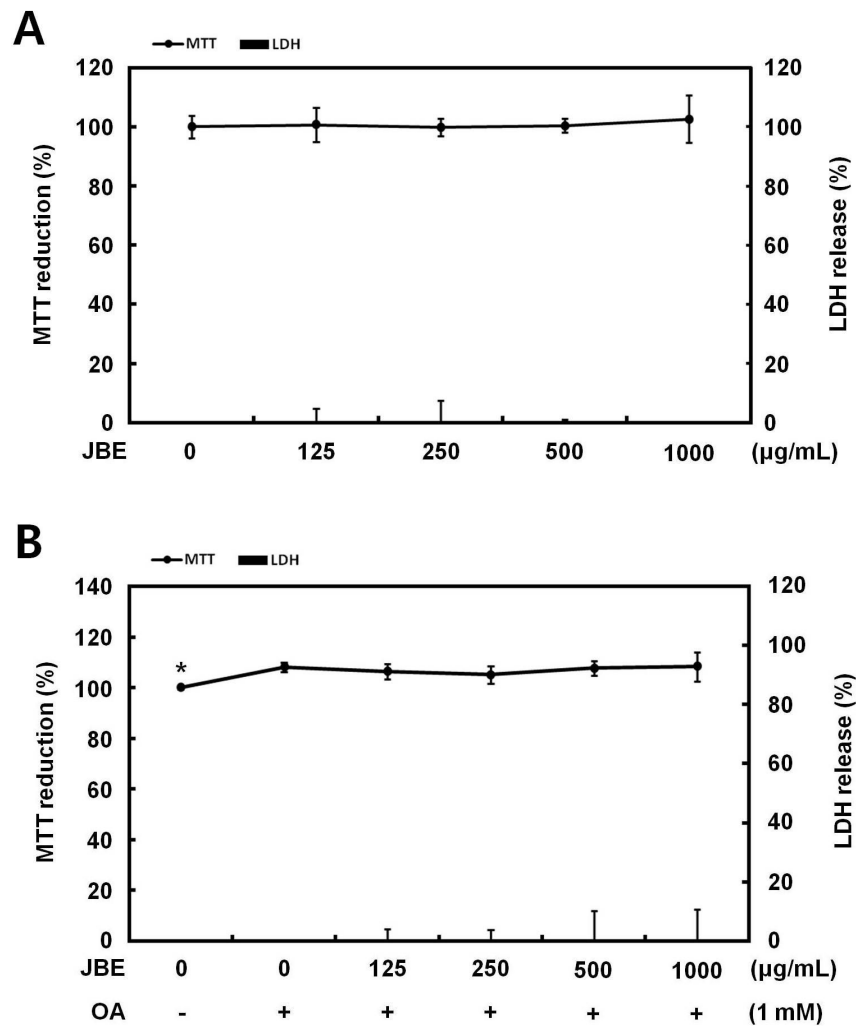


Figure 1. Effect of Jeju dwarf bamboo extract (JBE) on cell viability and cytotoxicity in L6 muscle cells (A) and oleic acid-treated L6 muscle cells (B). L6 muscle cells were incubated with indicated concentrations of JBE for 48 hr. Cell viability and cytotoxicity were measured by MTT and LDH assay, respectively. Data shown are presented as the means±S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  compared to OA-treated group. OA, oleic acid.



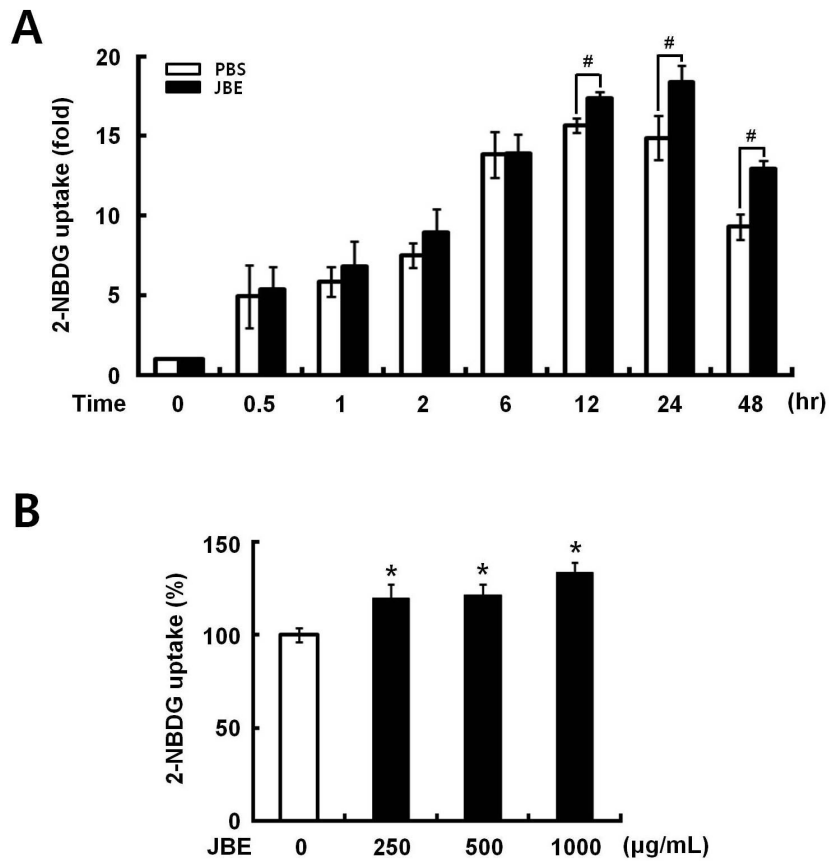


Figure 2. Effect of JBE on 2-NBDG uptake in L6 muscle cells. Serum deprived L6 muscle cells were treated with JBE and 2-NBDG for indicated time period (A) or indicated concentrations of JBE and 2-NBDG for 24 hr (B). Data shown are presented as the means±S.D. of three independent experiments. # $p < 0.05$  compared to each control group (PBS). \* $p < 0.05$  compared to JBE-untreated group.

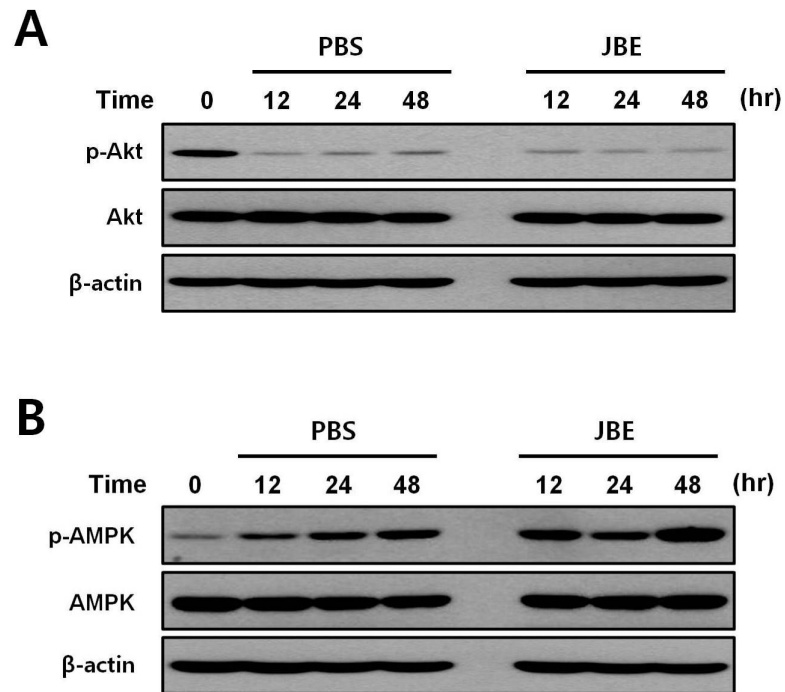


Figure 3. Effect of JBE on Akt (A) and AMPK (B) phosphorylation in L6 muscle cells. Serum deprived L6 muscle cells were treated with JBE (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for indicated time period. Protein extracts were immunoblotted with specific antibodies that recognize phospho-Akt (p-Akt), Akt, phospho-AMPK (p-AMPK) and AMPK. The results are representative of three independent experiments.

## 2) 지방산 흡수 조절 작용

L6 근육세포에 JBE를 농도별 (125, 250, 500 및 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하여 48시간 후에 AMPK의 인산화를 확인한 결과, AMPK 인산화가 농도 의존적으로 증가하였다 (Figure 4A). JBE에 의한 AMPK 활성화가 지방산 흡수에 영향을 미치는지 확인하기 위해서 CD36과 이를 조절하는 PPAR $\gamma$ 의 발현 양상을 조사하였다. JBE를 농도별 (125, 250, 500 및 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하면 CD36의 발현이 500과 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 실험군에서 증가 양상을 나타내었다. 또한, CD36을 조절하는 전사인자인 PPAR $\gamma$ 의 발현은 농도 의존적으로 증가하였다 (Figure 4B).

## 3) 지방산 산화 조절 작용

AMPK가 활성화됨에 따라 영향을 받는 하위 기질인 ACC의 인산화가 농도 의존적으로 증가하였고 (Figure 5A), CPT-1의 발현을 조절하는 전사인자인 PPAR $\alpha$ 의 발현도 증가하는 양상을 보였다 (Figure 5B). 또한, oleic acid를 처리하여 지질 축적을 유도한 L6 근육세포에 JBE를 125, 250, 500 및 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하여 AMPK와 ACC의 인산화를 확인하였다. Oleic acid를 처리하지 않은 세포와 마찬가지로, AMPK와 ACC 모두 인산화가 증가하였고 (Figure 6A), PPAR $\alpha$  발현도 농도 의존적으로 증가함을 보였다 (Figure 6B).

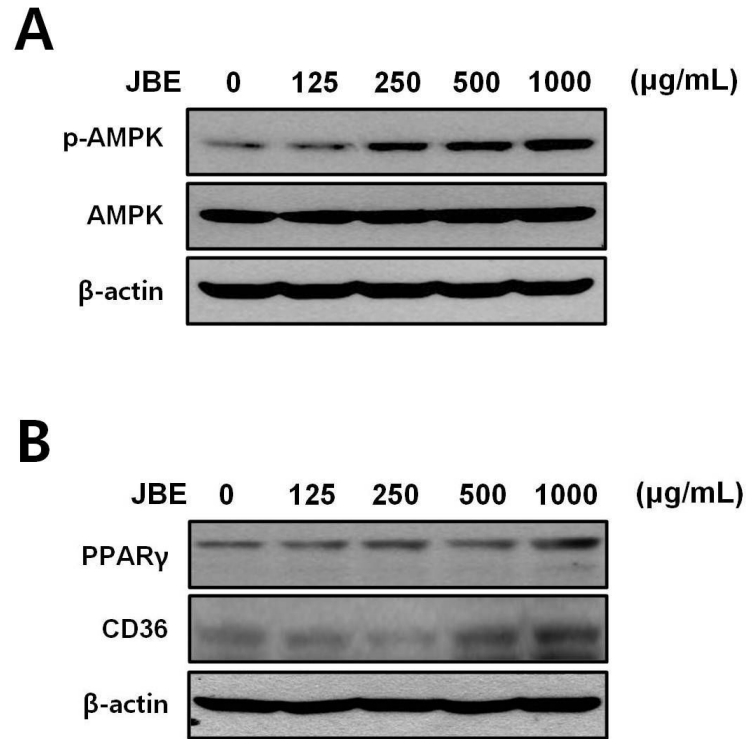


Figure 4. Effect of JBE on AMPK phosphorylation (A) and PPAR $\gamma$ , CD36 expression (B) in L6 muscle cells. Serum deprived L6 muscle cells were treated with indicated concentrations of JBE for 48 hr. Protein extracts were immunoblotted with specific antibodies that recognize phospho-AMPK (p-AMPK), AMPK, PPAR $\gamma$  and CD36. The results are representative of three independent experiments.

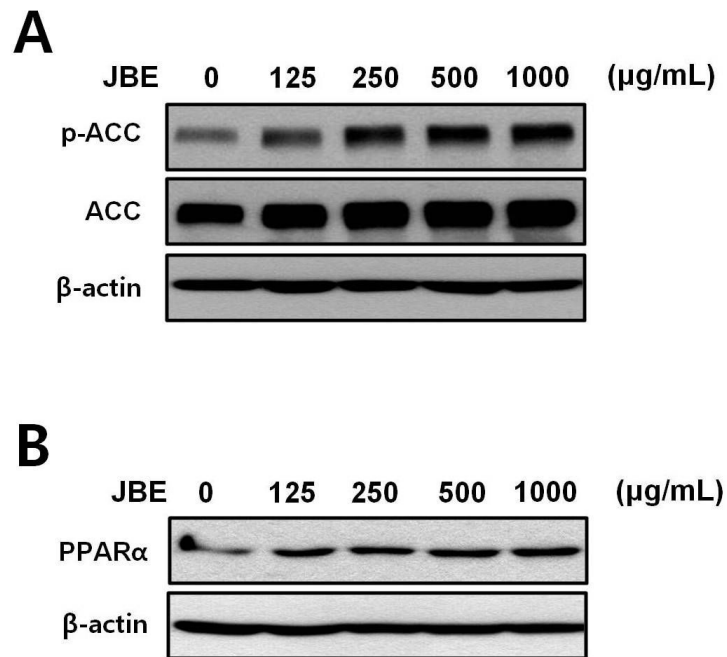


Figure 5. Effect of JBE on ACC phosphorylation (A) and PPAR $\alpha$  expression (B) in L6 muscle cells. Serum deprived L6 muscle cells were treated with indicated concentrations of JBE for 48 hr. Protein extracts were immunoblotted with specific antibodies that recognize phospho-ACC (p-ACC), ACC and PPAR $\alpha$ . The results are representative of three independent experiments.

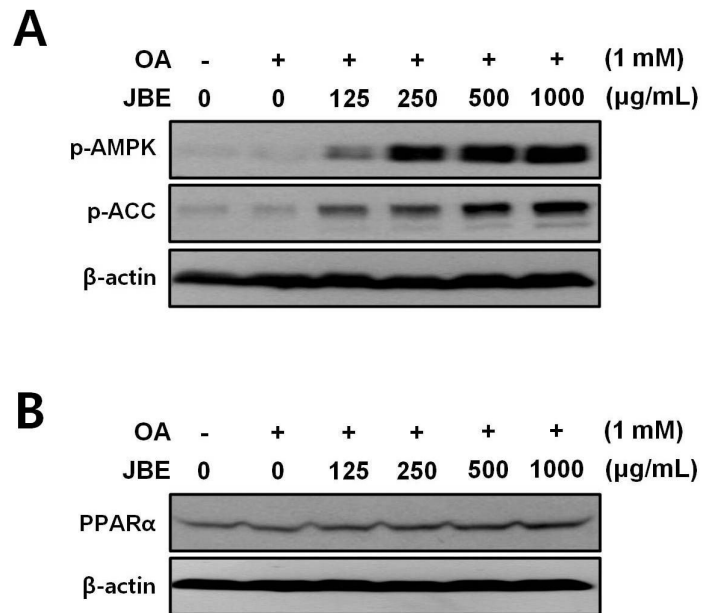


Figure 6. Effect of JBE on AMPK and ACC phosphorylation (A) and PPAR  $\alpha$  expression (B) in oleic acid-treated L6 muscle cells. Oleic acid-treated L6 muscle cells were treated with indicated concentrations of JBE for 48 hr. Protein extracts were immunoblotted with specific antibodies that recognize phospho-AMPK (p-AMPK), phospho-ACC (p-ACC) and PPAR $\alpha$ . The results are representative of three independent experiments. OA, oleic acid.

#### 4) 지질 합성 저해 활성

JBE가 L6 근육세포 내 지질 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 oleic acid 1 mM를 처리하여 지질 합성을 유도하였다. 지질 축적을 유도한 L6 근육세포에 JBE 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하면 지질 축적이 감소하였다 (Figure 7). Oil-Red-O로 염색하여 정량화한 결과, oleic acid 미처리 군은  $100\pm 24.91\%$ 이며, oleic acid 단독 처리 군은  $193.21\pm 9.65\%$ 로 확인되었다. 그러나 oleic acid를 처리하여 지질 축적을 유도한 후 JBE를 처리한 군에서는  $153.50\pm 12.57\%$ 로 확인되어 oleic acid 단독 처리 군에 비해 지질 축적이 유의적으로 감소되었다 (Figure 7A). 분자적인 수준에서 지질 축적을 유도한 L6 근육세포에 JBE (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하면 AMPK 인산화가 증가하는 반면에 세포 내 지질 축적에 관여하는 SREBP-1c의 발현이 감소되었다. 특히, 지질 축적에 관여하는 단백질 (e.g. ACC, FAS)의 전사인자인 68 kDa SREBP-1c가 현저하게 감소되었다는 것을 확인하였다. 또한, SREBP-1c에 의해 조절되는 FAS의 발현도 JBE를 처리한 군에서 감소하였다 (Figure 7B).

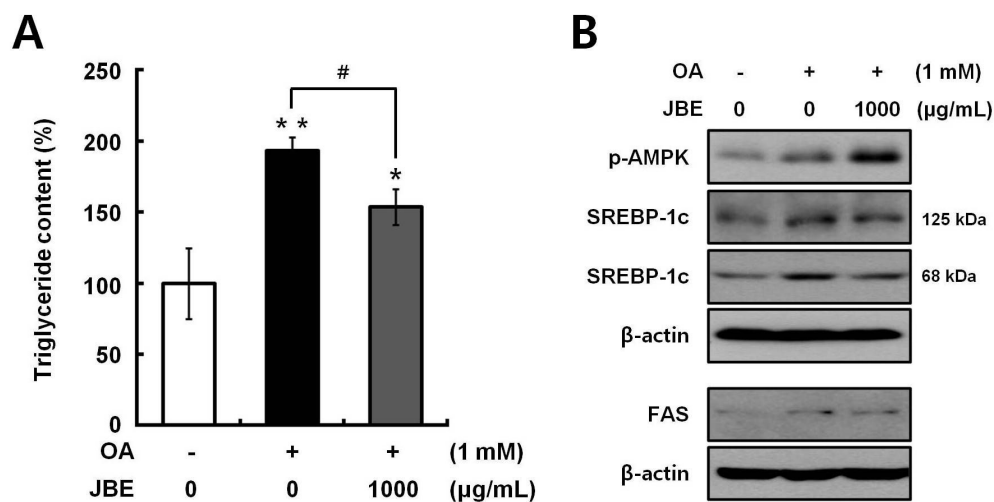


Figure 7. Effect of JBE on triglyceride accumulation in oleic acid-treated L6 muscle cells. Oleic acid-treated L6 muscle cells were treated with JBE (1000 μg/mL) for 48 hr. Data shown are presented as the means±S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to OA-untreated group. # $p < 0.05$  compared to OA-treated group (A). Triglyceride synthesis-related protein extracts were immunoblotted with specific antibodies that recognize phospho-AMPK (p-AMPK), SREBP-1c and FAS. The results are representative of three independent experiments (B). OA, oleic acid.



## 2. *p*-Coumaric acid (CA)가 포도당과 지질 대사에 미치는 영향

제주조릿대 추출물 (JBE)에는 다양한 폴리페놀 성분들이 함유되어 있다고 알려져 있다. L6 근육세포에서의 포도당 및 지방산 흡수 촉진 효과, 지질 합성 저해 활성 등과 같은 JBE의 대사성 질환 개선작용은 다양한 화합물의 공동작용에 의한 것으로 추측된다. 하지만, JBE의 작용기전을 이해하기 위해서는 JBE에 함유되어 있는 단일 화합물들에 대한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 JBE에 풍부하게 함유되어 있다고 알려진 *p*-coumaric acid (CA)에 대한 연구를 수행하였다.

우선, L6 근육세포 실험에 사용될 CA의 적절한 처리농도를 결정하기 위하여 CA가 세포 증식률과 세포 독성에 미치는 영향을 MTT, LDH 분석을 통하여 확인하였다. CA를 100  $\mu$ M 농도까지 처리하였을 때 세포 증식률과 세포 독성에 영향을 나타내지 않았다 (Figure 8A). 또한, 지질 축적을 유도하기 위해 oleic acid (1 mM)를 전처리하고 CA를 처리하여도 세포 독성은 관찰되지 않았다 (Figure 8B). 따라서, CA 50 또는 100  $\mu$ M를 최고 농도로 하여 세포 실험을 수행하였다.

### 1) AMPK 활성화 작용

L6 근육세포에서 CA가 AMPK 활성화에 미치는 영향을 Western Blot 방법으로 확인하였다. CA를 시간별 (6, 12, 24 및 48시간)로 처리하여 AMPK 인산화 양상을 분석한 결과, CA 처리 후 6시간까지는 AMPK 인산화의 차이를 보이지 않았지만 12시간부터 AMPK 인산화가 증가하였고, 48시간까지 일정하게 증가하는 양상을 보였다 (Figure 9A). 또한, CA를 농도별 (12.5, 25 및 50  $\mu$ M)로 24시간 처리하였을 때 AMPK의 인산화가 농도 의존적으로 증가하였다 (Figure 9B).

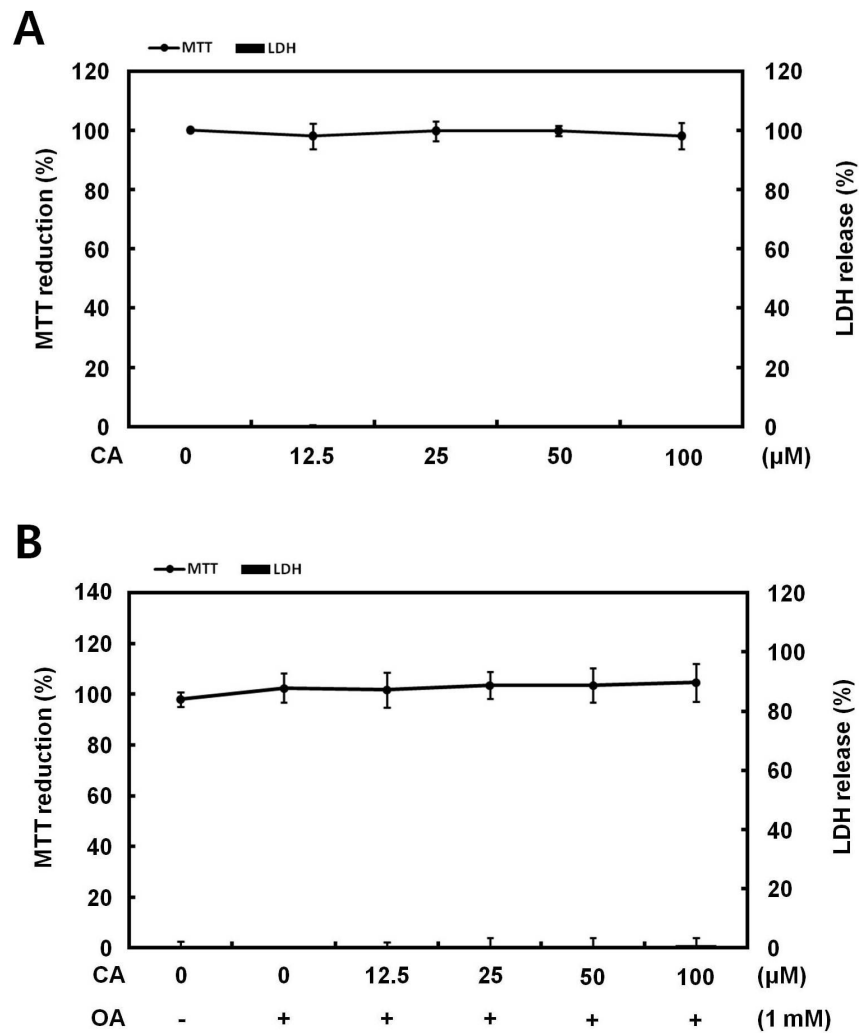
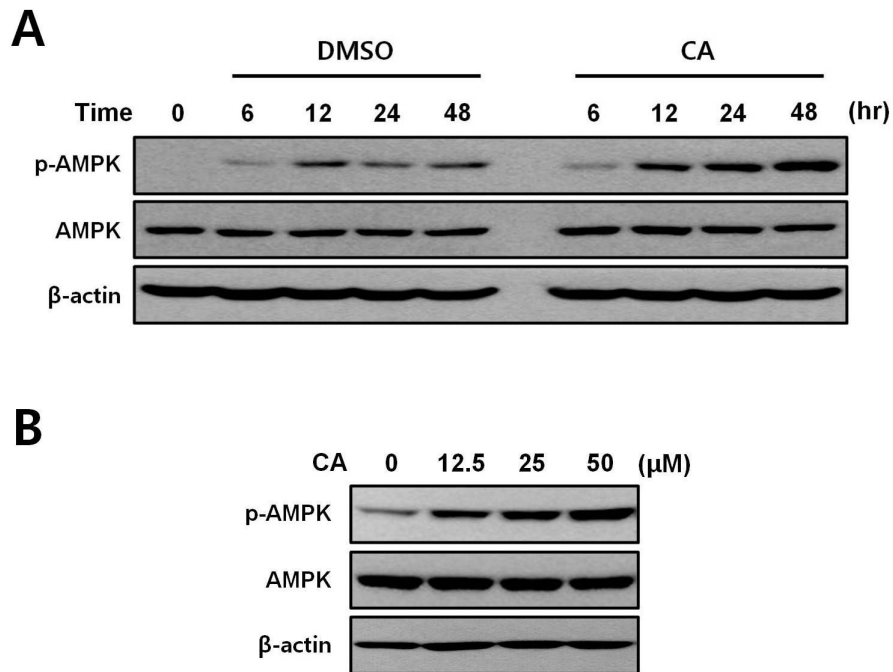


Figure 8. Effect of *p*-coumaric acid (CA) on cell viability and cytotoxicity in L6 muscle cells (A) and oleic acid-treated L6 muscle cells (B). L6 muscle cells were incubated with indicated concentrations of CA for 48 hr. Cell viability and cytotoxicity were measured by MTT and LDH assay, respectively. Data shown are presented as the means±S.D. of three independent experiments. OA, oleic acid.



**Figure 9.** Effect of CA on AMPK phosphorylation in L6 muscle cells. Serum deprived L6 muscle cells were treated with CA (50  $\mu$ M) for indicated time period (A) or indicated concentrations of CA for 24 hr (B). Protein extracts were immunoblotted with specific antibodies that recognize phospho-AMPK (p-AMPK) and AMPK. The results are representative of three independent experiments.

## 2) 지방산 산화 활성화 작용

L6 근육세포에서 CA에 의한 AMPK 활성화가 지방산 산화 경로에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 AMPK의 하위 기질인 ACC의 인산화를 Western Blot을 통해 분석하였다. CA를 처리한 세포에서 시간이 경과함에 따라 ACC의 인산화가 증가하였다. 특히, CA 처리 후 12시간부터 ACC 인산화가 현저하게 증가하였다 (Figure 10A). 그리고 CA를 농도별 (12.5, 25 및 50  $\mu$ M)로 24시간 동안 처리하면 Figure 10B에서 보는 바와 같이 ACC의 인산화는 PPAR  $\alpha$ 의 발현과 함께 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보여 주었다. 또한, 미토콘드리아내 지방산 산화에 관여한다고 알려진 CPT-1의 mRNA 발현을 확인한 결과, CA를 처리하면 CPT-1 mRNA 발현이 25  $\mu$ M에서부터 유의적으로 증가하였다 (Figure 10C).

## 3) 지질 합성 저해 활성

AMPK 신호전달의 또 다른 경로로서, oleic acid를 처리하여 지질 합성을 유도한 L6 근육세포에서 CA가 지질 축적에 미치는 영향을 Oil-Red-O 염색 방법으로 조사하였다. L6 근육세포에 oleic acid를 처리하면 oleic acid 미처리 군 ( $100 \pm 14.37\%$ )에 비해 지질 축적이 약 2.6배 ( $262.57 \pm 9.38\%$ ) 증가하였다. 그러나 지질 축적을 유도한 L6 근육세포에 CA를 처리하면 지질 축적 ( $218.20 \pm 19.83\%$ )이 유의적으로 감소하였다 (Figure 11).

## 4) 포도당 흡수 촉진 활성

AMPK 신호전달은 근육세포 내로 유입되는 포도당 흡수에도 영향을 미치기 때문에 L6 근육세포에서 CA의 2-NBDG 흡수 촉진 활성을 조사하였다. L6 근육세포에 CA를 처리하면 시간 경과에 따라 포도당 흡수가 증가하였고, CA 처리 후 6시간부터 대조군과 비교하여 유의성 있는 증가 양상을 보였다 (Figure 12A). CA를 농도별 (25, 50 및 100  $\mu$ M)로 12시간 처리하면 포도당 흡수율이 농도 의존적으로 유의적인 증가를 나타내었다 (Figure 12B).

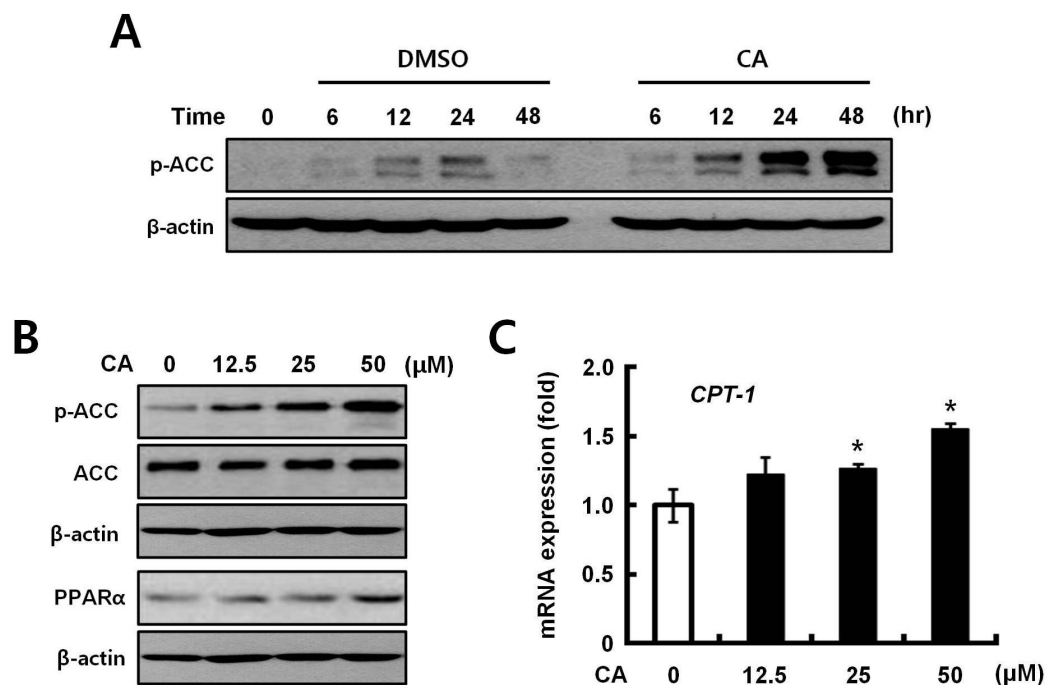


Figure 10. Effect of CA on ACC phosphorylation and CPT-1 mRNA expression in L6 muscle cells. Serum deprived L6 muscle cells were treated with CA for indicated time period (A) or indicated concentrations of CA for 24 hr (B). The results are representative of three independent experiments. CPT-1 mRNA levels were assayed by Real-time PCR. Data shown are presented as the means±S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  compared to CA-untreated group (C).

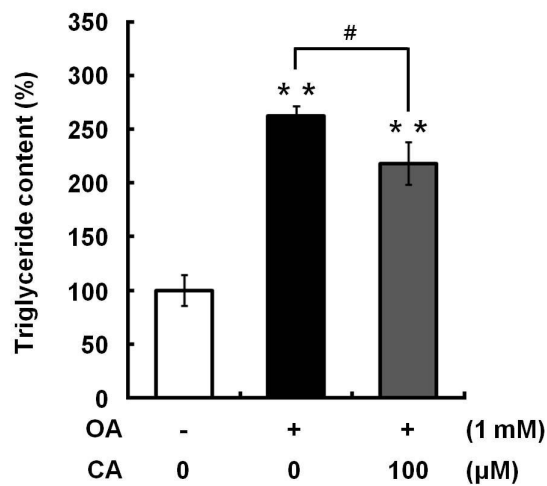


Figure 11. Effect of CA on triglyceride accumulation in oleic acid-treated L6 muscle cells. Oleic acid-treated L6 muscle cells were treated with CA (100  $\mu\text{M}$ ) for 12 hr. Data shown are presented as the means $\pm$ S.D. of three independent experiments. \*\* $p$ <0.01 compared to OA-untreated group. # $p$ <0.05 compared to OA-treated group. OA, oleic acid.

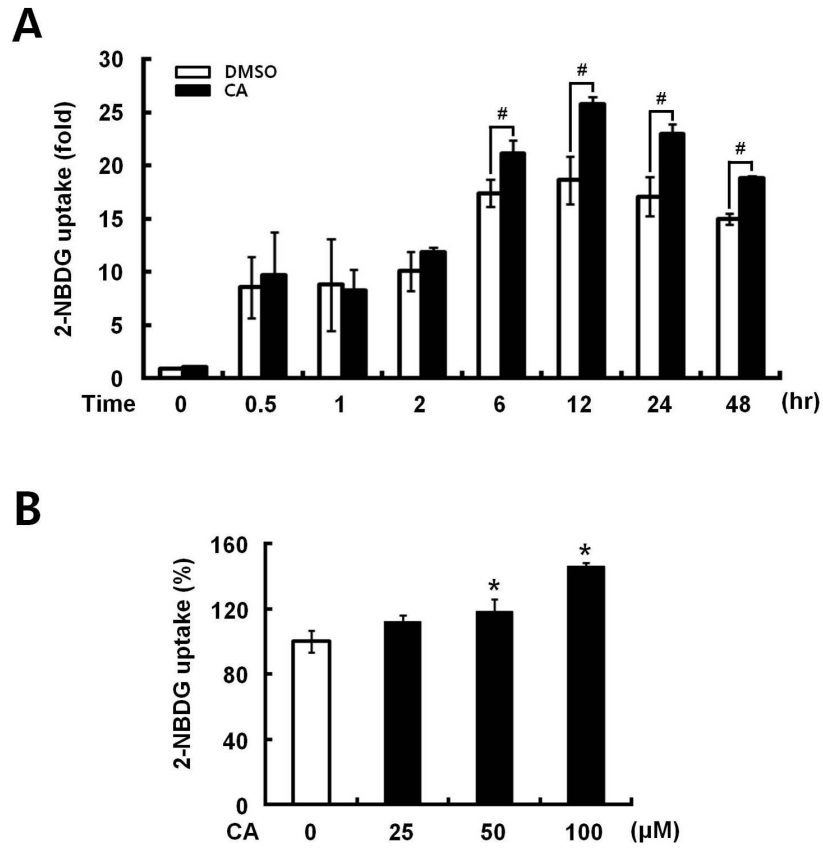


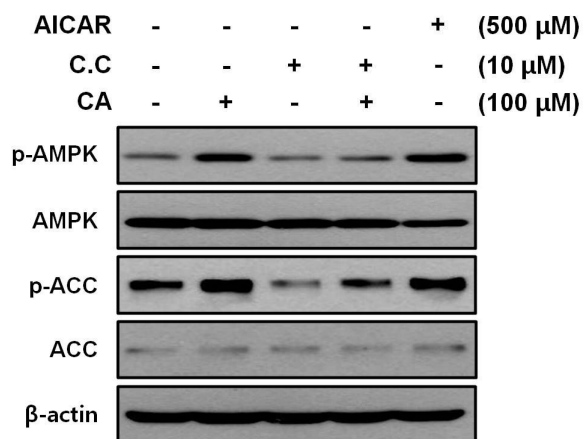
Figure 12. Effect of CA on 2-NBDG uptake in L6 muscle cells. Serum deprived L6 muscle cells were treated with CA and 2-NBDG for indicated time period (A) or indicated concentrations of CA and 2-NBDG for 12 hr (B). Data shown are presented as the means±S.D. of three independent experiments. # $p < 0.05$  compared to each control group (DMSO). \* $p < 0.05$  compared to CA-untreated group.

#### 5) AMPK 활성화 저해제 실험

L6 근육세포에서 CA에 의한 포도당 및 지질 대사에 미치는 영향들이 AMPK 활성화에 따른 신호전달에 의해 일어난 결과인지 확인하기 위해 AMPK inhibitor인 Compound C를 사용하여 조사하였다. Compound C를 단독으로 처리하면 Compound C 미처리 군에 비하여 AMPK와 ACC의 인산화가 감소되었다. 그러나 Compound C를 전처리하고 CA를 처리한 실험군에서는 AMPK와 ACC의 인산화가 회복되었음을 확인하였다. 또한, AMPK activator인 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR)를 처리한 세포의 AMPK와 ACC 인산화 증가는 CA 단독 처리군의 AMPK와 ACC 인산화 증가와 비슷한 활성을 나타내었다 (Figure 13).

또한, oleic acid로 지질 축적을 유도한 L6 근육세포에서 Compound C의 처리는 세포의 지질 축적을 증가시켰다. Oil-Red-O 염색 결과를 정량화한 결과, Compound C 처리 군은  $260.13 \pm 7.90\%$ 로,  $235.60 \pm 5.55\%$ 의 값을 나타낸 Compound C 미처리 군과 비교하여 유의적인 증가를 보였다. 그러나 Compound C를 전처리한 군에 CA를 처리하면  $224.15 \pm 8.43\%$ 의 값을 확인하였고, Compound C 처리 군에 비해 지질 축적이 유의적으로 감소하였다 (Figure 14A). 마찬가지로 CA에 의해 증가된 포도당 흡수가 AMPK 활성화에 따른 결과인지 확인하기 위하여 Compound C를 처리하여 포도당 흡수를 확인하였다. Compound C 단독 처리 군은  $94.89 \pm 4.42\%$ 로,  $100.00 \pm 6.46\%$ 로 확인된 Compound C 미처리 군에 비해 포도당 흡수가 감소되었다. Compound C를 전처리한 군에 CA를 처리하면 포도당 흡수가  $127.13 \pm 10.16\%$ 의 값을 나타내었고, Compound C 단독 처리 군과 비교하여 유의적으로 증가하였다 (Figure 14B).





**Figure 13. Effect of Compound C on AMPK and ACC phosphorylation by CA in L6 muscle cells.** Serum deprived L6 muscle cells were pre-treated with Compound C (10  $\mu$ M) for 30 min and then, treated with CA (100  $\mu$ M) for 12 hr. Protein extracts were immunoblotted with specific antibodies that recognize phospho-AMPK (p-AMPK), AMPK, phospho-ACC (p-ACC) and ACC. AICAR was used as positive control. The results are representative of three independent experiments. C.C, Compound C

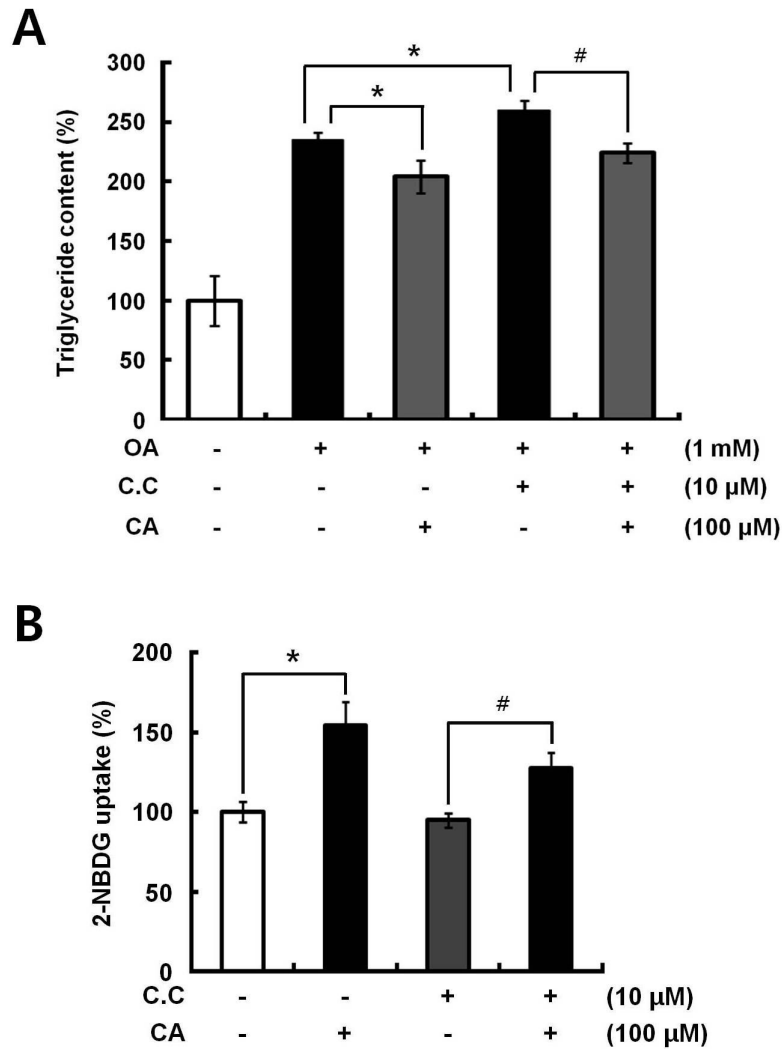


Figure 14. Effect of Compound C on triglyceride accumulation and 2-NBDG uptake by CA in L6 muscle cells. Serum deprived L6 muscle cells were pre-treated with Compound C (10  $\mu$ M) for 30 min and then, treated with oleic acid for 24 hr before CA treatment (A) and 2-NBDG and CA for 12 hr (B). Data shown are presented as the means $\pm$ S.D. of three independent experiments. \* $p$ <0.05 compared to C.C-untreated group. # $p$ <0.05 compared to C.C-treated group. OA, oleic acid; C.C, Compound C

## IV. 고찰

포유동물의 간, 근육, 지방 조직들은 상호 에너지 대사가 밀접하게 관련되어 작용한다. 고지방 사료를 먹인 생쥐에서 제주조릿대 추출물은 비만을 개선하는 효과 (Kang *et al.*, 2012)가 있다고 보고 된 바 있어 근육 조직의 에너지 대사에 건강에 유익한 활성을 나타낼 것이라고 기대할 수 있다. 따라서, 본 연구는 L6 근육세포에서 제주조릿대 추출물 (JBE)과 JBE의 주요 성분인 *p*-coumaric acid가 포도당 및 지질 대사에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 수행되었다.

본 연구 결과에서 JBE를 처리하지 않은 L6 근육세포에서도 배양시간 경과에 따라 포도당 흡수가 증가되었다. 이는 근육세포가 근육 조직과 유사한 대사기능을 수행한다는 것을 암시하는 결과라 사료된다. 또한, JBE를 처리한 L6 근육세포에서는 AMPK 활성화 경로를 통해 포도당 흡수가 촉진되는 결과를 나타내었다. 대표적인 대사성 질환 중 제 2형 당뇨병은 세포내로 포도당을 제대로 흡수하지 못하여 인체의 포도당 항상성이 유지되지 못하는 질환이다 (Ruderman *et al.*, 1990). 근육 조직이 혈중의 포도당을 흡수하고 대사하여 인체의 에너지 항상성을 유지하는 기관 (Klip and Pâquet, 1990; Sinacore and Gluve, 1993) 임을 고려하면, 본 연구에서 확인된 JBE의 포도당 흡수 촉진 효과는 제 2형 당뇨병의 예방 혹은 개선에 유익한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

AMPK는 구성 요소 중  $\alpha$  subunit의 threonin-172 잔기가 인산화되어 활성화되는데 (Hardie, 2003; Long and Zierath, 2006), 이는 포도당이나 지방산을 사용하여 에너지를 생산할 수 있다는 신호이다 (Fediuc *et al.*, 2006; Winder and Hardie, 1999). 본 연구 결과는 JBE가 AMPK 활성화를 통하여 포도당과 지질 대사에 영향을 미치고 있음을 나타내었다. 활성화된 AMPK는 세포 내 CD36의 세포막으로의 전이를 촉진하여 지방산 흡수를 매개한다고 보고된 바 있다 (Koonen *et al.*, 2005). 본 연구에서는 AMPK 활성화에 따른 CD36의 전이를 직접적으로 조사하지는 않았지만, JBE가 CD36의 발현과 이를 조절하는 전자인 PPAR $\gamma$ 의 발현을 유도하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 PPAR $\gamma$ 와 CD36의 발현이 증가하면 세포막으로 전이되는 CD36의 양이 증가하여 지방산

흡수 촉진이 이루어진다는 것을 의미한다.

세포 내로 유입된 지방산은 미토콘드리아 내 지방산 산화 ( $\beta$ -oxidation)에 의해 에너지를 만들거나 중성지방 합성에 이용된다 (Glatz *et al.*, 2010; Kamei *et al.*, 2008). JBE는 AMPK 활성화 경로를 통해 ACC의 인산화와 PPAR $\alpha$ 의 발현을 증가시켰다. 특히, oleic acid를 처리하여 지질 축적이 유도된 L6 세포에서 JBE는 AMPK와 ACC의 인산화 증가와 더불어 중성지방 축적을 감소시켰다. 이는 JBE가 지질 합성을 저해하거나 지질 분해를 촉진하는 결과로 해석할 수 있다. 지질 분해는 hormone-sensitive lipase (HSL)의 활성화에 의해 진행되며 (Langfort *et al.*, 2003), 특히 근육에서의 지질 분해는 지방산을 필요로 하는 시기인 근육 수축이나 운동 발생 시점에서 일어난다. HSL의 상위 인자인 PKA가 활성화되면 HSL의 활성을 증가시킴으로써 근육내 지질 분해가 일어나지만, 활성화된 AMPK는 오히려 지질 분해를 억제한다고 보고되었다 (Watt *et al.*, 2006B). 따라서 JBE에 의한 지질 축적 감소는 지질 분해 활성화보다는 지질 합성을 저해하여 나타난 결과라고 사료되지만, 지질 합성 및 분해에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다. 한편, ACC의 불활성과 ACC의 전자인자로 작용하는 SREBP-1c의 발현 감소는 세포내 지질 축적이 감소됨을 의미한다 (Osborne, 2000; Shimano, 2001). Oleic acid로 지질 축적을 유도한 L6 근육세포에서 JBE는 SREBP-1c와 FAS의 발현 감소를 통해 지질 축적을 감소시키는 활성을 보여 주었다. 이는 JBE가 비만 조건에서도 근육세포의 지질 대사에 영향을 미칠 수 있음을 제시하는 결과라 사료된다.

PPAR $\gamma$ 와 PPAR $\alpha$ 는 제 2형 당뇨병의 예방 및 치료에 주요한 인자라고 알려져 있다 (Chen *et al.*, 2009). 혈중의 자유 지방산 또한 포도당과 마찬가지로 인슐린 저항성의 특징을 갖는 제 2형 당뇨병의 주요 원인으로, 지방산 흡수 및 산화 촉진 작용은 제 2형 당뇨병을 예방하고 개선하는데 기여할 수 있다 (Na *et al.*, 2011). PPAR $\gamma$ 는 세포내로 지방산을 흡수하는데 관여하는 CD36의 전자인자로 작용하며, PPAR $\alpha$ 는 미토콘드리아 내부로 지방산을 흡수하는 CPT-1의 전자인자로 알려져 있다 (Chen *et al.*, 2009; Vega *et al.*, 2000). JBE는 PPAR $\gamma$ 와 PPAR $\alpha$ 의 발현 증가를 통해 근육세포의 지방산 흡수와 산화에 효과적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

앞서 논의한 JBE의 대사성 질환 개선작용은 JBE에 함유된 다양한 화합물들에 의한 공동작용으로 나타날 가능성이 높다. 하지만 이러한 JBE의 작용기전을 밝히기 위해서는 JBE에 함유된 단일 물질들에 대한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 JBE에 가장 풍부하게 함유되어 있는 *p*-coumaric acid (CA)에 대한 후속 연구를 수행하였다.

JBE의 활성과 유사하게 CA 또한 AMPK 및 ACC의 인산화 증가와 함께 포도당 흡수 촉진 효과, 지방산 산화 촉진 활성, 지질 축적 억제 활성을 나타내었다. 식물에서 유래한 물질들의 유익한 활성은 당뇨병 치료에 부작용을 나타낼 수 있는 치료제의 해결책으로 알려져 있다 (Li *et al.*, 2004; Szkudelska and Szkudelski, 2010). 식물 스테롤로 잘 알려진  $\beta$ -sitosterol은 AMPK 활성화 경로를 통해 포도당 흡수 증가와 세포내 중성지방 및 콜레스테롤 함량의 감소를 보임으로써 근육세포의 포도당 및 지질 대사 활성이 보고되었다 (Hwang *et al.*, 2008). 또한, naringenin (Zygmunt *et al.*, 2010)과 resveratrol (Park *et al.*, 2007)은 인슐린 자극 경로가 아닌 AMPK 활성화 경로를 통하여 포도당의 흡수가 증가됨을 확인하였다. 따라서 CA에 의해 확인된 결과들은  $\beta$ -sitosterol, naringenin, resveratrol 등과 비슷한 활성을 보인다고 사료된다. 또한, JBE에 함유된 CA가 천연물로서 당뇨병 치료제로 인해 나타날 수 있는 부작용을 감소시킬 수 있을 것으로 판단되며 당뇨병 개선에 탁월한 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

앞선 결과들은 AMPK가 활성화됨에 따라 에너지 대사 조절을 위해 일어나는 신호 전달 (Fediuc *et al.*, 2006; Long and Zierath, 2006; Winder and Hardie, 1999)로, AMPK inhibitor인 Compound C를 처리하면 AMPK 활성이 감소된다 (Gruzman *et al.*, 2009). L6 근육세포에 Compound C를 전처리하면 AMPK와 ACC의 인산화가 감소되었지만, CA를 처리하면 감소되었던 AMPK와 ACC의 인산화가 회복되는 양상을 보였다. 또한, 포도당 흡수의 증가와 지질 축적의 감소 결과를 나타내었다. 특히, CA (100  $\mu$ M)에 의한 AMPK와 ACC 인산화 증가는 AICAR (500  $\mu$ M)와 동일한 수준으로 평가되었다. AICAR는 인슐린 저항성 동물 모델에서 인슐린-비의존적 경로를 통하여 AMPK를 활성화시키고, 포도당 흡수를 증가시켰다 (Bergeron *et al.*, 2001). 또한, 고지방 식이로 인슐

린 저항성이 유도된 쥐에서 근육의 인슐린 작용을 개선시키고, malonyl CoA 감소와 함께 글리코젠 합성 작용을 유도함으로써 인슐린 저항성과 제 2형 당뇨병의 치료 가능성을 보고하였다 (Iglesias *et al.*, 2002). 이러한 AICAR와 유사한 활성을 가진 CA는 AMPK activator로서 활성을 나타내어 AMPK 활성화를 유도하고 세포내 에너지 대사 조절을 할 것이라 사료되며 당뇨 치료제로의 활용가능성을 강력히 시사하고 있다.

본 연구의 결과를 종합해 보면, JBE와 CA는 세포내 AMPK의 활성화 작용을 통해 포도당 흡수 촉진, 지방산 산화 촉진 및 지질 합성 저해 활성을 나타내었다. 따라서 JBE의 이러한 작용의 일부는 CA에 의한 결과라고 추측되나, 이에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다. 또한, CA는 AMPK activator로서의 특성을 나타내어 인슐린 저항성 및 제 2형 당뇨의 예방과 개선 소재로 활용 가능성을 제시하고 있다.

## V. 참고 문헌

- Abdel-Wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Ellah MF, Helal GK, Khalifa F and Hamada FM (2003) Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart, *Pharmacol. Res.*, 48:461-465
- Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA and Wakil SJ (2001) Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2, *Science*, 291:2613-2616
- Abumrad N, Harmon C and Ibrahimi A (1998) Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process, *J. Lipid Res.*, 39:2309-2318
- An SM, Lee SI, Choi SW, Moon SW and Boo YC (2008) *p*-Coumaric acid, a constituent of *Sasa quepaertensis* Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by alpha-melanocyte stimulating hormone, *Br. J. Dermatol.*, 159:292-299
- Aschenbach WG, Hirshman MF, Fujii N, Sakamoto K, Howlett KF and Goodyear LJ (2002) Effect of AICAR treatment on glycogen metabolism in skeletal muscle, *Diabetes*, 51:567-573
- Bergeron R, Previs SF, Cline GW, Perret P, Russell RR 3rd, Young LH and Shulman GI (2001) Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats, *Diabetes*, 50:1076-1082

- Bonen A, Campbell SE, Benton CR, Chabowski A, Coort SL, Han XX, Koonen DP, Glatz JF and Luiken JJ (2004) Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36, *Proc. Nutr. Soc.*, 63:245-249
- Chang L, Chiang SH and Saltiel AR (2004) Insulin signaling and the regulation of glucose transport, *Mol. Med.*, 10:65-71
- Chen Y, Li Y, Wang Y, Wen Y and Sun C (2009) Berberine improves free-fatty-acid-induced insulin resistance in L6 myotubes through inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and fatty acid transferase expressions, *Metabolism*, 58:1694-1702
- Cortright RN, Muoio DM and Dohm GL (1997) Skeletal muscle lipid metabolism: A frontier for new insights into fuel homeostasis, *J. Nutr. Biochem.*, 8:228-245
- DeFronzo RA (2004) Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *Med. Clin. N. Am.*, 88:787-835
- Fediuc S, Gaidhu MP and Ceddia RB (2006) Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells, *J. Lipid Res.*, 47:412-420
- Frayn KN, Arner P and Yki-Järvinen H (2006) Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease, *Essays Biochem.*, 42:89-103
- Glatz JF, Luiken JJ and Bonen A (2010) Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease,



*Physiol. Rev.*, 90:367-417

Gruzman A, Babai G and Sasson S (2009) Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) as a new target for antidiabetic drugs: A review on metabolic, pharmacological and chemical considerations, *Rev. Diabet. Stud.*, 6:13-36

Hardie DG (2003) Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status, *Endocrinology*, 144:5179-5183

Harris SB, Petrella RJ and Leadbetter W (2003) Lifestyle interventions for type 2 diabetes. Relevance for clinical practice, *Can. Fam. Physician.*, 49:1618-1625

Holloway GP, Bezaire V, Heigenhauser GJ, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A and Spriet LL (2006) Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyl transferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise, *J. Physiol.*, 571:201-210

Hulver MW, Berggren JR, Cortright RN, Dudek RW, Thompson RP, Pories WJ, MacDonald KG, Cline GW, Shulman GI, Dohm GL and Houmard JA (2003) Skeletal muscle lipid metabolism with obesity, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 284:741-747

Hwang JH, Choi SY, Ko HC, Jang MG, Jin YJ, Kang SI, Park JG, Chung WS and Kim SJ (2007) Anti-inflammatory effect of the hot water extract from *Sasa quepaertensis* leaves, *Food Sci. Biotechnol.*, 16:728-733

- Hwang SL, Kim HN, Jung HH, Kim JE, Choi DK, Hur JM, Lee JY, Song H, Song KS and Huh TL (2008) Beneficial effects of beta-sitosterol on glucose and lipid metabolism in L6 myotube cells are mediated by AMP-activated protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377: 1253-1258
- Iglesias MA, Ye JM, Frangioudakis G, Saha AK, Tomas E, Ruderman NB, Cooney GJ and Kraegen EW (2002) AICAR administration causes an apparent enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats, *Diabetes*, 51:2886-2894
- Jang MG, Park SY, Lee SR, Choi SY, Hwang JH, Ko HC, Park JG, Chung WS and Kim SJ (2008) *Sasa quelpaertensis* leaf extracts induce apoptosis in human leukemia HL-60 cells, *Food Sci. Biotechnol.*, 17: 188-190
- Jørgensen SB, Richter EA and Wojtaszewski JF (2006) Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise, *J. Physiol.*, 574:17-31
- Kamei Y, Miura S, Suganami T, Akaike F, Kanai S, Sugita S, Katsumata A, Aburatani H, Unterman TG, Ezaki O and Ogawa Y (2008) Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: role of retinoid X receptor/liver X receptor and forkhead-O1 transcription factor, *Endocrinology*, 149:2293-2305
- Kang SI, Shin HS, Kim HM, Hong YS, Yoon SA, Kang SW, Kim JH, Ko HC and Kim SJ (2012) Anti-obesity properties of a *Sasa quelpaertensis*

extract in high-fat diet-induced obese mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76:755-761

Khan V, Najmi AK, Akhtar M, Aqil M, Mujeeb M and Pillai KK (2012) A pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential, *J. Pharm. Bioallied Sci.*, 4:27-42

Kiens B (2006) Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance, *Physiol. Rev.*, 86:205-243

Klip A and Pâquet MR (1990) Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation, *Diabetes Care*, 13:228-243

Koonen DP, Glatz JF, Bonen A and Luiken JJ (2005) Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1736:163-180

Koopman R, Schaart G and Hesselink MK (2001) Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids, *Histochem. Cell. Biol.*, 116:63-68

Langfort J, Donsmark M, Ploug T, Holm C and Galbo H (2003) Hormone-sensitive lipase in skeletal muscle: regulatory mechanisms, *Acta. Physiol. Scand.*, 178:397-403

Lee SI, An SM, Mun GI, Lee SJ, Park KM, Park SH and Boo YC (2008) Protective effect of *Sasa quepaertensis* and *p*-coumaric acid on ethanol-induced hepatotoxicity in mice, *J. Appl. Biol. Chem.*, 51:148-154

- Lee WJ, Kim M, Park HS, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, Koh EH, Won JC, Kim MS, Oh GT, Yoon M, Lee KU and Park JY (2006) AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR alpha and PGC-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 340:291-295
- Li WL, Zheng HC, Bukuru J and De Kimpe N (2004) Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus, *J. Ethnopharmacol.*, 92:1-21
- Long YC and Zierath JR (2006) AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation, *J. Clin. Invest.*, 116:1776-1783
- Luceri C, Giannini L, Lodovici M, Antonucci E, Abbate R, Masini E and Dolara P (2007) *p*-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo, *Br. J. Nutr.*, 97:458-463
- Na LX, Zhang YL, Li Y, Liu LY, Li R, Kong T and Sun CH (2011) Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 21:526-533
- Osborne TF (2000) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action, *J. Biol. Chem.*, 275:32379-32382
- Palanivel R and Sweeney G (2005) Regulation of fatty acid uptake and metabolism in L6 skeletal muscle cells by resistin, *FEBS Lett.*, 579: 5049-5054
- Park CE, Kim MJ, Lee JH, Min BI, Bae H, Choe W, Kim SS and Ha J

- (2007) Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase, *Exp. Mol. Med.*, 39:222-229
- Park SH, Gammon SR, Knippers JD, Paulsen SR, Rubink DS and Winder WW (2002) Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle, *J. Appl. Physiol.*, 92:2475-2482
- Ryder JW, Chibalin AV and Zierath JR (2001) Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle, *Acta. Physiol. Scand.*, 171:249-257
- Shimano H (2001) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes, *Prog. Lipid Res.*, 40: 439-452
- Sinacore DR and Gulve EA (1993) The role of skeletal muscle in glucose transport, glucose homeostasis, and insulin resistance: implications for physical therapy, *Phys. Ther.*, 73:878-891
- Sultana N and Lee NH (2009) New phenylpropanoids from *Sasa quelpaertensis* Nakai with tyrosinase inhibition activities, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 30:1729-1732
- Sultana N and Lee NH (2010) A new alkene glucoside from the leave of *sasa quelpaertensis* nakai, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31: 1088-1090
- Szkudelska K and Szkudelski T (2010) Resveratrol, obesity and diabetes, *Eur. J. Pharmacol.*, 635:1-8

- Vega RB, Huss JM and Kelly DP (2000) The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes, *Mol. Cell. Biol.*, 20:1868-1876
- Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M and Andreelli F (2009) Targeting the AMPK pathway for the treatment of type 2 diabetes, *Front. Biosci.*, 14:3380-3400
- Wakelam MJ (1985) The fusion of myoblasts, *Biochem. J.*, 228:1-12
- Watt MJ, Steinberg GR, Chen ZP, Kemp BE and Febbraio MA (2006A) Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes, *J. Physiol.*, 574:139-147
- Watt MJ, Holmes AG, Pinnamaneni SK, Garnham AP, Steinberg GR, Kemp BE and Febbraio MA (2006B) Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 290:500-508
- Winder WW and Hardie DG (1999) AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes, *Am. J. Physiol.*, 277:1-10
- Wing RR, Goldstein MG, Acton KJ, Birch LL, Jakicic JM, Sallis JF Jr., Smith-West D, Jeffery RW and Surwit RS (2001) Behavioral science research in diabetes: lifestyle changes related to obesity eating behavior, and physical activity, *Diabetes Care*, 24:117-123

- Zang LY, Cosma G, Gardner H, Shi X, Castranova V and Vallyathan V (2000) Effect of antioxidant protection by *p*-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 279:954-960
- Zhang Q, Xiao X, Feng K, Wang T, Li W, Yuan T, Sun X, Sun Q, Xiang H and Wang H (2011) Berberine moderates glucose and lipid metabolism through multipathway mechanism, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, pii:924851
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ and Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, *J. Clin. Invest.*, 108:1167-1174
- Zou C, Wang Y and Shen Z (2005) 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement, *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 64: 207-215
- Zygmunt K, Faubert B, MacNeil J and Tsiani E (2010) Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 398:178-183

## VI. 요약

본 연구는 L6 근육세포에서 제주조릿대 (*Sasa quelpaertensis* Nakai) 추출물 (Jeju dwarf bamboo extract, JBE)과 제주조릿대 추출물의 주요 물질인 *p*-coumaric acid (CA)가 포도당 및 지질 대사에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행되었다. JBE는 2-NBD glucose (2-NBDG) 흡수를 자극하였다. JBE는 또한 AMP-activated protein kinase (AMPK)와 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인산화를 증가시켰지만, Akt 인산화를 감소시켰다. 게다가, JBE는 peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), fatty acid translocase (FAT/CD36) 및 PPAR $\alpha$ 의 발현도 증가시켰다. Oleic acid를 처리하여 지질 축적을 유도한 세포에서, JBE는 sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c)와 fatty acid synthase (FAS)의 발현을 감소시킴으로써 oleic acid로 유도된 세포내 중성지방 함량을 저해시켰다. 그러나 AMPK, ACC의 인산화와 PPAR $\alpha$ 의 발현을 증가시켰다. JBE의 주요 물질인 *p*-coumaric acid (CA)는 AMPK와 ACC의 인산화를 증가시켰을 뿐만 아니라 carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1) 유전자 발현도 증가시켰다. 게다가, CA는 oleic acid로 유도된 세포내 중성지방 함량을 유의적으로 감소시켰고, 2-NBDG 흡수도 증가시켰다. AMPK inhibitor인 Compound C의 처리는 ACC 인산화의 감소와 중성지방 함량 증가뿐만 아니라 2-NBDG 흡수의 감소를 나타내었고, 이러한 억제 활성들은 CA 처리에 의해 회복되었다. 결론적으로, JBE와 CA는 L6 근육세포에서 AMPK signaling pathway를 통해 포도당과 지질 대사를 조절함으로써 제 2형 당뇨병을 예방하고 개선시킬 수 있는 소재로의 가능성을 제시하고 있다.



## 감 사 의 글

4년의 학부생활 그리고 2년의 대학원 생활을 마치며 그 동안의 저를 돌아보니 감회가 새롭습니다. 그 동안 큰 힘이 되었던 많은 분들께 지면으로나마 감사의 말씀을 전하고자 합니다.

우선, 많이 부족한 저에게 연구의 즐거움을 깨우쳐 주신 김세재 교수님께 깊은 감사의 말씀과 존경의 마음을 표현합니다. 그리고 저의 부족한 논문을 꼼꼼히 수정해 주시고 지도를 해 주신 김원택 교수님과 실험에 대하여 많은 조언을 해주신 이선령 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 생물학과 학부, 대학원 생활을 하면서 깊은 학문적 지식과 인생의 조언을 해주신 오덕철 교수님, 김문홍 교수님, 이화자 교수님, 고석찬 교수님, 김명숙 교수님께도 감사의 말씀을 전하면서 교수님들의 은혜에 보답하는 제자가 되도록 하겠습니다.

대학생활의 대부분을 차지하였던 분자생물학 실험실의 선·후배님들께도 인사를 전합니다. 학문적 가르침은 물론 제 인생의 나침반이 되어 주시는 성일오빠, 함께 있는 것만으로도 활력소가 되고 무한 애정을 주시는 혜선언니. 매순간마다 기대에 못 미치는 것 같아 너무 죄송하고, 또한 부족한 후배지만 믿고 기다려 주셔서 감사합니다. 그리고 얼마 남지 않은 두 분 결혼도 축하드립니다. 2년이란 시간 동안 해 준 것보다는 받은 것이 더 많아 미안한 승우오빠와 감정 기복이 심한 내 마음을 잘 이해해주고 먼저 알아주는 고마운 정환오빠. 존재 자체만으로도 나에게 큰 힘이 되는 분들이 있어 정말 행복했습니다.

실험실 오실 때마다 후배들을 너무 잘 챙겨주시는 정형복 박사님, 나를 예뻐해 주시는 진영준 선배님, 만나면 너무나 유쾌한 오대주 선배님, 논문에 많은 도움을 주신 황준호 선배님, 친절하신 전형식 선배님, 좋은 말씀 해 주시는 김은미 선배님 감사드립니다. 그리고 후배를 먼저 챙겨주시는 고희철 선배님, 고마운 미경언니, 이제는 진짜 직장인 같은 무한오빠, 언제든 만나면 반가운 효민오빠, 속 깊은 윤석오빠, 실험에 대한 조언을 아끼지 않았던 윤실언니, 성격 좋은 민진언니에게도 감사의 마음을 전합니다. 후배지만 말이 잘 통하는 지연이, 부지런한 하나, 엉뚱하지만 착한 민호에게도 고맙고, 많이 챙겨주지 못해서 미안한 상언이

와 영원한 나의 애기들 여진이, 유경이, 선희 그리고 멀리 호주에 있는 탐이나에게도 고마움의 마음을 전하고 싶습니다.

배울 점 많고 항상 고마운 해산식물분류학 실험실의 강정찬 선생님, 은규오빠, 미연이, 형우오빠, 영호오빠. 논문을 준비하면서 많이 친해진 미생물학 실험실의 지영언니, 한수언니, 새로이 학문의 길로 접어드는 지현이와 가영이 모두 감사합니다.

비슷한 학문의 길을 걷다 보니 말이 잘 통하는 은미, 앞으로 멋진 치과의를 꿈꾸는 태정이, 자주 만나지 못해 항상 보고 싶은 혜미 너무 고맙습니다. 그리고 이제는 어엿한 직장인이 된 태정이, 알고보면 속 깊은 보람이, 아이들을 사랑하는 유진에게도 고마움의 마음을 전합니다. 20년 가까이 알고 지낸 아람이, 얼굴 한번 보기 정말 힘든 나영이를 비롯한 친구들에게도 고맙다는 말을 전합니다.

진솔한 이야기를 들어 주는 지남오빠, 짓궂은 장난에도 웃으면서 받아주는 재영오빠, 열심히 공부하고 있을 인철오빠, 학생들을 위해 지금도 열심히 고생하시는 현수오빠, 산을 너무 좋아하는 동현오빠, 배울 점 많은 성표오빠, 필드가 어울리는 동원오빠, 마음이 잘 통하는 친구 송이, 의대에서 열심히 하고 있는 동환이, 웃음소리 유쾌한 종현이, 잘 챙겨주시는 세영언니, 만날 때 마다 반가운 수경언니, 세상에서 제일 착한 지혜. 모두들 너무너무 고맙습니다.

나의 전부인 우리 가족. 내가 너무너무 사랑하는 부모님. 그 동안 바쁘다는 핑계로 소홀해서 정말 죄송하고, 못난 딸이지만 지금까지 믿고 기다려 주셔서 감사합니다. 앞으로는 부모님의 사랑에 보답하며 작은 것에 감사하게 생각하는 마음을 배우겠습니다. 그리고 외국에서 자신의 꿈을 이루고 있는 든든한 우리 동생. 언제나 지금처럼 우리 가족들 모두 건강하고 행복했으면 하는 바람을 가져봅니다. 그리고 진심으로 사랑합니다.

마지막으로 3년 반이라는 시간 동안 한결같이 내 옆자리에서 항상 힘이 되어준 나의 애정 관동오빠에게도 고맙다는 말과 사랑한다는 말을 전합니다.

많이 부족한 저를 꾸짖어 주시고, 아껴주시고, 사랑해 주신 모든 분들께 감사드립니다. 더욱 성숙한 모습으로 보답하겠습니다. 그리고 항상 모든 분들의 행복을 기원하겠습니다. 감사합니다.