



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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

근육세포에서 진굴과피 성분의
대사조절 기능

제주대학교 대학원

의학과

홍 나 영

2011년 2월

근육세포에서 진글과피 성분의 대사조절 기능

지도교수 : 박덕배

홍 나 영

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2011년 2월

홍나영의 의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장

조문제

위 원

유은숙

위 원

박덕배

제주대학교 대학원

2011년 2월

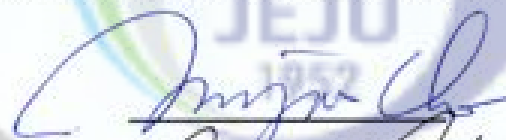
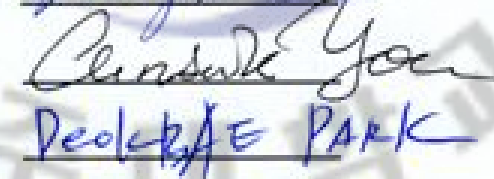
**Metabolic functions of active compounds of
Citrus sunki peel in L6 skeletal muscle cells**

Na-Young Hong
(supervised by professor Deok-Bae Park)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of master in medicine

2011. 2

This thesis has been examined and approved



Deok-Bae Park

Department of Medicine
Graduate School
Jeju National university

ABSTRACT

Citrus sunki Hort. ex Tanaka is one of several Jeju-native citrus fruits, and its dried peel has been used as an essential ingredient in traditional medicine. The purpose of the study was to investigate the effect of various compounds rich in the peel of *Citrus sunki* on glucose and fat metabolism in L6 muscle cells. Synephrine, an alkaloid compound, and two polymethoxyflavones, tangeritin and nobiletin, were more rich in the extract of *Citrus sunki* peel than other compounds. Synephrine increased glucose consumption by L6 muscle cells. Synephrine also increased the translocation of glucose transport 4 (GLUT4) to the plasma membrane. Synephrine stimulated the phosphorylation of AMPK, but not of PKB/Akt. Although tangeritin and nobiletin stimulated phosphorylation of AMPK, they failed to increase glucose consumption by muscle cells. Free fatty acid (FFA, palmitate)-induced cytoplasmic fat accumulation was suppressed by synephrine and PMFs. Palmitate-induced suppression of AMPK phosphorylation was also reversed by the addition of synephrine or PMFs. These results suggest that synephrine and PMFs rich in the peel of *Citrus sunki* are potent functional compounds that can ameliorate abnormalities in glucose- and fat metabolism in muscle cells.

목 차

ABSTRACT	I
목 차	II
LIST OF TABLES	III
LIST OF FIGURES	IV
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험재료	
2. 세포배양	
3. 시약	
4. Lactic dehydrogenase (LDH) 활성도 측정	
5. MTT assay	
6. 포도당농도 측정	
7. 전기영동 및 Western blot 분석	
8. Nile red 염색	
9. 통계학적 분석	
III. 결 과	8
1. 진굴과피성분이 세포의 생존능에 미치는 영향	
2. 진굴과피성분이 포도당 수송에 미치는 영향	
3. 진굴과피성분이 인슐린-수용체 신호전달에 미치는 영향	
4. Synephrine으로 증가된 포도당 수송에 미치는 PI3K 및 AMPK 저해제의 영향	
5. Synephrine이 GLUT4의 세포막이동에 미치는 영향.	
6. 진굴과피성분이 지질대사에 미치는 영향	
IV. 고 찰	28
V. 참 고 문 헌	31
VI. 적 요	37

LIST OF TABLES

Table 1. Alkaloids in the extract of *Citrus sunki* peel

Table 2. Flavonoids in the extract of *Citrus sunki* peel



LIST OF FIGURES

- Figure 1. *Citrus sunki* Hort. Ex Tanaka.
- Figure 2. Chemical structure of compounds within *Citrus sunki* peel.
- Figure 3. Effect of synephrine and PMFs on the viability of L6 skeletal muscle cells.
- Figure 4. Effect of synephrine and PMFs on the basal glucose consumption in L6 skeletal muscle cells.
- Figure 5. Cell signaling pathways related to glucose transport.
- Figure 6. Effect of synephrine and PMFs on insulin-induced glucose consumption in L6 skeletal muscle cells.
- Figure 7. Effect of synephrine and PMFs on basal- or insulin-stimulated signaling pathways in L6 skeletal muscle cells.
- Figure 8. Effect of inhibitors of PI3K and AMPK on synephrine induced glucose consumption in L6 skeletal muscle cells.
- Figure 9. Effect of synephrine on GLUT4 translocation in L6 skeletal muscle cells.
- Figure 10. Effect of inhibitors of PI3K and AMPK on synephrine-induced GLUT4 translocation in L6 skeletal muscle cells.
- Figure 11. Role of AMPK and ACC in fat accumulation.
- Figure 12. Effect of synephrine and PMFs on AMPK in L6 skeletal muscle cells.
- Figure 13. Effect of synephrine and PMFs on ACC in L6 skeletal muscle cells.
- Figure 14. Effect of synephrine and PMFs on FFA-induced suppression of phosphorylation of AMPK and ACC in L6 skeletal muscle cells.
- Figure 15. Effect of synephrine and PMFs on FFA-induced intracellular fat accumulation.

I. 서 론

제2형 당뇨병 (Type2 diabetes mellitus ;T2DM)은 연령의 증가에 따라 발병하고 진행되는 만성적 대사성 질환의 대표적인 예이다 (Harris 등, 1995). 지난 20년간 제2형 당뇨병의 유병률은 급격히 증가하였으며, 2020년에는 전 세계적으로 환자수가 2억 5천만명에 이를 것으로 예상되고 있다 (Harris등, 1998; DeFronzo, 1999). 당뇨병은 혈당의 증가 뿐 아니라 탄수화물, 지방, 단백질 대사에도 이상을 초래한다. 이러한 당뇨병에 대한 적절한 치료가 이루어지지 않고 지속되면 당뇨병성 망막증을 비롯한 심근경색증, 말초신경증, 뇌졸중, 만성신부전증 및 고지혈증 등과 같은 심각한 합병증을 일으킨다 (West, 2000; Tai등, 2000).

인체에는 인슐린의 작용에 관여하는 대표적 표적기관으로 간, 근육 및 지방조직이 있으며 정상적으로 탄수화물을 섭취하면 췌장의 베타세포에서 인슐린이 분비되고 혈액을 통하여 표적기관의 인슐린 수용체에 결합함으로써 인슐린 신호전달이 이루어진다. 그 중 골격근은 인슐린저항성을 갖고 있는 제2형 당뇨병 환자에서 말초 인슐린 저항성을 일으키는 주요기관 (Boden등, 1994)이며, 포도당 항상성유지에 중요한 역할을 한다 (Saltiel등, 2001). 골격근에서 포도당 흡수는 인슐린-의존적인 경로와 인슐린-비의존적인 AMP-activated protein kinase (AMPK)를 통한 경로가 있다. 골격근에서의 인슐린-의존적인 포도당 흡수는 인슐린이 세포막에 존재하는 인슐린 수용체에 결합하고 난 이후, 수용체의 티로신 자가인산화 (tyrosine auto phosphorylation)에 따른 insulin receptor substrate (IRS)의 활성화에 이어 (White, 1997; Burks등, 1997) phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase)를 활성화 시키고 이어 Akt/PKB를 활성화시킨다 (Cheatham등, 1995). 그 결과, 포도당 수송체 4 (Glucose transporter 4, GLUT4)가 활성화되어 (Cheatham등, 2002; Okada등, 1994), GLUT4가 세포질에서 세포막으로 이동, 인슐린 자극에 의한 포도당 유입을 촉진하게 된다 (Heesom등, 1997; Pessin등, 1999). 인슐린-비의존적인 포도당 흡수는 인슐린 매개 PI3-Kinase 신호전달과 독립적인 경로이며, AMPK의 활성의 증가로 인해 GLUT4의 발현을 증가시키고 세포막으로의 전이를 통해 포도당의 흡수를 증가하게 한다(EJKurth-Kraczek등, 1999; G.F.Merrill등, 1997). 또한 AMPK는 serine/threonine kinase의 일원으로 세포 내 에너지 상태를 감지하는 에너지 센서로 알려져 있는 효소이다 (Ruderman등, 2004; Winder등, 1999). 세포 내 에너지가 부족한 상황 즉,

ATP에 비해 AMP가 증가할 경우 활성화되며 정상 에너지 균형을 유지하기 위해 ATP를 소비하는 과정을 억제하고 ATP를 생산하는 과정을 활성화 한다. 또한 AMPK는 에너지 대사와 관련된 근육의 지방대사에 관여한다고 알려져 있다 (Hardie등, 1998). 활성화된 AMPK는 acetyl CoA carboxylase (ACC)를 인산화 하므로써 acetyl CoA를 malonyl CoA로 전환시켜 지방산의 산화를 촉진한다 (Carling등, 1987). 현재 당뇨병을 근원적으로 치료할 수 있는 방법은 개발되지 못하고 있고 혈당이 정상적인 수준으로 유지되도록 하는 것 만이 최선의 치료방법으로 알려져 있으며 당뇨병의 치료방법으로는 약물요법, 운동요법, 식이요법의 3가지 방법이 있다 (Koivisto등, 1993). 다양한 기전을 가진 경구 혈당 강하제들이 당뇨병의 치료에 사용되고 있으나, 장기적으로 복용했을 때 여러 가지 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 최근에는 이러한 문제를 해결하기 위한 천연물로부터 인슐린 작용 및 인슐린 민감성을 증진하는 물질들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Gray와 Flatt, 1999; Kreutter등, 1990). Takaku등 (1997)은 마황에서 분리한 norpseudoephedrine의 인슐린 유사 작용을 보고하였으며, Kameda등 (1999)도 로열젤리의 항당뇨 효능이 인슐린성 작용을 가지는 불포화지방산에 의해 기인한다고 보고하였다. 또한, Krenisky등 (1999)은 페루의 전통 약용식물인 *Otholobium pubescens*에서 인슐린 민감성을 높이는 물질인 bakuchiol을 분리하여 보고한 바 있다.

천연식물 중 감귤류는 다기능성 약효 성분을 많이 함유하고 있는 과일로서 오래 전부터 한방에서 생약의 재료로 사용하였고, 동시에 비타민, 식이섬유, 유기산 및 유리당 등의 영양성분 공급원의 건강식품 소재로도 활용되어 왔다. 현재 제주도에서 대표적인 과실로 재배되고 있는 대부분의 감귤류는 20세기 초 일본으로부터 들어온 온주밀감류가 대부분이며, 재래 감귤로는 12종이 자생하고 있는 것으로 확인되었다 (Kim, 1988). 제주도 재래 감귤 중의 하나인 진귤 (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka)은 우리나라에서는 제주도에서만 자생하는 감귤로 제주지역에서는 "산물"로 불리며 또 다른 이름으로 산귤이라고도 한다. 진귤 등의 재래감귤류 그리고 온주밀감류는 모두 분류학상으로 citrus 속이며 최근에 성분조사, 생리활성에 관한 연구들이 활발하게 진행되고 있다 (Kang, 2005). 특히 과피의 기능성에 대한 관심들이 집중되어 있다. 예를 들어 항염작용 과 설사억제효능 (Francis등, 1989; Guengerich등, 1990), 항알러지효과 (Guthrie등, 1998; Chung등, 2000), 대식세포의 활성화증대 (AOAC, 1990; Kim등, 1996)들과 같은 약리활성들이 보고된 바가 있으나 진귤의 과피를 대상으로

한 연구결과는 알려져 있지 않다. 이러한 감귤류에는 flavonoid, carotenoid, coumarin, phenylpropanoid, limonoid, pectin, cellulose, hemicellulose, pectin 등 다양한 생리활성 물질을 함유되어 있으며, 이 중 flavonoid류는 60여종이 알려져 있다 (Lee 등, 1997). 감귤류의 주요 flavonoid들로는 naringenin과 hesperetin, rutin, deosmine, nobiletin, tangeritin 등이 있으며 (Table 2), alkaloid 류에는 synephrine, octopamine, tyramine, norepinephrine 등이 있다 (Table 1).

본 연구에서는 진귤과피에 상대적으로 많이 함유되어 있는 alkaloid 성분인 synephrine과 polymethoxyflavone 성분인 tangeritin, nobiletin이 L6 근육세포의 포도당 대사와 지질대사에서 어떠한 영향을 미치는지에 대해 규명하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 시료 및 추출물

세포배양에 사용된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지와 fetal bovine serum (FBS)은 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A) 및 Cellgro Mediatech Inc. (Manassas, VA, U.S.A)에서 구입하였고, lactate dehydrogenase (LDH) kit는 Takara (Otsu, Shiga Japan)로부터 구입하였으며, MTT kit는 Sigma사로부터 구입하였다. Western blot을 위한 항체 (phospho-Akt, Ser473; phospho-ERK1/2, E-4; phospho-AMPK; phospho-ACC)는 모두 Santa Cruz (Santa Cruz, CA, U.S.A)로부터 구입하였다. Synephrine, tangeritin, nobiletin은 모두 Sigma사로부터 구입하였으며 synephrine은 인산완충액 (phosphate-buffered saline, PBS), tangeritin과 nobiletin은 dimethylsulfoxide (DMSO, AMRESCO, Korea)에 각각 녹여서 사용하였다. 이때 dimethylsulfoxide (DMSO)의 최종 농도는 0.1%를 넘지 않도록 하였다.

2. 세포배양

L6 근육아세포(myoblast)는 한국세포주은행 (서울)로부터 공여받아 사용하였다. L6 세포는 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액을 사용하였고 5% CO₂ 및 37°C가 유지되는 배양기에서 배양하였다. L6 근육아세포는 10% FBS가 포함된 DMEM에 24간 동안 배양한 후 2% horse serum이 포함된 DMEM에서 4일동안 L6 근육세포 (myotube)로 분화시켰으며 배지는 48시간 마다 교체하였다. 그리고나서 D-PBS로 두 번 세척 후에 우태아혈청이 제거된 혈청결핍 (serum-free) 배양액에서 일정기간 동안 전배양 (serum-starvation)하고 난 뒤 시료의 처리실험에 사용하였다.

3. Lactate dehydrogenase (LDH) 활성도 측정

세포에 대한 비특이적 (nonspecific) 상해의 지표가 되는 LDH 활성도를 측정하여

시료가 배양세포에 독성을 나타내는 지를 조사하였다. L6 근육세포 (4×10^5 cells/ml)에 시료를 처리하고 이를 1 ~ 2일간 배양한 다음 세포 배양액과 LDH assay reagent 를 동량으로 섞어 10분 간 상온에서 반응시킨 뒤 ELISA reader (Sunrise, Tecan Austria)를 사용하여 492nm에서의 흡광도를 측정하였으며 이때 기저 흡광도는 배양에 사용되지 않은 배양액으로부터 측정하고 각 실험군의 흡광도로부터 기저 흡광도를 제한 값을 실제 LDH 활성도로 계산하였다.

4. MTT assay

L6 근육세포(4×10^5 cells/ml)에 시료를 처리하고 이를 1 ~ 2일간 배양한 다음 MTT 용액 500 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응 시켰다. 상층액을 완전히 제거하고 isopropanol 500 μ l를 가하여 발색반응을 유도하였으며, 각각의 세포 (2.5×10^5 cells/ml)를 96 well plate에 넣고 살아있는 세포 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색 MTT [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]가 환원되어 형성되는 자주색을 띠는 비수용성의 formazan을 microplate reader (Amersham Pharmacia Biotech, NY, U.S.A)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Gerlier 등, 1986; Liu, 1999). 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 증식 억제 정도를 조사하였다.

5. 포도당농도 측정

L6 근육세포 (4×10^5 cells/ml)를 우태아혈청이 제거된 혈청결핍 배양액에서 4시간동안 전배양 하고 난 뒤 새로운 제거된 혈청결핍 배양액으로 교체시켜 준 후 시료를 처리하고 이를 3~ 5시간 배양한 다음 세포 배양액 5 μ l와 glucose assay reagent (Sigma, U.S.A) 150 μ l를 섞어 10분 간 상온에서 반응시킨 뒤 ELISA reader (Sunrise, Tecan, Austria)를 사용하여 시료의 포도당 농도를 측정하였다.

6. 전기영동 및 Western blot

Western blot 분석을 위해 L6 근육세포를 PBS로 2회 세척 후 protease와

phosphatase 저해제가 첨가된 RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCL (PH7.5), 150 mM NaCl, 1% nonidet P-40, 2 mM EDTA]로 5분간 ice 상태에서 균질화시킨 후 원심분리 (14,000 rpm, 15분)하고 상층액을 획득하였다. 단백질의 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 BCA protein assay kit (Pierce, U.S.A)를 사용하여 정량 하였다. 10~15 ug의 단백질을 전기영동 완충액(reducing buffer와 LDS buffer)를 넣고 70°C에서 10분간 가열하고 4-12%의 bis-tris gel (Invitrogen, U.S.A)에 전기영동하고 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, U.S.A)에 흡착 (200mA, 90분)시켰다. 단백질이 전이된 PVDF membrane을 상온에서 1시간 동안 5% skim milk로 blocking 시킨 후 1차 항체 반응은 anti-Akt/PKB (1:1,000, Santa Cruz, U.S.A), anti-ERK (1:2000, Santa Cruz, U.S.A) anti-phospho AMPK(1:500, Santa Cruz), anti-phospho ACC (1:1,000, Santa Cruz, U.S.A)가 들어있는 TBS-T에서 1시간 (25°C) 또는 16시간 (4°C)동안 반응시키고 TBS-T로 3회 세척 후 HRP-conjugated 2차 항체 anti-rabbit 또는 mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc)를 1:5,000 혹은 1:10,000으로 희석하여 상온에서 30분간 반응시킨 뒤 TBS-T로 3~4회 세척하였다. 단백질은 Enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagent (iNtRON, Korea)로 반응시켜 각 band의 영상을 얻었다.

7. 세포막 포도당수송체 4 (GLUT4) 분석

L6 근육세포를 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, NAF, Na_3VO_4 , aprotinin, leupeptin, PMSF, DTT가 첨가된 subcellular fractionation buffer (500 mM EDTA, 500 mM EGTA, 1 M HEPES, sucrose, KCl, 1 M MgCl_2)에서 20분간 ice상태에서 균질화시킨 후 원심분리 (8,000 rpm, 5분)하고 상층액 만을 취해 초고속원심분리기에서 원심분리(24,000 rpm, 4°C, 60분)하고 상층액은 세포질 내 GLUT4의 함량, 침전물은 세포막의 GLUT4의 함량을 조사하는데 사용하였다. 침전물은 protease와 phosphatase 저해제가 첨가된 RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCL (PH7.5), 150 mM NaCl, 1% nonidet P-40, 2 mM EDTA]로 5분간 ice 상태에서 균질화하였다. 1차 항체는 anti-GLUT4 IgG (1:1,000, Millipore, U.S.A) 2차 항체는 anti-rabbit IgG (1:3,000, Invitrogen, U.S.A)을 사용하였다.

8. Nile Red 염색

L6 근육세포를 6-well (1×10^6 cells/well) 배양접시에 접종하고 하룻밤 배양한 다음 serum-free 배지에 하룻밤 전배양하였다. Free fatty acid (FFA, palmitate)와 진굴과피성분을 24시간 처리하였다. 24시간이 지난 후 세포들을 인산 완충액으로 2회 세척하고, 200 ng/ml Nile Red 용액 (in 2% acetone)으로 15분간 염색한 후 PBS로 세척한 뒤 광학 현미경으로 관찰하였다.

9. 통계학적 분석

실험 군 사이의 통계학적으로 의미있는 차이 여부는 student's t-test를 사용하여 결정하였고 $P < 0.05$ 일때 의미있는 값으로 하였으며 모든 실험결과는 평균값 \pm 표준오차로써 나타내었다.

Ⅲ. 결 과

1. 진굴과피성분이 세포의 생존능에 미치는 영향

Synephrine과 PMFs (tangeritin, nobiletin)를 처리한 후 L6 골격근 세포의 생존능 변화에 미치는 영향을 관찰하였다 (Fig.3). L6 근육세포에 추출물들을 처리하고 24시간 처리 후 synephrine을 처리한 군은 대조군과 비교했을 때 세포의 생존능에 있어서 변화를 보이지 않았으며, 세포괴사의 생화학적 지표인 LDH 분비 또한 대조군과 비교했을 때 변화를 보이지 않았다. 반면에 PMFs을 처리한 군은 synephrine을 처리한 군 보다 세포의 생존능이 감소하였고, LDH 분비 또한 증가하였다.

2. 진굴과피성분이 포도당 수송에 미치는 영향

진굴과피성분이 L6 근육 세포에서 포도당 수송에 미치는 영향을 보기 위해, 세포를 혈청결핍배양액에 4시간동안 전배양하고 난 뒤 synephrine과 PMFs (tangeritin, nobiletin)을 각각 농도별 (12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M)로 30분간 전처리하고 인슐린 (10 nM)을 후처리한 다음 3~6시간 동안 배양하여 배양액 내에 남아있는 포도당의 농도를 측정함으로써 최초 배양액에 포함되어 있던 포도당의 감소분을 측정하였다 (Fig. 4). Synephrine을 처리한 배양액 내에서의 포도당은 대조군에 비하여 농도의존적으로 증가하였으며, 최고 농도 (50 μ M)에서 약 30%정도의 포도당 흡수 증가를 보였다. 이는 인슐린 단독처리에 따른 포도당 흡수 증가보다 높은 수준이었다. 하지만 PMFs을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 포도당 흡수 증가에 있어 대조군과 비슷하거나 감소하는 경향을 보였다. 추출물들과 insulin (100 nM)을 병행 처리하였을 때도 결과는 유사한 경향을 보였다 (Fig. 6).

3. 진굴과피성분이 인슐린-수용체 신호전달에 미치는 영향

Synephrine이 포도당 흡수를 증가시키는 작용이 인슐린-수용체 신호전달체계인 영향을 미침으로써 매개되는 지, 아니면 관계없이 단독적으로 이루어지는 지를 규명하기 위하여 대표적인 인슐린-수용체 신호전달 단백질들인 Akt/PKB 및 ERK 활성화

에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 7). 혈청결핍배양액에 4시간 전배양한 L6 근육세포에 synephrine과 PMFs (tangeritin, nobiletin)을 30분간 전처리한 후 인슐린을 10분간 처리하여 활성화된 Akt/PKB 및 ERK 단백질에 대한 western blot 분석을 시행하였다. synephrine과 PMFs의 단독처리는 Akt/PKB의 활성을 증가시키지는 못하였다. 그리고 인슐린 (10 nM)에 의해 활성화된 Akt/PKB 활성이 synephrine과 PMFs의 처리에 의해 억제되었다 (Fig. 7).

4. Synephrine이 포도당 수송에 미치는 영향

Synephrine이 포도당 흡수를 증가시키는 작용이 인슐린-수용체 신호전달체계에 영향을 미침으로써 매개되는 것이 아니라면, synephrine의 세포내로의 포도당 수송의 증가가 인슐린 비의존적인 AMPK경로를 통한 것인지를 규명하기 위해 혈청결핍배양액에 4시간 전배양한 L6 근육세포에 PI3-Kinase inhibitor인 wortmannin (100 nM)과 AMPK inhibitor인 compound-C (10 μ M)를 30분간 전처리한 후 synephrine (50 μ M)을 30분간 처리하고 이후 3시간 동안 배양하여 최초 배양액에 포함되어 있던 포도당의 감소분을 측정하였다 (Fig. 8). Wortmannin과 compound-C를 단독으로 처리한 군에서는 대조군 보다 낮은 포도당 흡수를 보였으며, synephrine (50 μ M)을 단독으로 처리한 배양액 내에서의 포도당은 대조군에 비하여 50%정도의 포도당 흡수 증가를 보였다. 또한, synephrine과 wortmannin을 병행 처리한 군에서는 synephrine을 단독으로 처리한 군과 비슷한 경향을 보였으나, synephrine과 AMPK의 inhibitor인 compound-C를 병행 처리하였을 때, synephrine에 의한 포도당 흡수의 증가가 감소되었다 (Fig. 8).

5. Synephrine이 GLUT4의 세포막으로의 이동에 미치는 영향

L6 근육세포에서 synephrine이 GLUT4의 세포막으로의 이동에 미치는 영향을 보기 위해 혈청결핍배양액에 15시간 전 배양한 L6 근육세포에 synephrine (50 μ M)을 30분간 전 처리한 후 인슐린을 10분간 처리하여 본 결과 대조군에 비해 synephrine (50 μ M)을 처리하였을 GLUT4의 세포막으로의 이동이 증가되었다 (Fig. 9). Insulin (10 nM)을 처리한 군에서도 GLUT4의 세포막 이동이 증가하였다. synephrine의

GLUT4의 세포막 이동 유도가 어떠한 경로를 통해 이루어지는지를 보기 위해 PI3K inhibitor인 wortmannin과 AMPK inhibitor인 compound-C를 synephrine과 병행 처리하였다. 그 결과 GLUT4의 세포막으로의 전이가 synephrine에 의해 증가함을 볼 수 있었다. 그러나 synephrine에 의한 GLUT4의 세포막의 증가는 PI3K inhibitor인 wortmannin 처리에 의해 억제되지 않았으나, AMPK inhibitor인 compound-C를 처리한 군에서는 synephrine에 의해 증가되었던 GLUT4의 세포막으로의 전이가 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 10).

6. 진균과피성분이 지질대사에 미치는 영향

진균과피성분이 지질대사 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저, 지질대사 활성화의 중요한 초기 활성화인자인 AMPK, ACC의 활성화에 미치는 synephrine, tangeritin, nobiletin의 영향을 조사하였다. L6 근육세포를 16시간동안 혈청결핍 배지에서 전배양한 후 synephrine, tangeritin, nobiletin를 4시간동안 처리한 후 AMPK의 인산화를 측정하였다. synephrine, tangeritin, nobiletin 모두 AMPK, ACC의 인산화를 유도하였다 (Fig. 12, Fig. 13). 이어 지질대사 활성화의 중요한 두 활성화인자의 AMPK와 ACC의 활성을 동시에 측정하기 위해 L6 근육세포에 free fatty acid (FFA, palmitate)를 24시간 동안 처리하여 세포내 지질 축적을 유도하였으며 여기에 synephrine, tangeritin, nobiletin을 병행 처리하였다. 그 결과, free fatty acid에 의해 감소되었던 AMPK와 ACC의 인산화가 이들 처리에 의해 회복되었다 (Fig. 14). 또한 Nile red 염색으로 세포내 지질을 염색했을 때 free fatty acid 처리로 증가된 세포내 지질의 양이 진균과피성분에 의해 억제되는 것을 확인 하였다 (Fig. 15).



Figure 1. *Citrus sunki* Hort. Ex Tanaka

Table 1. Alkaloids in the extract of *C. sunki* peel

Extraction		Syneprhine	Octopamine	Tyramine	Norepinephrine
Immature Unchiu	80% EtOH	25.34±0.35	ND	ND	ND
	Hot water	15.26±0.17	ND	ND	ND
Mature Unshiu	80% EtOH	6.62±0.12	ND	ND	ND
	Hot water	4.53±0.04	ND	ND	ND
Immature sunki	80% EtOH	27.92±0.27	ND	ND	ND
	Hot water	15.28±0.35	ND	ND	ND
Mature sunki	80% EtOH	10.34±0.04	ND	ND	ND
	Hot water	6.75±0.83	ND	ND	ND
Immature sunki (fermented)	80% EtOH	29.79±0.12	ND	ND	ND
	Hot water	15.53±1.64	ND	ND	ND
Mature sunki (fermented)	80% EtOH	11.73±0.05	ND	ND	ND
	Hot water	7.44±0.10	ND	ND	ND

(mg/ml)

Table 2. Flavonoids in the extract of *C. sunki* peel

	Immature Unchiu		Mature Unshiu		Immature sunki		Mature sunki		Immature sunki (fermented)		Mature sunki (fermented)	
	80% EtOH	Hot Water	80% EtOH	Hot Water	80% EtOH	Hot Water	80% EtOH	Hot Water	80% EtOH	Hot Water	80% EtOH	Hot Water
Rutin	4.70±0.05	2.69±0.22	2.58±0.15	1.94±0.13	17.02±0.09	8.38±0.11	5.32±0.15	6.15±0.54	14.67±0.09	7.60±0.16	6.10±0.14	6.20±1.08
Naringin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hesperedin	12.55±0.50	13.58±1.06	13.64±0.72	6.45±0.07	17.11±0.08	15.45±0.03	14.15±0.24	12.38±0.77	16.35±0.46	14.76±0.40	14.73±0.13	14.73±0.13
Quercetin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Naringinin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hesperetin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sinencetin	0.14±0.00	0.08±0.00	0.06±0.00	0.04±0.00	4.23±0.09	1.05±0.02	0.91±0.03	0.37±0.01	4.37±0.16	1.00±0.02	1.00±0.03	0.42±0.01
Nobiletin	1.76±0.03	0.73±0.05	0.58±0.03	0.35±0.00	38.83±0.89	7.32±0.15	8.67±0.28	2.89±0.07	40.90±1.74	6.99±0.17	9.43±0.29	3.24±0.08
Tangeretine	0.90±0.02	0.26±0.02	0.27±0.01	0.10±0.00	55.13±1.30	6.11±0.08	14.52±0.57	2.97±0.10	59.32±2.79	5.64±0.16	15.48±0.50	3.43±0.08

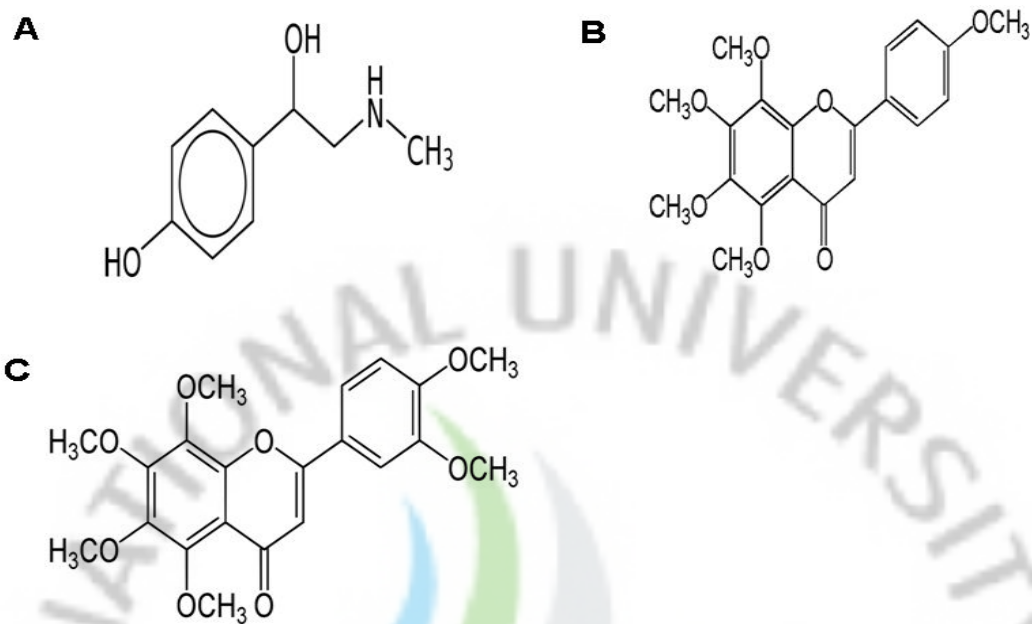
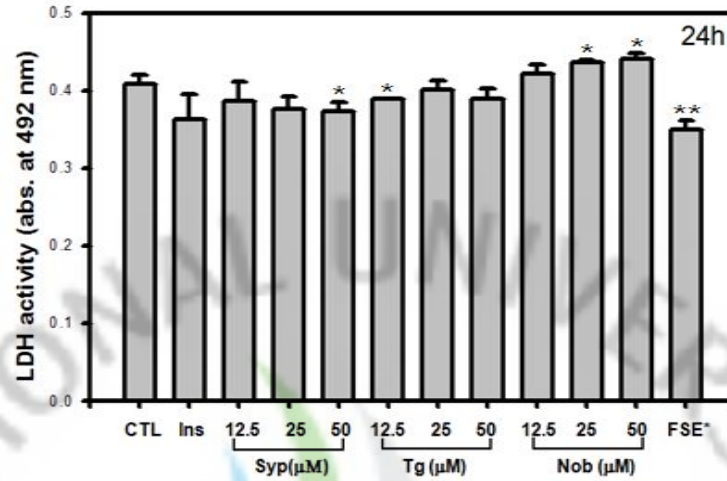


Figure 2. Chemical structure of synephrine (A), tangeritin (B), and nobiletin (C)

A.



B.

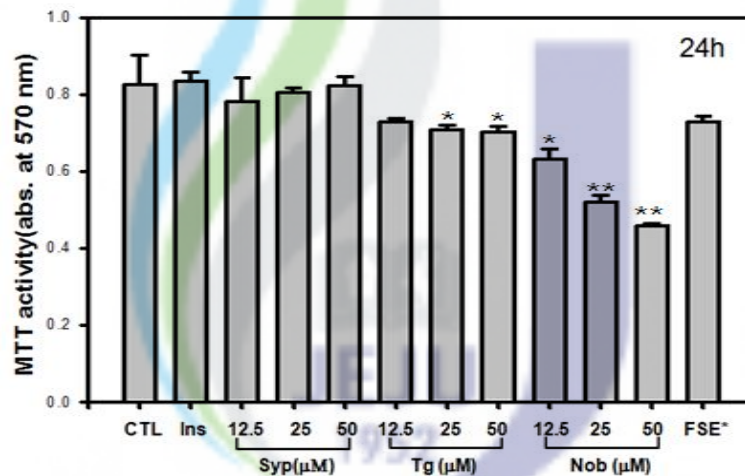


Figure 3. Effect of Synephrine and PMFs on the viability of L6 skeletal muscle cells. L6 skeletal muscle cells were serum-starved for 4 h and pretreated with various compounds for 30 min before insulin (10 nM) treatment for 24 h. The cytotoxicity were determined with LDH assay and MTT assay as described in 'Material and Methods'. CTL, control; Syp, Synephrine; Tg, Tangeritin; Nob, Nobiletin; FSE, fermented *C. sunki* peel extract (100 μg/ml). Data represent the mean ± SE of triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control alone.

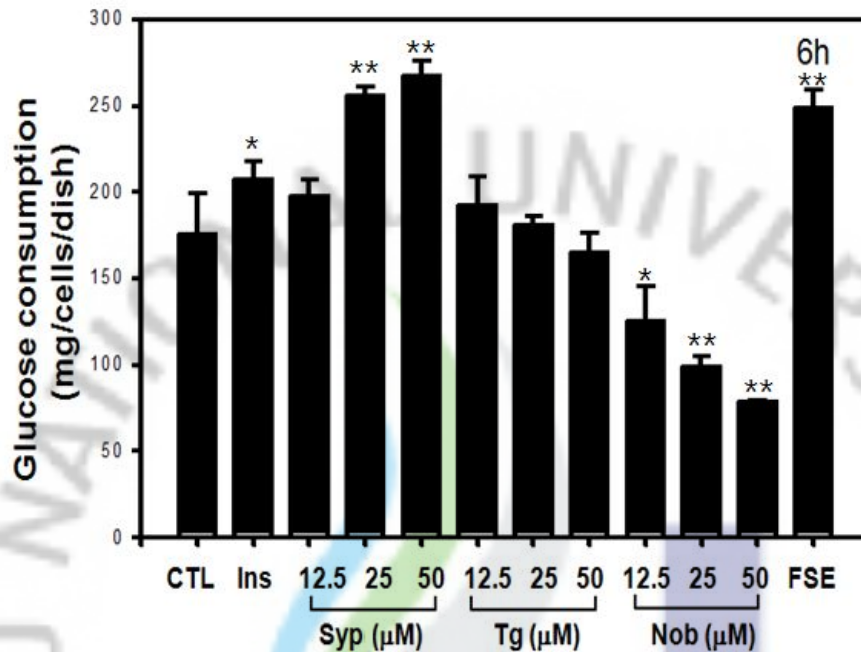


Figure 4. Effect of synephrine and PMFs on the basal glucose consumption in L6 skeletal muscle cells. Differentiated, confluent muscle cells were serum-starved for 4 h, pretreated with various compounds for 30 min before insulin (10 nM) addition. CTL, control; Ins, insulin; Syp, synephrine; Tg, tangeritin; Nob, nobiletin; FSE, fermented *C. sunki* peel extract (100 μg/ml). Data represent the mean ± SE of triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control alone.

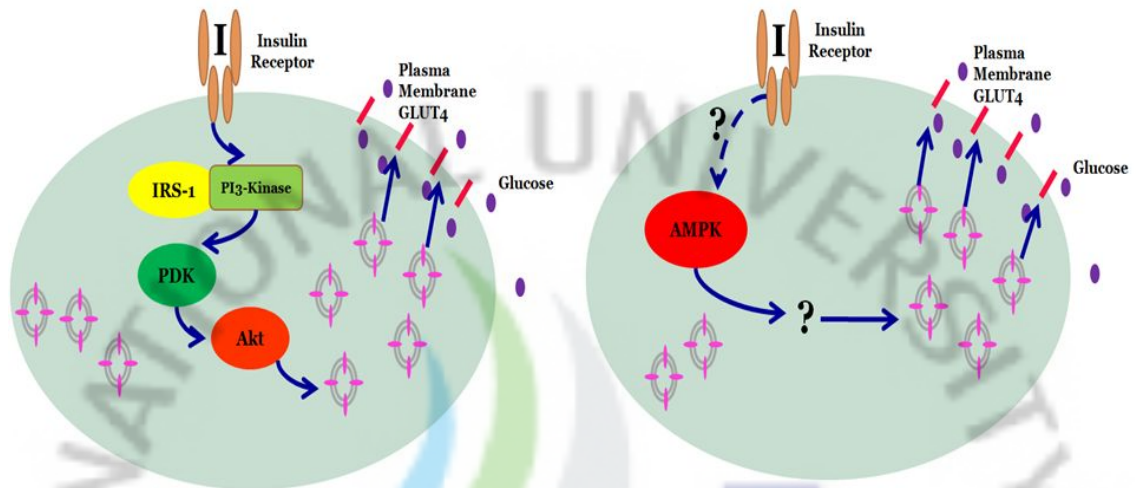


Figure 5. Cell signaling pathways related to glucose transport.

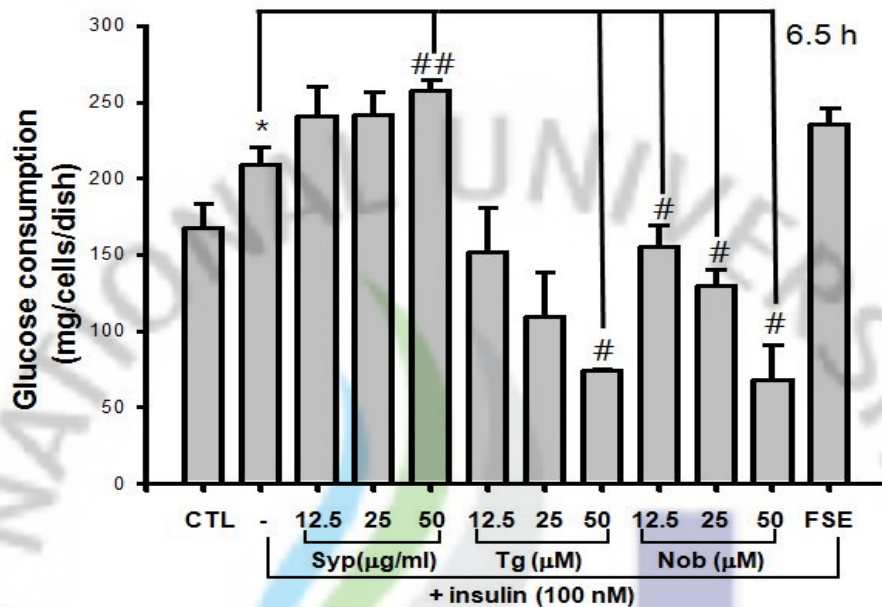
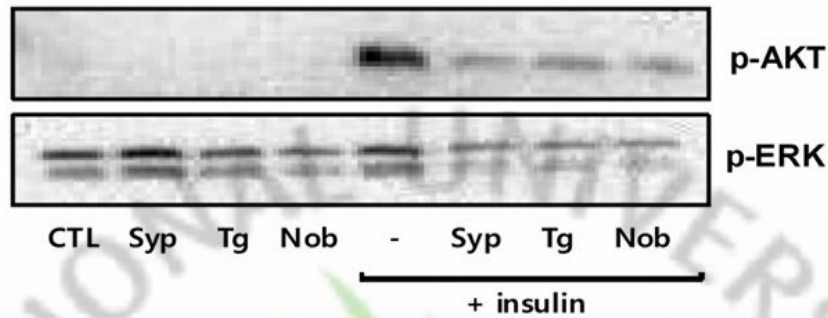


Figure 6. Effect of synephrine and PMFs on insulin-induced glucose consumption in L6 skeletal muscle cells. Differentiated, confluent cells were serum-starved for 4 h, pretreated with citrus peel extract for 30 min before insulin (100 nM) addition. CTL, control; Syp; synephrine; Tg, tangeritin; Nob, nobiletin; FSE, fermented *C. sunki* peel extract (100 µg/ml). Data represent the mean ± SE of triplicate experiments. * $p < 0.05$ versus control alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus insulin alone.



CTL : control
Syp : synephrine (50 ug/ml)
Tg : tangeritin (50 μM)
Nob : nobiletin (50 μM)
Insulin : 100 nM

Figure 7. Effect of synephrine and PMFs on basal- or insulin-stimulated signaling pathways in L6 skeletal muscle cells. Confluent cells were serum-starved for overnight with D-Mem (4.5 g/L glucose), pretreated with citrus peel extract for 30 min before insulin (10 nM) addition. Cells were lysed, separated on SDS-polyacrylamide gels, and immunoblotted as described in 'Materials and Methods'.

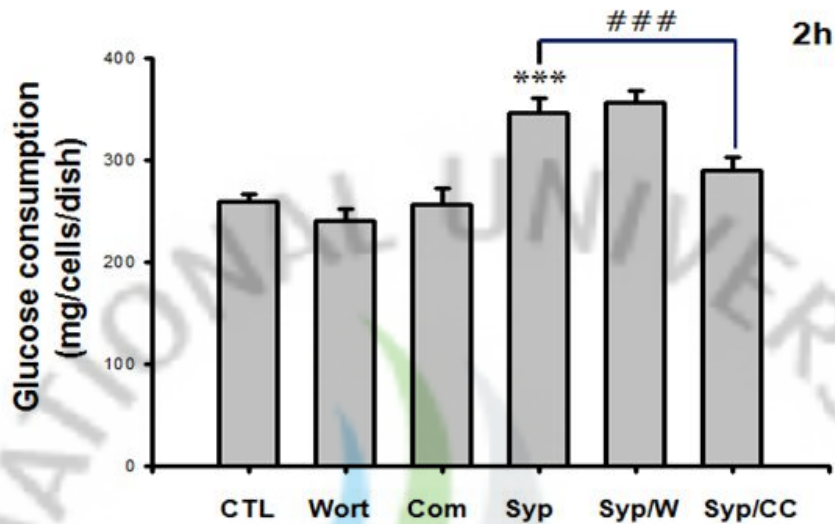


Figure 8. Effect of inhibitors of PI3K and AMPK on synephrine induced glucose consumption in L6 skeletal muscle cells. Confluent cells were serum-starved for 4 h, pretreated with wortmannin (100 nM) and compound-C (10 μ M) for 30 min before synephrine (50 μ M) addition. CTL, control; wort, wortmannin; com, compound-C; Syp, synephrine; Syp/W, synephrine+wortmannin; Syp/CC, synephrine+compound-C. Data represent the mean \pm SE of triplicate experiments. *** $p < 0.001$ versus control alone, ### $p < 0.001$ versus synephrine alone.



Figure 9. Effect of synephrine on GLUT4 translocation in L6 skeletal muscle cells. Confluent cells were serum-starved overnight with D-Mem (4.5 g/L glucose), pretreated with synephrine(50 μ M) for 30 min before insulin (10 nM) addition. Cells were lysed, separated on SDS-polyacrylamide gels, and immunoblotted as described in ' Materials and Methods'. CTL, control ; Ins, insulin; Syp, synephrine.



Figure 10. Effect of inhibitors of PI3K and AMPK on synephrine-induced GLUT4 translocation in L6 skeletal muscle cells. Confluent cells were serum-starved overnight with D-Mem (4.5 g/L glucose), pretreated with wortmannin, compound-C for 30 min before synephrine (50 μ M) for 30 min treatment then insulin (10 nM) addition. Cells were lysed, separated on SDS-polyacrylamide gels, and immunoblotted as described in ' Materials and Methods'. CTL, control ; Syp, synephrine; Syp/W, synephrine+wortmannin; Syp/CC, synephrine + compound-C.

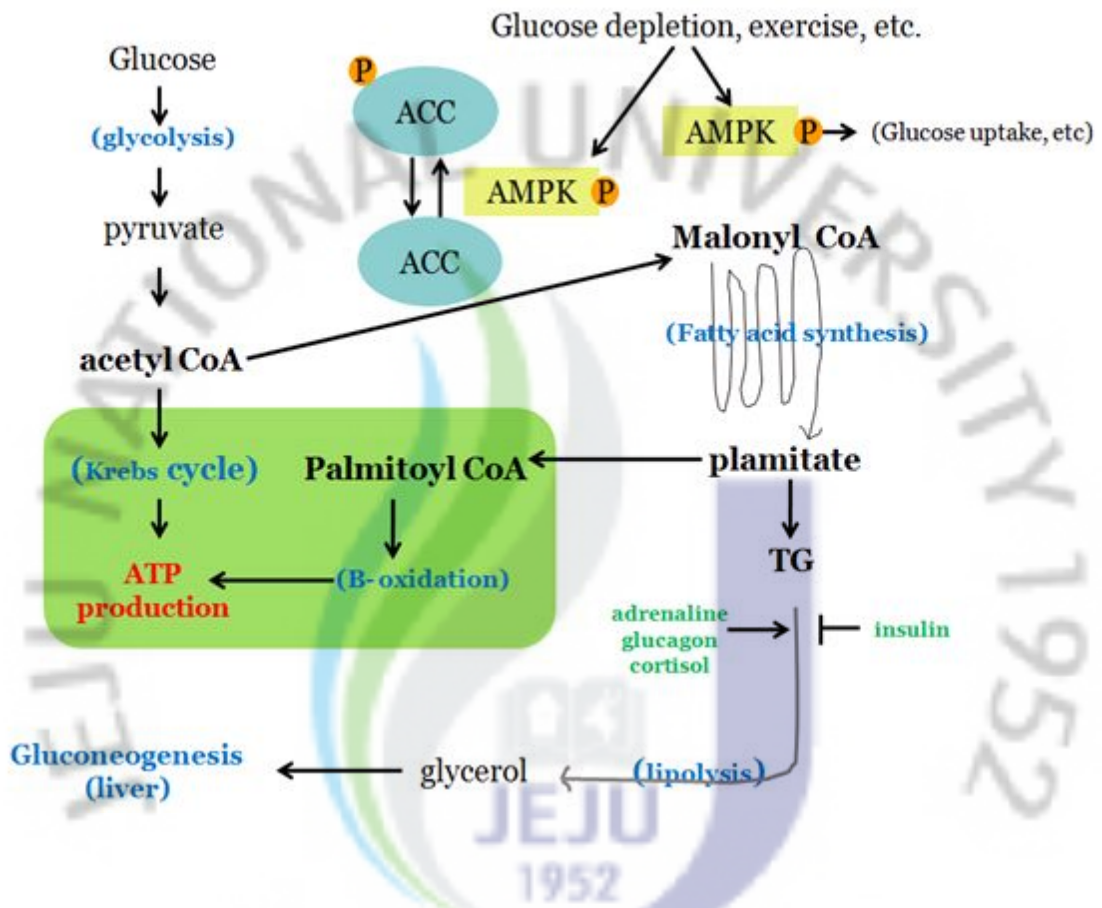


Figure 11 . Role of AMPK and ACC in fat accumulation.

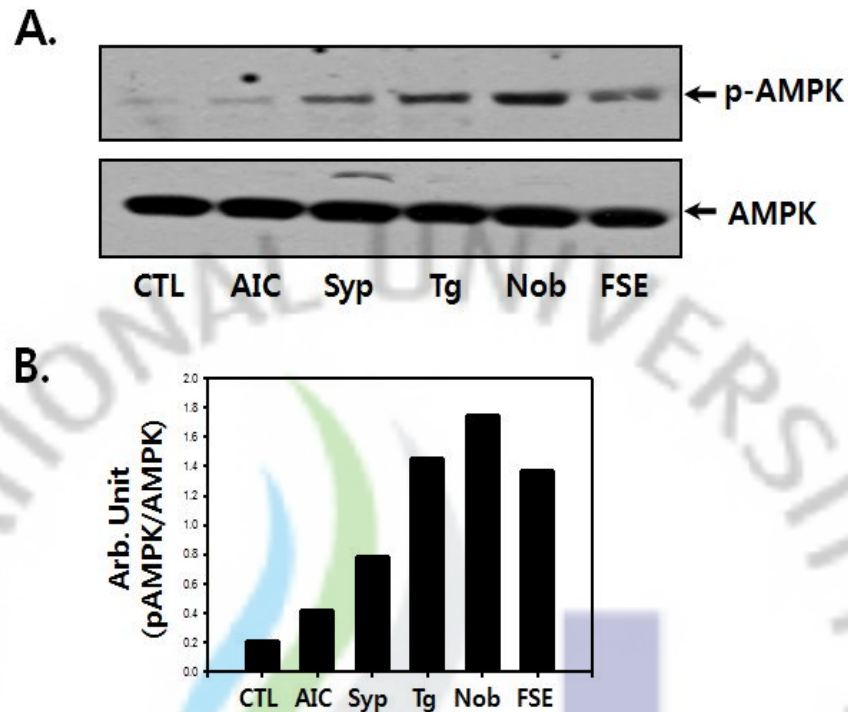


Figure 12. Effect of synephrine and PMFs on AMPK in L6 skeletal muscle cells. Confluent cells were serum-starved 16 h in D-Mem, treated with various compounds for 4 h. Cells were lysed, separated on SDS-polyacrylamide gels, and immunoblotted as described in 'Materials and Methods'. CTL, control; AIC, AICAR; Syp, synephrine; Tg, tangeritin; Nob, nobiletin; FSE, fermented extract of *C. sunki* peel.

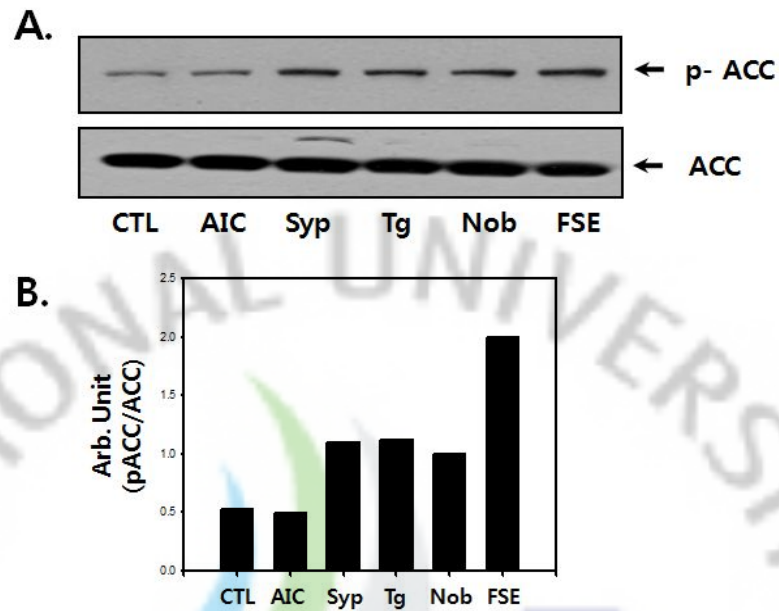
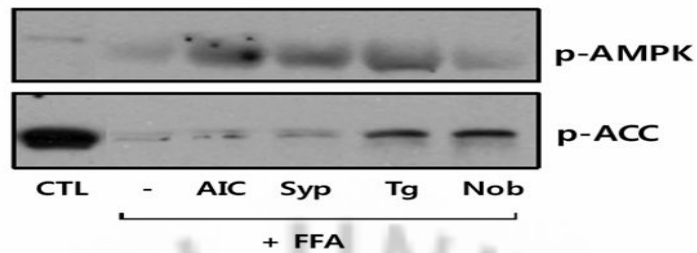


Figure 13. Effect of synephrine and PMFs on ACC in L6 skeletal muscle cells. Confluent cells were serum-starved 16 h in D-Mem, treated with citrus peel extract and AICAR (AMPK activator) for 4 h. Cells were lysed, separated on SDS-polyacrylamide gels, and immunoblotted as described in ' Materials and Methods'. CTL, control; AIC, AICAR; Syp, synephrine; Tg, tangeritin; Nob, nobiletin; FSE, fermented *C. sunki* peel extract.



CTL : control
 AIC : AICAR (1 mM)
 Syp : synephrine (50 ug/ml)
 Tg : tangeritin (50 μ M)
 Nob : nobiletin (50 μ M)
 FSE : fermented *C. sunki* peel extract (100 ug/ml)
 FFA : Free fatty acid (1mM)

Figure 14. Effect of synephrine and PMFs on FFA-induced suppression of phosphorylation of AMPK and ACC in L6 skeletal muscle cells. Confluent cells were serum-starved for 16 h, pretreated with FFA for 24 h, and further treated with various compounds for 4 h. Cells were lysed, separated on SDS-polyacrylamide gels, and immunoblotted as described in 'Materials and Methods'.

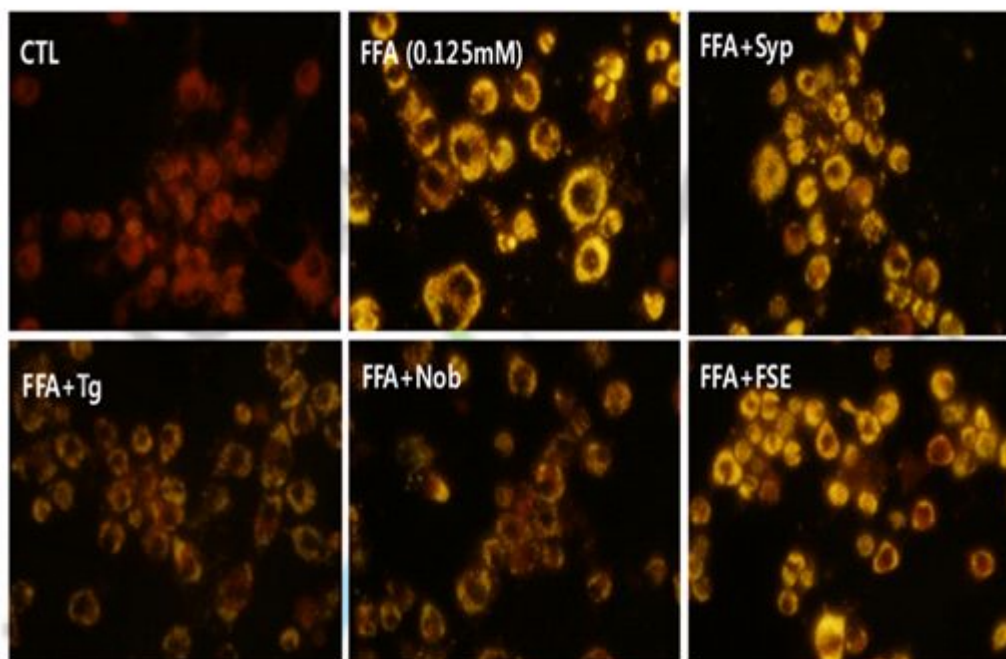


Figure 15 . Effect of synephrine and PMFs on FFA-induced intracellular fat accumulation. Confluent cells were serum-starved overnight in D-Mem, treated with compounds and free fatty acid (0.125 mM) for 24 h. Cells were stained with Nile red as described in ' Materials and Methods'. FFA, free fatty acid; Syp, synephrine; Tg, tangeritin; Nob, nobiletin; FSE, fermented *C. sunki* peel extract.

VI. 고 찰

제주자생 재래감귤종의 하나인 진귤(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka)의 과피는 전통적으로 중요한 한약재 성분으로 사용되어 왔으나 아직 그 약리학적 작용에 대해서는 분석이 되어 있지 못하다. 선행 연구를 통해 진귤의 과피 발효 추출물에서 항산화활성, 항염증활성의 증가와 종양세포의 증식억제를 확인하였다 (Kang 등, 2005). 또한 동물실험에서의 지방간 형성의 억제와 고지방식이에 따른 체중의 증가를 억제 (Cui 등, 2007)함을 확인한 바 있다. 하지만 아직까지 골격근 세포에서 이들 진귤과피 성분들이 생리활성에 미치는 효과와 어떠한 작용기전을 가지고 있는지에 대해서는 보고된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 제주도 재래 감귤류인 진귤의 과피에 많이 함유되어있는 성분들 중 alkaloid 성분인 synephrine과 polymethoxyflavone 성분인 tangeritin, nobiletin이 포도당대사와 지질대사활성에 어떠한 영향을 주는지를 L6 골격근 세포에서 조사하고자 하였다.

먼저 진귤과피내 성분들이 세포의 생존능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 L6 골격근 세포에서 진귤과피 성분들의 효과를 조사하였다. synephrine은 LDH 그리고 MTT 활성에 있어서 대조군과 비슷한 경향을 보였다. 반면에 PMFs (tangeritin, nobiletin)은 고농도에서 LDH를 증가시키고 MTT 활성을 감소시켰다(Fig. 3). 이러한 PMFs에서의 세포 생존능의 감소는 PMFs가 세포독성을 갖고 있다기보다는 우태아 혈청이 제거된 혈청결핍 배양액에서 세포를 전배양 한 시간과 진귤과피 성분의 처리 시간의 경과에 따른 영양결핍에 의한 결과라고 사료되며 따라서 측정시간을 줄인 조건에서의 검증이 필요할 것으로 사료된다. Alkaloid 성분인 octopamine은 지방세포에서 β adrenergic receptor를 통해 포도당 수송을 증가시킨다는 보고가 되어 있다 (Virgile 등, 2001). 하지만 아직까지 synephrine이 포도당 대사에 미치는 영향에 대해서는 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 진귤과피 성분들이 포도당대사의 표적세포인 L6 골격근 세포에서 포도당 흡수에 어떠한 영향을 미치는지를 보았다. 그 결과, synephrine의 농도의존적으로 포도당 흡수를 증가시켰다. 하지만 PMFs은 포도당 흡수에 있어서 대조군과 비슷하거나 낮은 경향을 보였다. 진귤과피 성분들과 인슐린을 병행처리 했을 때도 경향은 비슷했다. 이러한 결과는 synephrine 단독으로도 세포의 포도당 흡수를 촉진시키는 효과가 있으며 이러한 효과는 부분적으로 인슐린의 작용과는 별개로 이루어지고 있음을 시사한다. 이러한 결과를 바탕으

로 synephrine이 포도당 흡수를 증가시키는 작용이 인슐린-수용체 신호전달체계에 의존적으로 이루어지는지, 아니면 비의존적으로 이루어지는 지를 알아보기 위하여 진굴과피 성분들의 인슐린-수용체 신호전달단백질인 Akt/PKB 및 ERK 활성화에 미치는 영향을 조사하였다 (Cheatham 등, 1995; Kahn 등, 1997). 그 결과 인슐린 처리에 시에는 Akt/PKB의 활성이 증가됨을 볼 수 있었다. 하지만 인슐린과 진굴과피 성분들을 병행처리 했을 때 인슐린 처리에 의해 증가된 Akt/PKB의 활성이 synephrine과 PMFs에 의해 감소됨을 확인하였다. 이 진굴과피 성분들은 ERK의 활성 또한 증가시키지 못했다 (Fig. 6). 이러한 결과는 synephrine이 인슐린 수용체의 티로신 자가인산화의 활성화에 직접적인 영향을 미치지 않는다는 것을 암시하며, synephrine의 세포 내로의 포도당 흡수의 증가가 인슐린 수용체 신호전달을 매개 (PI3K-Akt signaling) 로 하는 인슐린-의존적 경로와는 별개로 이루어지고 있음을 시사한다. 이러한 결과를 바탕으로 포도당 흡수의 또다른 경로인 인슐린 비의존적인 경로를 통한 것인지를 보았다. 인슐린-비의존적인 포도당 흡수는 인슐린 매개 PI3-Kinase 신호전달과 독립적인 경로로서, AMPK의 활성의 증가로 인해 GLUT4의 발현을 증가시키고 세포막으로의 전이를 통해 포도당의 흡수를 증가하게 한다(Kurth-Kraczek 등, 1999; Merrill 등, 1997). 본 연구에서, synephrine을 단독으로 처리했을 때 세포막으로의 GLUT4 이동이 증가됨을 확인하였고 synephrin과 함께 AMPK의 저해제인 compound-C를 병행 처리하였을 때 세포막으로의 GLUT4 이동이 억제되었다. 이 결과는 synephrine에 의한 세포내의 포도당 수송의 증가가 인슐린 비의존적인 AMPK 경로를 통해 이루어지고 있음을 의미하며, synephrine이 세포내 GLUT4 단백질을 증가시킴으로써 세포 내로의 포도당 흡수에 기여할 것임을 암시한다. AMP-stimulated protein kinase (AMPK)는 운동 그리고 metformin, troglitazone과 같은 약물에 의해 활성화되며 그로인해 항당뇨효과를 가져온다고 알려져 있다(M.H.Zou 등, 2004; D. Konrad 등, 2005; N. Musi 등, 2003). 또한 이 효소는 포도당 대사와 지질 대사에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 지질 대사에는 AMP-stimulated protein kinase (AMPK) 및 acetyl-CoA carboxylase (ACC)가 관여하는데, AMPK가 활성화하게 되면 ACC의 인산화가 증가하게 되고 ACC의 활성의 억제 (Abu-Elheiga 등, 2001)를 통해 지방산화를 촉진하고 중성지방으로의 축적을 억제하게 된다. 이전의 연구에 따르면 감귤류의 alkaloid에 속하는 synephrine은 지방세포에서 지방분해를 활성화 시킨다는 보고가 있다 (Carpene 등, 1999). 뿐만아니라 nobiletin, naringenin 등 PMFs이 지

방세포에서 지질대사 개선에 긍정적인 영향을 끼친다는 보고가 있다 (Harmon등, 2001; Saito등, 2009). 따라서 본 연구에서는 진굴과피 성분들이 골격근 세포에서 지방대사에 미치는 효과를 보기 위해 free fatty acid (FFA, Palmitate)로 세포 내 지질 형성을 유도하고 synephrine과 PMFs을 병행 처리한 후 Nile red 염색을 통해 진굴과피 성분들의 세포 내 지질 축적을 감소시키는 것을 확인하였다. 특히 PMFs 성분들에서의 두드러진 효과를 확인할 수 있었다. 그리고 진굴과피 성분들이 지질대사와 관련된 AMPK의 효소 활성을 증가시키고 ACC의 효소 활성을 억제시키는 것을 확인하였다 (Fig. 14). 이 결과는 진굴과피 성분들이 지질의 축적을 조절하는 두 효소의 활성을 조절하여 지질의 축적을 억제함을 의미한다.

결론적으로 synephrine은 AMPK의 활성 증가를 통한 인슐린-비의존적인 경로를 통해 포도당 수송을 촉진하며, 또한 synephrin과 PMFs (tangeritin, nobiletin)은 AMPK와 ACC의 활성을 조절함으로써 중성지방의 과도한 축적을 억제하여 당뇨병 그리고 비만과 같은 대사질환을 예방하거나 치유하는데 도움이 될 수 있을 것이라 사료된다. 그러나 이러한 결과를 좀 더 뒷받침하기 위해서는 동물모델 (*in vivo*)에 있어서의 후속연구가 필요하다.

V. 참고문헌

Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Abo-Hashema, K.A.H., Wakil, S.J., Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 291, 2613--2616 (2001)

AOAC. Official Methods of AOAC [nt]. 15thed. Method 994. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA (1990)

A.R.Saltiel, C.R.Kahn, Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature* 414-799 (2001)

Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, and Rossetti L: Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 93 : 2438-46 (1994)

Burks DJ, Pons S, Towery H, Smith-Hall J, Myers M Jr, Yenush L, White MF: Heterologous pleckstrin homology domains do not couple IRS-1 to the insulin receptor. *J Biol Chem* 272 : 27716-27721 (1997)

Carpene, C., Galitzky, J., Fontana, E., Atgie, C., Lafontan, M., Berlan, M. Selective activation of β 3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 359, 310-321 (1999)

Cheatham, B., and Kahn, C.R. Insulin action and the insulin signaling network. *Endor. Rev* : 117-142 (1995)

Cheatham B, Kahn CR: Insulin action and insulin signaling network. *Endocrinol Rew*, 16 : 117-29 (1995)

Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR: Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14 :

4902-4911 (1994)

Chung SK, Kim SH, Choi YH, Song EY, Kim SH. Status of cit-rus fruit production and view of utilization in Cheju. Food Ind. Nutr. 5 : 42-52 (2000)

D.Carling, P.A, Zammit, D.G.Hardie, A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzyme of fatty acid and cholesterol biosynthesis, FEBS lett. 223, 217-222 (1987)

DeFronzo RA. Pharmacologic Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus. Annal of Internal Medicine 131 : 281-303 (1999)

D. Konrad, A. Rudich, P.J. Bilan, N. Patel, C. Richardson, L.A. Witters, A. Kip, Troglitazone causes acute mitochondrial membrane depolarisation and an AMPK-mediated increase in glucose phosphorylation in muscle cells, Diabetologia 48, 954-966 (2005)

E.J. Kurth-Kraczek, M.F. Hirshman, L.J. Goodyear and W.W. Winder, 5-AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle, Diabetes 48, pp. 1667-1671 (1999)

Francis AR, Shetty TK. Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of n-methyl-n-nitro-n-nitrosoguanidine. Carcino-genesis 10 : 1953-1955 (1989)

Gerlier, D., and Thomasser, N., Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. JImmunolmethods,94,57-63 (1986)

G.F.Merrill, E. J .Kurth, D.G. Hardie, W.W. Winder, AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle, Am. J . Physiol. 273, E1107-E1112 (1997)

Gray, A. M. and P. R. Flatt. Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant Coriandrum Sativum(coriander).Brit.J.Nutr.,81203-209

(1999)

Guengerich FP, Kim DM. In vitro inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. *Carcinogenesis* 11 : 2275-2279 (1990)

Guthrie N, Carroll KK. Inhibition of mammary cancer by citrus flavonoids. pp. 227-236. In : *Flavonoids in the living system*. Manthey JA, Buslig BS(eds). Plenum. New York, NY, USA (1998)

Hardie DG, Carling D, Carlson M : The AMP activated/SNF1 protein kinase subfamily : metabolic sensors of the eukaryotic cell ? *Ann Rev Biochem* 67:821-855 (1998)

Harmon, A. W. and J. B. Harp. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am. J. Physiol.*, 280: 807-813 (2001)

Harris MI, Entmacher PS. Mortality from diabetes. In: Harris MI, Hamman RF ed. *Diabetes in America*. Washington DC, US Government Printing Office p1-48 (1995)

Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults : The Third National Health and Nutrition Examination Survey, *Diabetes Care* 21 : 518-526 (1998)

Heesom KJ, Harbeck M, Kahn CR, Denton RM : Insulin action on metabolism. *Diabetologia* 40 : B3-B9 (1997)

Kahn CR: Insulin receptors and insulin signaling in normal and disease states. In : *International Textbooks of Diabetes*, (2nd ed.) John Wiley & Sons Limited, Chichester, 437-67 (1997)

- Kameda, K., M. Chikaki, C. Morimoto, M. Jiang and H. Okuda.
Insulin like action of trans-10-hydroxy-2-decanoic acid and its related substance.
J. Traditional. Med.,13456-457 (1996)
- Kim CJ. Screening of physiologically active substance. Jayou Academy, Seoul, Korea. pp.325-338 (1996)
- Kim, H.Y., Distribution, taxonomy, horticultural characters of the local Citrus spp. in Cheju and the genetic markers among them. Ph.D. thesis. Chonnam National University (1988)
- Koivisto VA. Insulin therapy in type II diabetes. Diabetes Care 16: 29-39 (1993)
- Krenisky, J. M., J. Luo, M. J. Reed and J. R. Carney. Isolation and antihyperglycemic activity of bakuchiol from *Otholobium Pubescens* (Fabaceae), a peruvian medicinal plant used for the treatment of diabetes. Biol. Pharm. Bull., 22:1137-1140 (1999)
- Kreutter, D. K., K. M. Andrews, E. M. Gibbs, N. J. Hutson and R. W. Stevenson. Insulin like activity of new antidiabetic agent CP68722 in 3T3-L1 adipocytes. Diabetes, 39:1414-1419 (1990)
- Lee CH, Kang YJ. HPLC analysis of some flavonoids in citrus fruits. Korean J Postharvest Sci Technol 4(2) : 181-187 (1997)
- Liu, Y., Understanding the biological activity of amyloid proteins in vitro: from inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostasis. prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 377-395 (1999)
- M.H.Zou, S.S. Kirkpatrick, B.J. Davis, J.S. Nelson, W.G. Wiles 4th, U. Schlattner, D. Neumann, M. Brownlee, M.B. Freeman, M.H. Goldman, Activation of the

AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo role of mitochondrial reactive nitrogen species, *J. Biol. Chem.* 279, 43940-43951(2004)

N. Musi, L.J. Goodyear, AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake, *Acta Physiol. Scand.* 178, 337-345 (2003)

Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M: Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes: studies with a selective inhibitor wortmannin. *JBiol Chem* 269 : 3568-3573 (1994)

Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S: Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking: Location! Location! Location! *J Biol Chem* 274 : 2593-2596 (1999)

Ruderman N and Prentki M: AMPkinase and malonyl- CoA : targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discor* 3 : 340-51 (2004)

Saito, T., D. Abe and K. Sekiya. Nobiletin enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 357: 371-376 (2009)

Shin-Hae Kang, Young-Jae Lee, Chang-Hong Lee, Se-Jae Kim, Dae-Ho Lee, Young-Ki Lee, and Deok-Bae Park. Physiological Activities of Peel of Jeju-indigenous Citrus sunki Hort. Tanaka. *Korean J.FoodSci. Technol.* vol.37,No.6, pp.983~988 (2005)

Takaku, T., M. Jiang, H. Okuda and N. Maeda. Isolation of insulin like substance from ephedra sinica STAPF. *J.TraditionalMed.*,14358-359 (1997)

Virgile Visentin, Nathalie Morin, Emi Fontana, Danielle Prévot, Jeremie Boucher, Isabelle Castan, Philippe Valet, Danica Grujic and Christian Carpené. Dual Action of Octopamine on Glucose Transport into Adipocytes: Inhibition via β

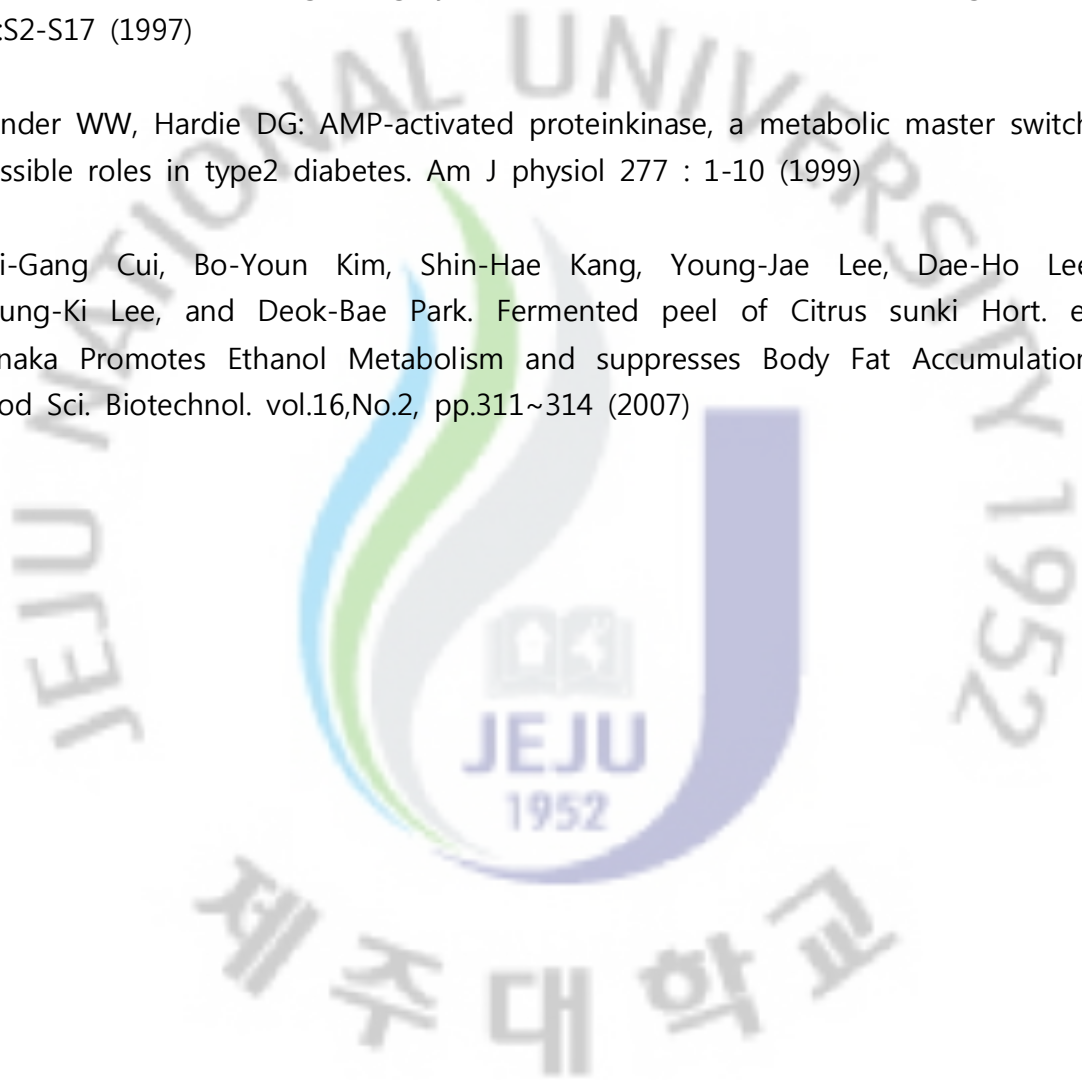
3-Adrenoceptor Activation and Stimulation via Oxidation by Amine Oxidases. JPET 299:96-104 (2001)

West, I. C. Radicals and oxidative stress in diabetes. Diabetic Med., 17:171-180 (2000)

White MF: The insulin signalling system and the IRS proteins. Diabetologia 40:S2-S17 (1997)

Winder WW, Hardie DG: AMP-activated proteinkinase, a metabolic master switch: possible roles in type2 diabetes. Am J physiol 277 : 1-10 (1999)

Zhi-Gang Cui, Bo-Youn Kim, Shin-Hae Kang, Young-Jae Lee, Dae-Ho Lee, Young-Ki Lee, and Deok-Bae Park. Fermented peel of Citrus sunki Hort. ex Tanaka Promotes Ethanol Metabolism and suppresses Body Fat Accumulation. Food Sci. Biotechnol. vol.16,No.2, pp.311~314 (2007)



VI. 적 요

진굴은 우리나라에서는 제주도에서만 자생하고 있는 재래 감귤류로 다른 감귤류에 비해 과피에 alkaloid 성분과 polymethoxyflavone 성분을 상대적으로 많이 함유하고 있다. 본 연구에서는 진굴과피 성분들 중 상대적으로 그 함량이 많은 synephrine, tangeritin, nobiletin을 재료로 하여 L6 골격근 세포에서 이들 진굴과피 성분들이 포도당 그리고 지질대사에 미치는 효과를 규명하고자 하였다. L6 골격근 세포에서 alkaloid 성분인 synephrine은 PMFs보다 적은 세포독성을 보였다. 또한 synephrine은 농도의존적으로 포도당의 흡수를 증가시켰다. 하지만 PMFs은 포도당의 흡수에 영향을 미치지 않았다. synephrine의 포도당 흡수의 증가가 어떠한 경로를 통해 이루어지는지를 확인하기 위해 인슐린의존성 포도당수송에 중요한 역할을 하는 신호전달 단백질들 중 하나인 Akt/PKB의 활성을 보았고 이 단백질의 활성이 synephrine 그리고 PMFs에 의해 감소됨을 확인하였다. 따라서 포도당 흡수의 또 다른 경로인 AMPK 의존적인 경로를 통한 포도당 수송을 확인한 결과 synephrine에 의한 포도당 흡수의 증가가 AMPK의 저해제인 compound-C에 의해 감소됨을 확인하였고 synephrine에 의한 세포막의 GLUT4의 발현 증가 또한 이 저해제에 의해 감소되는 것을 통해 synephrine의 포도당 흡수의 증가가 AMPK 의존적인 경로를 통해 이루어지고 있음을 확인하였다. 또한 진굴과피 성분들이 지질대사에 미치는 영향을 보기위해 L6 골격근 세포에 free fatty acid를 처리하여 지질 형성을 유도한 후 지질대사의 조절에 중요한 두가지 효소인 AMP-stimulated kinase(AMPK) 및 acetyl-CoA carboxylase(ACC) 활성을 측정된 결과 AMPK는 이들 진굴과피 성분들에 의해 활성이 증가하였고, ACC의 활성은 억제됨을 확인하였다. 이로써 진굴과피 성분들의 세포내 지질축적을 억제하는 데 기여하는 것을 확인하였다. 또한, free fatty acid의 처리로 증가된 세포내의 지질 축적이 이들 진굴과피 성분들의 처리에 의해 억제되는 것이 Nile red 염색을 통해 확인되었다. 본 연구결과를 통해 진굴과피 성분들이 비정상적인 포도당 그리고 지질대사에 어느정도의 개선효과를 가져 올 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

지난 2년은 제 인생에 있어 가장 중요한 순간이었고 아쉬움이 많았던 시간이었습니다. 반면에 이처럼 대학원 생활을 마무리하고 좋은 결실을 맺은 보람된 시간이기도 했습니다.

먼저 부족하고 다듬어지지 않은 저를 바르게 지도해주신 박덕배 지도교수님께 존경과 사랑으로 감사의 마음을 전합니다. 인품으로나 실력으로 부족함이 없으신 교수님 밑에서 많은 것을 배우게 된 것은 제 인생에 있어서 가장 큰 행운이라고 생각합니다. 그리고 제 논문을 정성스레 살펴봐주시고 조언을 해 주신 조문제 교수님, 유은숙 교수님께 마음속 깊이 감사드립니다. 그 외 많은 가르침을 주신 강희경교수님, 고영상교수님, 은수용교수님, 이근화교수님, 이영기교수님, 정성철교수님, 정영배교수님, 현진원교수님, 고관표교수님, 이대호교수님을 비롯한 의과대학 교수님께 감사드립니다. 또한 대학원 생활에 있어서 큰 힘이 되어준 보연언니, 실험실 선배이자 멘토인 지강선생님, 관건, 지현, 유경, 수경, 금희선생님, 연희선생님, 윤실이, 영미선생님, 민경언니, 은진언니, 상철오빠, 경진오빠, 정일오빠, 대학원생활 내내 따뜻한 말로 힘을 주셨던 김언주선생님, 수미언니, 은정이, 성룡오빠, 시범오빠, 혜진언니, 내 동기 희경이, 소중한 친구 현희와 정은이에게도 감사의 말을 전합니다.

나의 버팀목, 그 누구보다 나를 사랑해주시고 아껴주시는 사랑하는 나의 아빠, 엄마께 정말 감사드립니다. 30여년 동안의 공직생활을 마무리하시고 이제 퇴임을 준비하시는 사랑하는 아빠, 그동안 따뜻하게 우리가정을 잘 이끌어 주신 엄마가 정말 존경스럽고 자랑스럽습니다. 또한 나의 하나뿐인 핏줄 멋지고 듩직한 우리 오빠와 언제나 아가씨 걱정하며 신경써주는 이젠 한 식구가 된 이쁘고 착한 언니에게 고맙다는 말을 전합니다. 그리고 사랑하는 내 조카 채희가 밝고 건강한 사람으로 자라나길 기도하겠습니다.

끝으로 항상 내 곁에서 나를 응원해 주시고 걱정해 주시는 분들께 지면으로나마 감사의 마음을 전합니다.

2010년 12월. 홍 나 영 올림