Methanol extract of *Lespedeza maximowiczii* var. *tricolor* Nakai improves glucose metabolism through PPAR γ agonist and insulin-mimetic effect in 3T3-L1 adipocytes and *db/db* mice

Chul-Min Park¹ · Hui Kim² · Dong-Young Rhyu²

삼색싸리 메탄올 추출물의 3T3-L1지방세포와 *db/db* 마우스에서의 PPAR γ 작용제와 인슐린 유사효과를 통한 혈당조절 개선효과

박철민¹ · 김 휘² · 류동영²

Received: 17 September 2019 / Accepted: 11 November 2019 / Published Online: 31 December 2019
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2019

Abstract The aim of this study is to investigate the effect of *Lespedeza maximowiczii* var. *tricolor* Nakai (LMTN) on glucose metabolism. LMTN extract significantly enhanced the glucose uptake and lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes compared with control. Also, LMTN extract in 3T3-L1 adipocytes significantly increased the protein expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ , insulin receptor substrate-1, and glucose transporter (GLUT)4. The regulatory effect on glucose uptake or insulin signal transduction of LMTM extract was lower than troglitazone or pinitol such as the positive control, but increased PPAR γ activation. Additionally, LMTM extract has an insulin-mimetic effect. In *db/db* mice, LMTN extract (250 mg/kg BW) significantly reduced water and food intake, blood glucose, and level of plasma triglyceride and total cholesterol. Furthermore, the expression of PPAR α and GLUT4 mRNA in adipose or muscle tissue effectively was increased by oral treatment of

LMTN extract. Thus, our results suggest that LMTN extract improves the glucose metabolism through PPAR γ and insulin-mimetic effect in 3T3-L1 adipocytes and *db/db* mice.

Keywords C57BLKS/J *lar-db/db* mice · Insulin signal transduction · *Lespedeza maximowiczii* var. *tricolor* · Peroxisome proliferator-activated receptor · 3T3-L1 adipocytes

서론

당뇨병 환자의 약 95% 이상을 차지하고 있는 2형 당뇨병은 부적절한 식생활습관, 비만 인구의 증가, 운동부족으로 인해 현재도 급격히 증가하고 있다[1,2]. 이러한 2형 당뇨병의 원인은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았으나 대표적인 원인은 인슐린 저항성이다. 인슐린 저항성은 간, 근육, 지방세포의 인슐린 수용체에 인슐린이 결합한 후 insulin receptor substrate (IRS)1·2 tyrosine 잔기의 인산화가 증가되고, 하위신호전달인 phosphoinositide 3-kinases (PI3K)/protein kinase B (AKT)의 활성화를 통하여 당 수송체 단백질인 glucose transporter type (GLUT) 4가 세포 내 원형질에서 세포막으로 이동하여 포도당을 유입하는 과정이 감소된다는 것을 의미한다[3-5]. 또 다른 원인은 췌장의 베타세포 기능 저하와 관련된 인슐린 분비능의 저하가 주된 원인으로 알려져 있다[6,7]. 이러한 2형 당뇨병의 치료약물로는 경구용 혈당강하제나 인슐린 저항성을 개선하는 metformin과 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 작용제로 알려진 thia-zolidinedione계의 약물이 있다[8]. 그러나 PPAR γ 작

Dong Young Rhyu (✉)
E-mail: rhyudy@mokpo.ac.kr

¹Environmental Technology Research Institute, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 01811, Republic of Korea

²Dept. of Oriental Medicine Resources and Institute of Korean Medicine Industry, Mokpo National University, Jeonnam 58554, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

용제의 심부전증을 포함한 심혈관질환에 대한 안전성 뿐만 아니라, 이러한 약물로 인해 방광암 유발, 유산증, 설사, 구토, 비만 유도 등의 위험성을 오히려 증가시키는 여러 가지 부작용을 가지고 있어 큰 논란이 되고 있다[9-11]. 따라서 당뇨의 예방 및 치료를 위한 약물개발이나 건강기능식품과 관련된 많은 연구가 진행되고 있고, 당뇨병의 성공적인 치료를 위하여 부작용의 위험성이 적으며 적절한 인슐린 분비 촉진 및 근육이나 지방조직의 인슐린 저항성을 개선시킬 수 있는 천연소재 개발이 요구되고 있다[12,13].

삼색싸리(*Lepedeza maximowiczii* var. *tricolor*)는 콩과(Leguminosae) 싸리속(Genus *Lepedeza* Michx.)에 속하는 여러해살이풀로서 중국, 일본 및 우리나라 남해안 지역에 자생하고 있는 식물이다[14]. 예로부터 한의약학에서는 싸리속 식물을 이용하여 백반증(白癬症), 요통(腰痛), 당뇨병과 이로 인한 합병증으로 발병하는 콩팥병 치료 등의 치료에 쓰였다고 기록되어 있고, 민간에서는 가축 사료로 활용되었다[12,15-17]. 현재까지 보고된 삼색싸리의 생리활성은 tyrosinase 활성 억제효과이고, isoflavone 계열의 daidzein, hydroxygenistein, genistein, uncinanone B, desmodianone H, uncinanone B 성분이 이러한 작용기전에 밀접하게 관련되어 있다고 보고된 바 있다[18,19]. 이 밖의 싸리속 식물의 생리활성과 유효성분으로는 xanthine oxidase 저해 활성, tyrosinase 저해활성, SOD 유사활성, 아질산염 소거능, 항산화와 항균효과 및 혈당조절효과 등이 있으며, flavonoids, phenolics, sterols, phenylpropanoids, lignans, phenyldilactones 계열의 화합물이 함유되어 있다고 알려져 있다[20-32]. 그러나 삼색싸리의 인슐린 민감성 또는 당대사와 관련된 연구결과는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 신장병과 당뇨에 활용되었다는 전통지식에도 불구하고 아직까지 과학적으로는 확인된 바가 없는 삼색싸리를 이용하여 2형 당뇨병의 예방과 치료에 효과가 있는지를 알아보기 위해 3T3-L1 지방세포와 2형 당뇨모델인 C57BLKS/J *lar-db/db* 마우스를 이용하여 생리활성을 평가하였다.

재료 및 방법

추출물 제조

삼색싸리(*Lepedeza maximowiczii* var. *tricolor* Nakai; LMTN)는 해남 달마산에서 채집하였다. 건조된 LMTN 391 g은 상온에서 80% 메탄올로 24시간 침출하는 과정을 총 6회 반복하여 추출하였다. LMTN 메탄올 추출용액은 여과한 후 회전감압 농축기로 농축한 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다. LMTN 추출물의 수율은 4.02% (16 g)로 나타났다.

3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 분화유도

3T3-L1 지방전구세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 사용하였다. 3T3-L1 지방전구세포는 5% CO₂, 37°C의 배양기에서 100 Units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10% fetal calf serum (GE Healthcare Life Sciences)가 함유된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지 조건에서 배양되었다. 이러한 3T3-L1 지방전구세포는 2일마다 신선한 배지로 보충하면서 계

대배양하여 실험에 사용하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 분화시키기 위하여 96- 또는 6-well plate에 1×10⁵ cells/well로 분주한 후 100% confluent 상태가 되면 분화유도 물질 [5 µg/mL insulin, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)]과 10% fetal bovine serum (FBS; GE Healthcare Life Sciences)가 함유된 DMEM 배지로 교환하여 분화유도를 시작하였다. 2일 후 5 µg/mL insulin과 10% FBS가 함유된 DMEM배지로 교환하였다. 이로부터 2일에 한번씩 DMEM (10% FBS) 배지로 보충하면서 4일 후 실험에 이용하였다.

세포독성

3T3-L1 지방전구세포를 96-well plate에 1×10³ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양시킨 후 LMTN 추출물을 첨가하였다. 24시간 배양시킨 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-12-bromide (MTT, 2 mg/mL; Sigma-Aldrich) 용액을 각각의 well에 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT 용액을 제거하고 DMSO (Sigma-Aldrich)을 넣고 15분 후에 540 nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 control 값에 대한 비율로 계산하였다.

Oil Red O 염색 및 정량

6-well plate에 분주된 3T3-L1 지방전구세포를 시료와 함께 8일간 분화유도를 끝낸 후 PBS로 세척하였다. 10% formalin 용액으로 30분간 고정하고 증류수로 1회 세척하였다. 0.3% Oil Red O (Sigma-Aldrich)용액으로 1시간 처리한 후, 60% isopropanol로 1회 세척하고 광학현미경으로 지방생성 정도를 관찰하였다. 관찰을 마친 세포의 축적된 지방을 정량화하기 위하여 100% isopropanol을 가하여 지방을 염색시킨 Oil Red O 염색시약을 추출한 후에 ELISA reader (Immuno Mini NJ-2300, Biotec, Tokyo, Japan)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Troglitazone과 pinitol (Sigma-Aldrich)은 양성대조물질로 사용하였다.

Glucose uptake

3T3-L1 지방전구세포를 분화시킨 6일째에 100 µg/mL LMTN 추출물과 양성대조물질인 2 µM troglitazone, 0.5 mM pinitol 성분을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 7일째에 배지를 제거한 후, 40 µM 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl), amino)-2-deoxyglucose (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 용액을 첨가하고 30분 동안 반응시켰다. 그런 다음, PBS로 세척을 하고 Victor III (perkinelmer, Waltham, MA, USA)에서 여기파장 465 nm, 방출파장 540 nm 범위에서 형광값을 측정하였다.

Western blot 분석

분화된 3T3-L1 지방세포를 PBS 용액으로 2회 세척한 후, lysis buffer (인트론바이오, 경기도, 한국)를 넣고 4°C에서 10분간 용해시키고 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액만 회수하여 단백질 양을 정량 하였다. Lysate 30 µg/µL를 취하여 SDS loading buffer (1 M Tris, 50% glycerol, 10% SDS, 1% bromophenol blue)에 혼합하여 95°C에서 10분간 가열시킨 후, 10% SDS polyacrylamide gel에 100-150 V로 전기영동하고 nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences)에 전

이시켰다. 5% 무지분유가 첨가된 TBST (1 M Tris, 5 M NaCl, tween 20) 용액으로 1시간 동안 blocking 시킨다. TBST 용액으로 3회 세척하고 일차항체(PPAR γ 1:250, GLUT4 1:250; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, p-IRS-1 1:1000, IRS-1 1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)로 2시간 동안 반응시키고 다시 TBST 용액으로 3회 세척하였다. 그 다음에 peroxidase가 포함된 이차항체(goat anti mouse 1:2000, anti-rabbit 1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)로 1시간 동안 반응시키고 chemiluminescent substrate 용액(인트론바이오, 경기, 한국)을 사용하여 목적 단백질을 확인하였다.

실험동물 설계 및 사육

본 실험에 사용된 5주령 수컷 C57BLKS/J *Iar-db/db* 마우스는 (주)중앙실험동물(서울, 한국)로부터 구입하여 목포대학교 동물실험 가이드라인을 준수하며 실험을 진행하였다. 일주일간 일반 실험동물용 사료로 적응시킨 후, AIN-93G diet를 기본으로 하여 당뇨대조군, LMTN 투여군(250 mg/kg 체중)으로 총 2개 그룹으로 나누었다. 실험동물은 실내온도 20-25 °C, 습도 40-50%, 12 h light/darkness cycle에서 사육하였다. LMTN 추출물은 6주 동안 매일 오전 10-12시 사이에 경구투여 하였다. 실험동물은 희생되기 전 12시간 동안 절식시킨 후, 에틸에테르로 질식시켜 해파린(중의제약, 서울, 한국)을 넣은 주사기로 심장으로 부터 혈액을 채취하였다. 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈장을 수집한 다음에 70 °C에서 보관한 후 분석에 사용하였다.

식이와 물 섭취량, 공복혈당, 혈장 중성지방과 총콜레스테롤 함량 측정

식이와 물 섭취량은 전날 공급분에서 남은 양을 빼는 방법으로 매주 3회씩 측정하였다. 실험동물의 혈당 변화 정도를 알아보기 위하여 매주 12시간 절식 시킨 후, 꼬리 정맥에서 채혈 후 blood glucose test meter (Allmedicus, 경기, 한국)를 사용하여 측정하였다. 채취한 혈액에서 분리한 혈장의 중성지방과 총 콜레스테롤 함량은 아산제약(서울, 한국)의 키트를 사용하여 측정하였다.

RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

근육과 지방조직 50-100 mg, 1 mL의 TRI REAGENT (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) 용액을 유리시험관에 함께 넣고 homogenation을 하였다. 그 다음 chloroform을 넣고 가볍게 섞어준 후, 12,000 g (4 °C)에서 15분 동안 원심분리하였다. 상층액에 0.5 mL isopropanol을 넣어 vortex를 하고 상온에서 5-10분 정도 보관 후, 12,000 g (4 °C)에서 8분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 75% ethanol (DEPC + ethanol anhydrous)을 1 mL 넣고 vortex한 후, 12,000 g (4 °C)에서 5분을 2번 반복으로 washing을 하였다. Washing이 끝나면 75% ethanol을 제거하고 3-5분 동안 air dry를 하고 DEPC (diethylpyrocarbonate) 30-50 μ L를 넣고 실험에 사용할 때까지 -20 °C에 보관하였다. 보관중인 RNA는 nanodrop spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)의 260과 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량화하였다. 총 RNA 300 ng을

Diastar™ 2X One Step RT-PCR Premix kit (솔젠트, 대전, 한국)를 사용 RAN 3 μ L, primer 각각 1 μ L (총 30 μ L)를 맞추고 기계에 넣고 역전사를 시켰다. 각 primer의 염기 배열은 다음과 같다. PPAR γ 의 주형사 서열은 5'-ACC ACT CGC ATT CCT TTG AC-3', 비주형사 서열은 5'-TCA GCG GGA AGG ACT TTA TG-3'; GLUT4의 주형사 서열은 5'-CCT GCC CGA AAG AGT CTA AAG C-3', 비주형사 서열은 5'-ACT AAG AGC ACC GAG ACC AAC G-3'; β -actin의 주형사 서열은 5'-TGC CCA TCT ATG AGG GTT ACG-3', 비주형사 서열은 5'-TAG AAG CAT TTG CGG TGC ACG-3'; 이다. PCR 조건은 50 °C에서 30분, 95 °C에서 15분 반응을 시키고 95 °C에서 1분 동안 변성시킨 후, 55 °C에서 1분 동안 붙이고 72 °C에서 2분 동안 확장하여 30회를 수행하였다. PCR 산물은 ethidium bromide로 염색된 1.5% agarose gel을 이용하여 전기 영동을 하였고, β -actin은 증폭된 유전자들의 대조군으로 사용하였다.

통계 분석

모든 실험결과는 평균 $\pm$ 표준오차(standard error, SE)로 표현하였다. 각 군간의 차이는 SPSS의 ANOVA (analysis of variance)와 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 있는 것으로 판정하였다.

결 과

3T3-L1 지방세포에서 삼색짜리 추출물의 지방생성과 당 흡수 증강효과

LMTN 추출물이 3T3-L1 지방세포의 세포성장에 미치는 독성은 125 μ g/mL 농도까지는 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하였으나 250 μ g/mL 농도에는 세포독성이 관찰되었다(Fig. 1A). LMTN 추출물(100 μ g/mL)의 당 흡수 증강효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 당 섭취능이 유의적으로 증가하였으나 양성 대조물질 troglitazone과 pinitol 성분의 당 섭취 효과보다는 낮은 수준으로 나타났다(Fig. 1B). LMTN 추출물(100 μ g/mL)의 지방축적 정도는 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고, 양성 대조물질인 troglitazone과 pinitol 성분보다도 상승하는 경향을 보이는 것으로 관찰되었다(Fig. 1C, D).

3T3-L1 지방세포에서 삼색짜리 추출물의 인슐린 유사효과

LMTN 추출물의 인슐린 유사효과를 확인하기 위하여 3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 분화유도 하면서 인슐린의 처리 또는 비처리 조건에서 LMTN 추출물을 첨가하였다. 지방세포로 분화유도시 대조군에 인슐린 처리 조건은 인슐린 비처리 조건에 비해 지방생성 정도가 현저하게 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 2A, B). 또한, 인슐린 첨가 또는 비첨가 조건 모두에서 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 LMTN 추출물의 지방생성 정도가 통계학적으로 유의하게 상승하는 것으로 관찰되었다(Fig. 2A, B). 그러므로 3T3-L1 지방세포에서 LMTN 추출물은 인슐린처럼 유사한 작용기전의 효과를 가진 천연소재임이 뚜렷하게 증명되었다.

Fig. 1 Effect of LMTN extract on cell viability (A), glucose uptake (B), Oil-red-O staining (C), and lipid accumulation (D) in 3T3-L1 adipocytes. Bars with the same letters are not significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). The concentration of LMTN extract is 100 μg/mL. The concentration of troglitazone and pinitol such as positive control is 2 μM and 0.5 mM. LMTN; methanol extract of *L. maximowiczii* var. *tricolor* Nakai

Fig. 2 Effects of LMTN extract on Oil-red-O staining (A) and lipid accumulation (B) with or without insulin in 3T3-L1 adipocytes. Bars with the same letters are not significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). The concentration of LMTN extract is 100 μg/mL. LMTN; methanol extract of *L. maximowiczii* var. *tricolor* Nakai. LMTN (+IN) vs. control (+IN) group and LMTN (-IN) vs. control (-IN) group

3T3-L1 지방세포에서 삼색싸리 추출물의 PPAR γ 작용 및 인슐린 저항성 개선효과

LMTN 추출물의 인슐린 유사작용에 의한 인슐린 민감성 개선 효과를 측정 한 결과이다. LMTN 추출물은 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 PPAR γ , IRS-1, GLUT4 단백 발현을 유의하게 증가시켰다(Fig. 3A, B). 그러나 양성 대조물질 pinitol 성분은 IRS-1과 GLUT4 단백 발현만을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 3A, B). Pinitol 성분은 콩류에 함유된 천연 혈당조절 성분으로 인슐린 저항성을 개선시키는 물질로 잘 알

려져 있기에 troglitazone 같은 PPAR γ 작용제 역할이 아닌 인슐린 신호전달계의 활성화에 기인하여 혈당조절을 하는 것으로 보여진다. 그러므로 3T3-L1 지방세포에서 LMTN 추출물의 당 흡수 증강효과는 PPAR γ 작용제 또는 인슐린 신호전달 경로의 활성화와 밀접하게 관련되어 있는 것으로 보여진다.

제2형 당뇨병모델 *db/db* 마우스에서 삼색싸리 추출물의 식이와 물 섭취량 및 공복혈당 변화

제2형 당뇨병모델인 *db/db* 마우스에 LMTN 추출물을 6주간 경구

Fig. 3 Effect of LMTN extract on protein expression of PPAR γ , GLUT4, and p-IRS-1 (A and B) in 3T3-L1 adipocytes. The values are expressed as mean $\pm$ SE of six independent experiments. Bars with the same letters are not significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). The concentration of LMTN extract or pinitol is 100 μ g/mL and 0.5 mM. LMTN; methanol extract of *L. maximowiczii* var. *tricolor* Nakai

Fig. 4 Effect of LMTN extract on body weight (A), blood glucose, and water (C) and food intake (D) in *db/db* mice after six weeks. Bars with the same letters are not significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). Control; diabetic mice supplemented with AIN-93G diet, LMTN; treatment of LMTN 80% MeOH extract at dose of 250 mg/kg BW with AIN-93G diet. LMTN; methanol extract of *L. maximowiczii* var. *tricolor* Nakai. Data are means $\pm$ SE ($n = 5$)

투여 한 결과, 체중의 변화는 당뇨대조군과 비교하여 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 4A). 실험기간 동안의 공복혈당의 변화는 당뇨대조군은 초기 공복혈당은 7.8 ± 22.7 mmol/L에서 혈당이 지속적으로 증가하여 실험 종료시점에서는 34.8 ± 25.9 mmol/L로 심각한 고혈당 상태가 지속되는데 반해, LMTN 추출물 투

여군의 경우 1주째부터 공복혈당이 감소하여 실험 종료시점에서는 27.0 ± 13.7 mmol/L로 뚜렷하게 감소하였다(Fig. 4B). 물과 식이 섭취량은 2주째부터 LMTN 추출물 투여군이 당뇨대조군에 비해 뚜렷하게 감소하였다(Fig. 4C, D).

Fig. 5 Effect of LMTN extract on plasma triglyceride (A) and total cholesterol (B) levels in *db/db* mice. Bars with the same letters are not significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). Control; diabetic mice supplemented with AIN-93G diet, LMTN; treatment of LMTN 80% MeOH extract at dose of 250 mg/kg BW with AIN-93G diet. LMTN; methanol extract of *L. maximowiczii* var. *tricolor* Nakai. Data are means $\pm$ SE ($n = 5$)

제2형 당뇨병 모델 *db/db* 마우스에서 삼색싸리 추출물의 혈장 중성지방과 총콜레스테롤 함량 변화

혈장 중성지방의 농도는 당뇨대조군 179.5 ± 4.82 mg/dL, LMTN 추출물 투여군은 108.67 ± 5.23 mg/dL로 당뇨대조군에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 5A). 혈장 총 콜레스테롤 농도에서도 당뇨대조군은 222 ± 12.48 mg/dL, LMTN 추출물 투여군은 141.67 ± 3.98 mg/dL로 나타나 LMTN 추출물 투여군은 당뇨대조군에 비하여 총 콜레스테롤 함량도 유의적으로 감소하였다(Fig. 5B).

제2형 당뇨병 모델 *db/db* 마우스의 지방과 근육조직에서의 삼색싸리 추출물의 PPAR γ 와 GLUT4 mRNA 발현 효과

2형 당뇨병 모델인 *db/db* 마우스의 지방과 근육조직에서 당 대사와 관련된 PPAR γ 와 GLUT4 mRNA 발현 정도를 측정한 결과, LMTN 추출물 투여군의 PPAR γ 와 GLUT4 유전자 발현이 당뇨대조군에 비해 유의적으로 증가하였다(Fig. 6A, B). 인슐린 저항성의 특징적인 소견을 가진 *db/db* 마우스에서의 LMTN 추출물의 포도당 항상성 조절효과는 근육과 지방조직의 PPAR γ 활성화 및 당 흡수 GLUT4 mRNA 발현의 조절과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 확인되었다.

고찰

본 연구는 3T3-L1 지방세포와 2형 당뇨병 동물모델인 *db/db* 마우스에서 LMTN 메탄올 추출물이 인슐린신호전달과 관련된 인슐린수용체기질 IRS-1과 당 수송체 GLUT4 및 인슐린 민감도를 호전시키는 PPAR γ 단백질 활성을 측정하여 LMTN 메탄올 추출물의 인슐린 저항성과 혈당조절 개선효과를 평가하고자 하였다.

3T3-L1 지방전구세포는 인슐린처럼 유사한 작용기전을 가진 약물들의 지방세포로 분화 촉진, 인슐린 민감도 개선, 인슐린 신호전달계 활성화, 당 섭취 증가효과를 평가하는데 널리 이용되는 세포실험계로 알려져 있다[33,34]. 3T3-L1 지방세포에서 LMTN 메탄올 추출물은 대조군에 비해 지방전구세포에서 지방세포로 분화를 촉진하거나 인슐린이 첨가되지 않은 조건에서도

지방축적 정도를 증가시키고 세포내로 당 흡수도 효과적으로 향상시키는 것으로 확인되었다. 이러한 LMTN 메탄올 추출물의 당대사 조절기능은 인슐린 민감도와 관련된 PPAR γ 와 인슐린 신호전달 경로의 IRS-1 인산화를 활성화시키고, 포도당 수송체인 GLUT4 단백질 발현을 증가시키는 결과와 밀접하게 관련되어 있다고 밝혀졌다. 고 등은 엄나무 추출물과 분화유도 물질을 함께 첨가하였을 때 지방세포의 분화가 촉진되는 결과는 엄나무 추출물이 인슐린성 유사물질로 작용한 결과인 것으로 보고하였다[35]. 또한, 꿀벌이 생산하는 물질인 artemisin C 성분은 3T3-L1 지방세포에서 PPAR γ , IRS-1의 반응을 통해 AKT와 GLUT4 단백질 발현을 활성화시켜 세포내의 당 섭취능을 증가시킨다고 보고된 바 있다[36]. 지방세포에 산딸기 추출물을 처리했을 때, IRS-1, Akt 인산화 활성화는 세포질에 존재하는 GLUT4 단백질을 세포막으로 이동시켜 당 섭취능을 개선시키는 것으로 보고되었다[37]. 그러므로 LMTN 메탄올 추출물의 PPAR γ , IRS-1, GLUT4 단백질의 활성화 작용기전은 인슐린 민감성 개선 및 인슐린 신호전달계의 활성을 통해 당 대사를 조절하는 것으로 밝혀졌다.

db/db 마우스는 렵틴(leptin) 수용체의 돌연변이로 인해 다식, 비만, 인슐린 저항성, 고혈당, 고인슐린증의 증상의 특징을 지닌 제2형 당뇨병 동물모델이다[38]. LMTN 메탄올 추출물은 *db/db* 마우스에서 물과 식이 섭취량, 체중, 공복혈당, 혈장 중성지방과 총콜레스테롤 함량이 당뇨대조군에 비해 현저하게 낮게 나타났다, 지방과 근육조직에서는 PPAR γ 와 GLUT4 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였다. Kwan 등은 *db/db* 마우스에 갈조류 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 투여한 결과, 물과 식이 섭취량, 체중 및 공복혈당이 당뇨대조군에 비해 감소한 것으로 보고한 바 있다[39]. 한약재(인삼, 쑥, 마, 지황, 오수유, 지실, 백두궁) 혼합추출물을 *db/db* 마우스에 투여한 결과에서도 당뇨대조군에 비해 혈중 인슐린의 농도는 높지만 혈당은 유의하게 감소하였고, 유티구 macelignan 성분이 공복혈당을 비롯한 혈장 중성지방과 총콜레스테롤 함량을 감소시켰다[40,41]. 현재 제2형 당뇨병 환자에 나타나는 이상지질혈증에서 고중성지방혈증이 가장 높은 빈도로 나타나는 것으로 보고되고 있다[42]. 이처럼 제2형 당뇨병의 고혈당과 이상지질혈증과 같은 주된 증상에 대하여

Fig. 6 Effect of LMTN extract on PPAR γ and GLUT4 mRNA expression in adipose (A) and muscle tissue (B) of *db/db* mice. Each value is the mean $\pm$ SE of three independent experiments. Bars with the same letters are not significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). Control; diabetic mice supplemented with AIN-93G diet, LMTN; treatment of LMTN 80% MeOH extract at dose of 250 mg/kg BW with AIN-93G diet. LMTN; methanol extract of *L. maximowiczii* var. *tricolor* Nakai. Data are means $\pm$ SE ($n = 5$)

LMTN 메탄올 추출물은 제2형 당뇨 모델인 *db/db* 마우스의 지질대사 개선 및 PPAR γ 와 GLUT4 유전자 발현을 조절하여 혈중 포도당 농도를 감소시키는 것으로 밝혀졌다.

결론적으로 LMTN 메탄올 추출물의 혈당조절 개선효과는 인슐린 유사효과로 인한 인슐린 신호전달계와 당 수송체 GLUT4 단백질의 활성화 및 PPAR γ 작용제 역할 그리고 지질대사의 조절 효과에 기인된 것으로 밝혀졌다. 그러므로 고문헌과 민간요법에서 당뇨 치료에 활용되었던 삼색싸리(의향)의 전통지식에 대한 과학적 근거는 명확하게 규명되었다. 향후 삼색싸리 유효성분의 단리와 구조규명, 약리작용기전, 안전성과 연관된 추가적인 연구가 진행된다면 혈당조절기능과 관련된 건강기능식품과 의약품 개발의 천연소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

초 록

이 연구의 목적은 당 대사에 대한 삼색싸리(*Lespedeza maximowiczii* var. *tricolor* Nakai; LMTN)의 효과를 조사하는 것이다. LMTN 추출물은 대조군과 비교하여 3T3-L1 지방 세포에서 당 섭취능 및 지질축적을 유의하게 향상시켰다. 또한, 3T3-L1 지방 세포에서 LMTN 추출물은 피옥시좀 증식제 활성화 수용체(PPAR γ), 인슐린수용체기질-1 (IRS-1) 및 포도당수송체(GLUT4)의 단백질 발현을 유의하게 증가시켰다. LMTN 추출물의 당 섭취능 또는 인슐린 신호 전달계의 조절 효과는 양성 대조물질인 트로글리타존 또는 피니톨보다 낮았지만 PPAR γ 단백질 활성화는 증가하였다. 또한, LMTN 추출물은 인슐린 유사효과를 나타냈다. *db/db* 마우스에서, LMTN 추출물(250 mg/kg BW)은 물과 식이 섭

취량, 혈당, 중성지방과 총 콜레스테롤 함량을 유의적으로 감소시켰다. 더불어 지방과 근육조직에서의 PPAR γ 및 GLUT4 mRNA의 발현도 LMTN 추출물 투여군에서 유의적으로 증가되었다. 따라서, 본 연구의 결과는 LMTN 추출물이 3T3-L1 지방 세포 및 *db/db* 마우스에서 PPAR γ 및 인슐린 유사효과를 통해 당 대사를 조절하는 것으로 밝혀졌다.

Keywords 3T3-L1 지방세포 · 삼색싸리 · 인슐린 신호전달 · 피옥시좀 증식제-활성화 수용체 · C57BLKS/J *Iar-db/db* 마우스

감사의 글 This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF), funded by the Ministry of Education, Science, and Technology (NRF-2009-0077541).

References

- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Nelson DE, Engelgau MM, Vinicor F, Marks JS (2000) Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. *Diabetes Care* 23: 1278-1283
- Santoso T (2006) Prevention of cardiovascular disease in diabetes mellitus: by stressing the CARDS study. *Acta Med Indones* 38: 97-102
- Roy Taylor (2012) Insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* 61: 778-779
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006) Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85-96
- Fröjdö S, Vidal H, Pirola L (2009) Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim Biophys Acta* 1792: 83-92
- Shin MJ, Park MJ, Youn MS, Lee YS, Nam MS, Park IS, Jeong YH (2006) Effects of silk protein hydrolysates on blood glucose in C57BL/

- KsJ *db/db* mice. J Korean Soc Food Sci Nutr 35: 1166–1171
7. Choi H J, Kim SW (2006) Therapeutic roles of PPAR- γ agonists. J Korean Acad Fam Med 27: 599–606
 8. Lee SH, Lee JK, Kim IH (2012) Trends and perspectives in the development of antidiabetic drugs for type 2 diabetes mellitus. Korean J Microbiol Biotechnol 40: 180–185
 9. Kwon HS (2012) Mechanism and efficacy of new anti-diabetic medications. J Korean Diabetes 13: 167–171
 10. Nissen SE, Wolski K (2007) Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. N Engl J Med 356: 2457–2471
 11. Nasri H, Raffieian-Kopaei M (2014) Metformin: Current knowledge. J Res Med Sci 19: 658–664
 12. Atta-Ur-Rahman, Zaman K (1989) Medicinal plants with hypoglycemic activity. J Ethnopharmacol 26: 1–55
 13. Perseghin G, Lattuada G, Danna M, Sereni LP, Maffi P, De Cobelli F, Battezzati A, Secchi A, Del Maschio A, Luzi L (2003) Insulin resistance, intramyocellular lipid content, and plasma adiponectin in patients with type 1 diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab 285: E1174–E1181
 14. Yao ZY, Kan FL, Wang ET, Wei GH, Chen WX (2002) Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 52: 2219–2230
 15. Yoo BK (2015) Effect of *Lespedeza bicolor* water extract for the management of type 2 diabetes Mellitus. Korean J Community Pharm 1: 39–43
 16. Nemoto T, Ohashi H (1993) Seedling morphology of *Lespedeza* (Leguminosae). J Plant Res 106: 121–128
 17. Kim CK (1993) Compositions of fatty acid, free amino acid and total amino acid of *Lespedeza maximowiczii* T. LEE. J Korean Soc Food Sci Nutr 22: 586–591
 18. Heo DY, Kim YM, Lee J, Park SH, Kim J, Park HM, Lee CH (2014) Desmodianone H and uncinanone B, potential tyrosinase inhibitors obtained from *Lespedeza maximowiczii* by using bioactivity-guided isolation. Biosci Biotechnol Biochem 78: 943–945
 19. Kim Nk, Park HM, Lee J, Ku KM, Lee CH (2015) Seasonal Variations of Metabolome and Tyrosinase Inhibitory Activity of *Lespedeza maximowiczii* during Growth Periods. J Agric Food Chem 63: 8631–8639
 20. Lee YS, Joo EY, Kim NW (2005) Analysis on the components in stem of the *Lespedeza bicolor*. J Korean Soc Food Sci Nutr 34: 1246–1250
 21. Tan L, Zhang XF, Yan BZ, Shi HM, Du LB, Zhang YZ, Wang LF, Tang YL, Liu Y (2007) A novel flavonoid from *Lespedeza virgata* (Thunb.) DC.: structural elucidation and antioxidative activity. Bioorg Med Chem Lett 17: 6311–6315
 22. Mori-Hongo M, Yamaguchi H, Warashina T, Miyase T (2009) Melanin synthesis inhibitors from *Lespedeza cyrtobotrya*. J Nat Prod 72: 63–71
 23. Kim SM, Jung YJ, Pan CH, Um BH (2010) Antioxidant activity of methanol extracts from the genus *Lespedeza*. J Korean Soc Food Sci Nutr 39: 769–775
 24. Lee YS, Joo EY, Kim NW (2006) Polyphenol contents and physiological activity of the *Lespedeza bicolor* extracts. Korean J Food Preserv 13: 616–622
 25. Lee YS, Joo EY, Kim NW (2005) Antioxidant activity of extracts from the *Lespedeza bicolor*. Korean J Food Preserv 12: 75–79
 26. Lee A, Kim BN, Zhoh CK, Shin GH (2006) Studies on the antioxidative and antimicrobial effects of *Lespedeza bicolor* extracts. J Korean Soc of Esthe Cosmec 1: 109–120
 27. Ryu IS, Lee SJ, Lee SW, Mun YJ, Woo WH, Kim YM, Lee JC, Lim KS (2007) Dermal bioactive properties of the ethanol extract from flowers of *Lespedeza bicolor*. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol 20: 1–9
 28. Baek SH, Kim JH, Kim DH, Lee CY, Kim JY, Chung DK, Lee CH (2008) Inhibitory effect of dalbergioidin isolated from the trunk of *Lespedeza cyrtobotrya* on melanin biosynthesis. J Microbiol Biotechnol 18: 874–879
 29. Maya MH, Hiroyuki T, Takayuki K, Makoto K, Yu I, Toshio M (2009) Melanin synthesis inhibitors from *Lespedeza floribunda*. J Nat Prod 72: 194–203
 30. Kwon DJ, Bae YS (2009) Flavonoids from the aerial parts of *Lespedeza cuneata*. Biochem Syst Ecol 37: 46–48
 31. Kim MS, Sharma BR, Rhyu DY (2016). Beneficial effect of *Lespedeza cuneata* (G. Don) water extract on streptozotocin-induced type 1 diabetes and cytokine-induced beta-cell damage. Nat Prod Sci 22: 175–179
 32. Sharma BR, Rhyu DY (2015). *Lespedeza davurica* (Lax.) Schindl. extract protects against cytokine-induced β -cell damage and streptozotocin-induced diabetes. Biomed Res Int 2015: 169256
 33. Rubin CS, Hirsch A, Fung C, Rosen OM (1978) Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. J Biol Chem 253: 7570–7578
 34. Inoue G, Cheatham B, Emkey R, Kahn CR (1998) Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. Differential compartmentalization and trafficking of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. J Biol Chem 273: 11548–11555
 35. Ko BS, Kim HK, Park SM (2002) Natural products, organic chemistry: Insulin sensitizing and insulin-like effects of water extracts from *Kalopanax pictus* NAKAI in 3T3-L1 adipocyte. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 45: 42–46
 36. Choi SS, Cha BY, Iida K, Lee YS, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo JT (2011) Artepillin C, as a PPAR α ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. Biochem Pharmacol 81: 925–933
 37. Kim DY, Park KK, Lee SK, Lee SE, Hwang JK (2011). *Cornus kousa* F.Buenger ex Miquel increases glucose uptake through activation of peroxisome proliferator-activated receptor and insulin sensitization. J Ethnopharmacol 133: 803–809
 38. Guest PC, Rahmoune H (2019) Characterization of the *db/db* Mouse Model of Type 2 Diabetes. Methods Mol Biol 1916: 195–201
 39. Min KH, Kim HJ, Jeon YJ, Han JS (2011) *Ishige okamurae* ameliorates hyperglycemia and insulin resistance in C57BL/KsJ-*db/db* mice. Diabetes Res Clin Pract 93: 70–76
 40. Yeo JY, Kang YM, Cho SI, Jung MH (2011) Effects of a multi-herbal extract on type 2 diabetes. Chin Med 6: 10
 41. Han KL, Choi JS, Lee JY, Song J, Joe MK, Jung MH, Hwang JK (2008) Therapeutic potential of peroxisome proliferators-activated receptor- α /gamma dual agonist with alleviation of endoplasmic reticulum stress for the treatment of diabetes. Diabetes 57: 737–745
 42. Mooradian AD (2009) Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 5: 150–159