

## C2C12 골격근 세포에서 갈근황금황련탕의 당 대사 및 에너지 조절 효과

오지홍 · 한송이 · 임수경 · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실

### The Effects of *Galgunhwanggumhwangryun-tang* on Glucose and Energy Metabolism in C2C12 Myotubes

Jihong Oh, Song-Yi Han, Soo Kyoung Lim, Hojun Kim

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

Received: October 26, 2022  
Revised: November 4, 2022  
Accepted: November 8, 2022

**Correspondence to:** Hojun Kim  
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Dongguk University Ilsan Oriental Hospital, 27 Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang 10326, Korea  
Tel: +82-31-961-9111  
Fax: +82-31-961-9009  
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2022 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

**Objectives:** This study aimed to observe the anti-diabetic effect and underlying mechanisms of *Galgunhwanggumhwangryun-tang* (GHH; Gegen-Qinlian-decoction) in the C2C12 myotubes.

**Methods:** GHH (1.0 mg/ml) or metformin (0.75 mM) or insulin (100 nM) were treated in C2C12 myotubes after 4 days differentiation. The glucose uptake was assessed by 2-[N-(7-160 nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose uptake by C2C12 cells. The expression of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and phosphorylation AMPK (pAMPK) were measured by western blot. We also evaluated gene expression of glucose transporter type 4 (Slc2a4, formerly known as GLUT4), glucokinase (Gk), carnitine palmitoyltransferase 1A (Cpt1a), nuclear respiratory factors 1 (Nrf1), mitochondrial transcription factor A (Tfam), and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (Ppargc1a) by quantitative real-time polymerase chain reaction.

**Results:** GHH promoted glucose uptake in C2C12 myotubes. The expression of AMPK protein, which plays an essential role in glucose metabolism, was increased by treatment with GHH. GHH treatment tended to increase gene expression of Slc2a4, Gk, and Nrf1 but was not statistically significant. However, GHH significantly improved Tfam and Ppargc1a gene expression in C2C12 myotubes.

**Conclusions:** In summary, GHH treatment promoted glucose uptake in C2C12 myotubes. We suggest that these effects are associated with increased gene expression involved in mitochondrial biosynthesis and oxidative phosphorylation, such as Tfam and Ppargc1a, and increased expression of AMPK protein.

**Key Words:** Diabetes mellitus, Skeletal muscle fibers, *Galgunhwanggumhwangryun-tang*, AMP-activated protein kinases, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, Transcription factors

## 서론

당뇨병은 대사질환 중 하나로 인슐린 분비 장애 혹은 인슐린 저항성에 의한 포도당의 에너지 대사에 불균형이 발생해 고혈당증 및 여러 합병증을 초래하는 질환이다<sup>1)</sup>. 당뇨병 유형 중 인슐린 분비 감소와 인슐린 저항성 증가를 특징으로 하는 제2형 당뇨가 다수를 차지하며, 당뇨 치

료에서 흔히 메트포민(metformin)과 같은 경구혈당강하제 혹은 인슐린 주사제가 처방된다<sup>2)</sup>. 메트포민은 제형에 따라 위장관 부작용을 유발할 수 있으며 모든 환자에서 동일한 혈당 개선 효과를 나타내지는 않는다<sup>2,3)</sup>.

당뇨병에서 중요한 병리 기전으로 꼽히는 인슐린 저항성의 원인으로 골격근에서의 포도당 이용 감소가 제안되었다. 골격근에서의 포도당 이용 감소는 지방산 산화, 포

도당 산화, 미토콘드리아 기능 저하 등 다양한 기전에 의해 유발된다고 알려져 있다<sup>4)</sup>. 또한 당뇨병에서 세포 내 에너지 결핍이 발생하는데, 1990년대부터 당뇨병 병리기전에 에너지를 생성하는 역할을 담당하는 미토콘드리아 기능 저하가 인슐린 저항성과 관련된다는 근거들이 제안되었다<sup>5)</sup>. 제2형 당뇨병 환자나 인슐린 저항성을 보이는 비만 환자에서 골격근 내 미토콘드리아가 정상인에 비해 적은 것으로 나타났다<sup>6)</sup>. 또한 기존에는 메트포민이 adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)를 활성화시켜 간에 작용하여 고혈당을 개선시킬 뿐만 아니라, 최근 들어 메트포민이 미토콘드리아 생합성을 조절하는 기전에도 영향을 준다는 연구들이 보고됐다<sup>7,8)</sup>.

한약 중에서는 갈근황금황련탕(*Galgunhwanggyunhwangryuntang*, GHH; 갈근금련탕)이 한의 임상에서 케양성 장염과 당뇨병 치료에 활용되어 왔다<sup>9)</sup>. 갈근금련탕은 갈근, 황련, 황금, 감초, 네 가지 약재로 구성된 처방으로 상한론에 처음 기록되었으며 표증이 있으면서 설사가 멎지 않고 숨이 차면서 땀이 나는 경우를 치료한다고 했다. 이후 여러 실험 연구를 통해 갈근금련탕 및 갈근금련탕을 구성하는 주요 성분이 인슐린 저항성을 개선하고, 췌장 베타 세포에서의 보호 효과를 보여 항당뇨 효과를 가진다고 보고되었다<sup>10,11)</sup>. 또한 당뇨 환자에 갈근금련탕을 투약한 기존 임상 연구의 체계적 고찰 및 메타분석 결과 갈근금련탕을 경구 혈당강하제와 병용할 경우 경구혈당강하제 단독군에 비해 비하여 공복혈당 수치, 식후 2시간 혈당, 당화혈색소, 공복 인슐린 수치, 인슐린 저항성에 더욱 유의한 개선 효과가 관찰되었다<sup>12,13)</sup>. 그러나 아직까지 갈근금련탕이 골격근 세포에서 미토콘드리아 생합성이나 혈당 조절 메커니즘에 미치는 영향에 대한 연구는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 갈근금련탕을 당 대사의 핵심적인 기관인 골격근을 구성하는 C2C12 세포에 처치하여 당 대사 효과와 당 흡수 및 에너지 대사에 관여하는 단백질 발현의 변화 및 당 및 지질 산화와 당 수송에 관여하는 유전자, 미토콘드리아 생합성에 관여하는 유전자의 발현 변화를 평가했고 유의한 결과를 얻어 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 약물 시료

갈근금련탕은 동국대학교 한의학연구소로부터 한신황갈탕 엑스세립(주)한국신약, Nonsan, Korea)을 구입했다(Table 1). 한신황갈탕 엑스세립을 Dulbecco's phosphate-buffered salines (dPBS; WELGENE Inc., Gyeongsan, Korea)에 녹이고 1,500 rpm에서 2분간 원심분리한 후 상층액을 0.2 um filter (Corning Incorporated, Corning, NY, USA)로 여과시켜 시료로 사용했다. 실험에서 양성대조군 처치에 사용한 메트포민은 동국대학교 일산병원에서 제공받아 사용했다.

### 2. 세포 배양

마우스 유래 C2C12 골격근세포(CRL-1772; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco, Waltham, MA, USA) 및 1% penicillin/streptomycin mix (Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; WELGENE Inc.)으로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 환경에서 배양하였다. C2C12 세포의 분화 유도를 위해, 100% confluence가 되면 2% horse serum (Gibco)을 포함한 DMEM 배지로 바꾸어 24시간마다 배지를 교환하면서 4일간 분화시킨 후 약물을 처리했다.

### 3. 세포독성평가(cell viability)

C2C12에 대한 시료의 세포 생존능 평가는 Ez-Cytox (Daeil Lab, Seoul, Korea)를 이용하여 측정했다. C2C12 세포를 실험 전날 1×10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 96-well plate에 seeding하고, 갈근금련탕 시료를 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mg/ml를 처리해 24시간 동안 배양하였다. 이후 EZ-Cytox 10 µl를 각 well에 첨가한 후 1시간 동안 incubator에서 반응시켰다. 이후 microplate reader (Tecan Spark®, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정했다.

**Table 1.** The Composition of *Galgunhwangryunhwanggyum-tang*

Scientific name	Dosage (g)
<i>Pueraria lobata</i> Ohwi	2
<i>Coptis japonica</i> Makino	1
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	1
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	0.67

#### 4. Glucose uptake assay

C2C12 근육세포에서 glucose uptake 측정은 Shin 등<sup>14)</sup>의 방법을 보완하여 사용하였다. C2C12 세포를 멸균된 19 mm glass cover slips를 넣은 24 well plate에서  $1 \times 10^5$  cells/ml 농도로 seeding하여 분화시켰다. 분화된 C2C12 myotubes에 2.5 mM glucose를 첨가한 glucose-free DMEM (Gibco)에 갈근금련탕 1 mg/ml, 양성 대조군인 메트포민 0.75 mM을 포함하여 처리 후 12시간 incubator에서 반응시켰다. 이후 glucose-free DMEM (Gibco)에 2-[N-(7-160 nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose (2-NBDG; Invitrogen) 50 ug/ml가 포함된 배지로 교환하여 1시간 동안 반응시킨 후 배지를 제거하고 dPBS로 세척했다. Glass cover slips을 슬라이드 글라스에 옮긴 후 mounting solution (Med-Bio Ltd., Christchurch, New Zealand) 처리를 하였다. 세포에서의 2-NBDG 흡수량을 fluorescence microscopy (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)를 이용해 측정했다. 2-NBDG 흡수량 density는 Image J 소프트웨어 (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 분석 정량했다.

또한, 96 well black plate (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)에서  $2 \times 10^4$  cells/ml로 seeding하여 분화된 C2C12 myotubes에 2.5 mM glucose를 첨가한 glucose-free DMEM (Gibco)에 갈근금련탕 1 mg/ml, 양성 대조군인 인슐린(100 nM Humulin R; Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA)을 포함하여 처리 후 12시간 incubator에서 반응시켰다. 이후 glucose-free DMEM에 2-NBDG 50 ug/ml가 포함된 배지로 교환하여 1시간 동안 반응시켰다. 배지를 제거하고 dPBS로 세척한 후 well당 50 ul의 phosphate buffered saline (PBS)를 넣었다. 형광강도는 microplate reader로 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 측정했다.

#### 5. Western blot

C2C12 골격근세포를 6-well plate에서  $5 \times 10^5$  cells/ml 농도로 seeding하여 분화시킨 후 갈근금련탕 및 메트포민을 24시간 처리하였다. 이후 PBS로 2회 세척한 다음 PRO-PREPTM (iNtRON, Sungnam, Korea) 200  $\mu$ l를 첨가하여 20분간 용해(lysis)시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리했다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준화하여 protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 정량했다. 20  $\mu$ g의 단백질을 5 $\times$ sample buffer (312.5 mM

Tris-HCl, pH 6.8, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 5% sodium dodecyl sulphate [SDS], 0.05% bromophenol blue, 50% glycerol)와 섞어 98°C에서 5분 끓인 다음 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 분리했다. 전기영동을 통해 분리된 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK)으로 transfer한 후 5% skim milk가 함유된 tris-buffered saline and polysorbate 20 (TBS+0.1% Tween20) 용액으로 상온에서 1시간 동안 membrane의 blocking을 실시하였다. 이후 1차 항체를 4°C에서 overnight 반응시켰다. PBS-T로 세척한 다음 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시키고 다시 PBS-T로 세척한 후 Super Signal West Pico ECL reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 Bio-Rad ChemiDoc XRS imaging system (Bio-Rad)으로 단백질 발현 정도를 분석했다. 각 밴드의 density는 Image J 소프트웨어를 이용하여 AMPK에 대한 phosphorylation AMPK (pAMPK)의 발현 비율로 정량 분석했다.

#### 6. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) 분석

C2C12 골격근 세포에서 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase messenger RNA (mRNA) 발현량을 기준으로 glucose transporter type 4 (Slc2a4, formerly known as GLUT4), glucokinase (Gk), carnitine palmitoyltransferase IA (Cpt1a), nuclear respiratory factors 1 (Nrf1), mitochondrial transcription factor A (Tfam), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (Ppargc1a)의 mRNA 상대적 발현량을 qRT-PCR로 측정했다. C2C12 골격근 세포를 12-well plate에서  $2 \times 10^5$  cells/ml 농도로 seeding하여 분화시킨 후 갈근금련탕 및 메트포민을 24시간 처리했다. Total RNA는 Trizol (Invitrogen)를 사용하여 protocol에 따라 분리 정제했다. 분리된 1 ug의 RNA는 cDNA synthesis kit (RT-PCR premix; Bioneer, Daejeon, Korea)로 cDNA를 합성한 후 template로 사용했다. 각 시료는 LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green (Roche, Basel, Switzerland)과 각 primer (Table 2)를 사용해 LightCycler instrument (Roche 480 real time PCR system; Roche)를 통해 진행했다. PCR 증폭은 denaturation 95°C 20초, annealing 57°C 15초, extension 72°C 10초로 하여 40 cycle로 진행했다. 실험 결과는 LightCycler Software (Roche)를 통해 분석하였고 유전자의 발현량은  $2^{(-\Delta C_t)}$ 를

**Table 2.** Primer Sequences for Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction

Target	Forward	Reverse
Slc2a4 (known as GLUT4)	GGAAGGAAAAGGGCTATGCTG	TGAGGAACCGTCCAAGAATGA
Gk	TCCCTGTAAGGCACGAAGACAT	ATTGCCACCATCCATCTCA
Cpt1a	CTCAGTGGGAGCGACTCTTCA	GGCCTCTGTGGTACACGACAA
Nrf1	CCCCGAGGACACTTCTTATGATG	GGCCGTTTCCGTTTCTCCCTGTT
Ppargc1a	AGCCGTGACCACTGACAACGAG	GCTGCATGGTCTGAGTGCTAAG
Tfam	CACCCAGATGCAAAACTTTCAG	CTGCTCTTTATACTTGCTCACAG
Gadph	GACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG	ATACCAGGAAATGAGCTTGACAAA

Slc2a4: glucose transporter type 4, Gk: glucokinase, Cpt1a: carnitine palmitoyltransferase IA, Nrf1: nuclear respiratory factors 1, Tfam: mitochondrial transcription factor A, Ppargc1a: peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ , Gadph: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

구하는 방식으로 계산했다.

### 7. 통계분석

GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)을 이용해 통계분석을 했고 그래프를 시각화했다. 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타났다. 통계분석은 Kolmogorov Smirnov test로 정규성을 만족하는 경우 one way analysis of variance (ANOVA)를 시행했고 사후검정은 Dunnett's multiple comparison test를 사용했다. 정규성을 만족하지 못하는 경우 ANOVA의 비모수 검정에 해당하는 Kruskal-Wallis test를 시행한 후 사후검정으로 Dunn's test를 시행했다. 통계적 유의성은 유의수준 0.05 미만으로 검정했다.

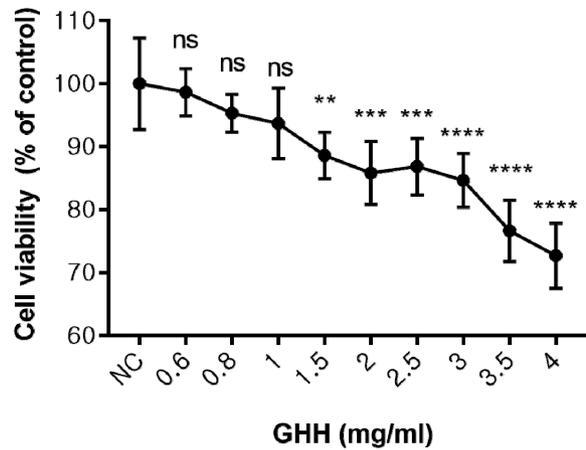
## 결과

### 1. 세포독성

갈근금련탕 엑스제 농도별로 C2C12 골격근 세포의 생존율에 미치는 영향을 비교했다. 갈근금련탕 0.6, 0.8, 1 mg/ml에서는 세포 생존율이 전체의 90% 이상으로 대조군에 비해 통계적으로 유의한 감소가 없었으며, 1.5 mg/ml 이상부터 C2C12 근육세포에 대한 독성이 나타났(Fig. 1). 이후 모든 실험에서는 세포독성을 나타내지 않는 농도 중 최대 농도인 1 mg/ml 농도의 갈근금련탕 엑스제를 처치했다.

### 2. Glucose uptake 조절 작용

약물의 당 대사 조절력을 평가하기 위해 대조군, 메트포민 처치군, 갈근금련탕 처치군에서 2-NBDG uptake 형



**Fig. 1.** Effect of variable concentration of GHH on cell viability of C2C12 cells. Data with error bar are represented as mean±standard deviation using Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 compared with the NC. 'ns' denotes no significant change. NC: normal control, GHH: *Galgunhwanggumhwangryun-tang* treatment.

광 강도를 측정했다(Fig. 2). 대조군을 기준으로 2-NBDG uptake의 상대적인 형광 강도를 비교했을 때 메트포민 처치군에서 glucose uptake가 통계적으로 유의하게 증가했으며, 갈근금련탕 처치군에서는 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 근육세포 내로의 포도당 유입이 상승하는 경향성을 보였다. 다른 방식으로 black plate에 분화된 C2C12 myotubes에 100 nM의 인슐린과 갈근금련탕 1 mg/ml를 각각 처치한 후 2-NBDG 흡수 형광강도를 측정했을 때 인슐린 처치군과 갈근금련탕 처치군 모두에서 통계적으로 유의하게 근육세포 내로의 포도당 유입이 상승했다(Fig. 3).

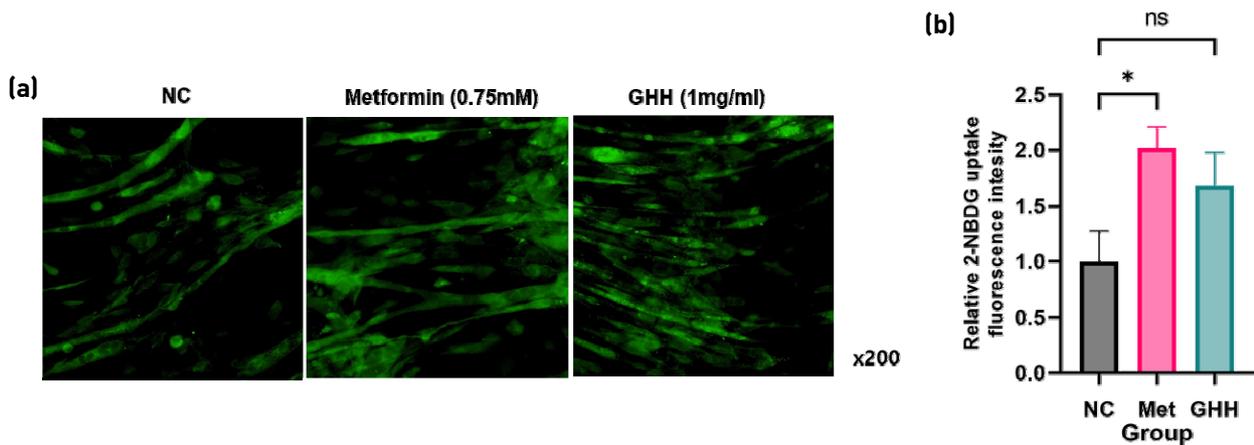


Fig. 2. Effect of GHH on glucose uptake in C2C12 myotubes. Differentiated cells were treated with metformin (0.75 mM), GHH (1 mg/ml). (a) glucose uptake was measured by the amount of 2-NBDG taken up by cells in fluorescence microscopy (x200). (b) Relative 2-NBDG uptake fluorescence intensity. Data for bar graph are represented as mean±standard deviation using Kruskal-Wallis test and Dunn's post-hoc test. All experiments were repeated twice. \*P<0.05 compared with the NC. 'ns' denotes no significant change. NC: normal control, Met: metformin treatment, GHH: *Galgunhwanggumhwangryun-tang* treatment, 2-NBDG: 2-[N-(7-160 nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose.

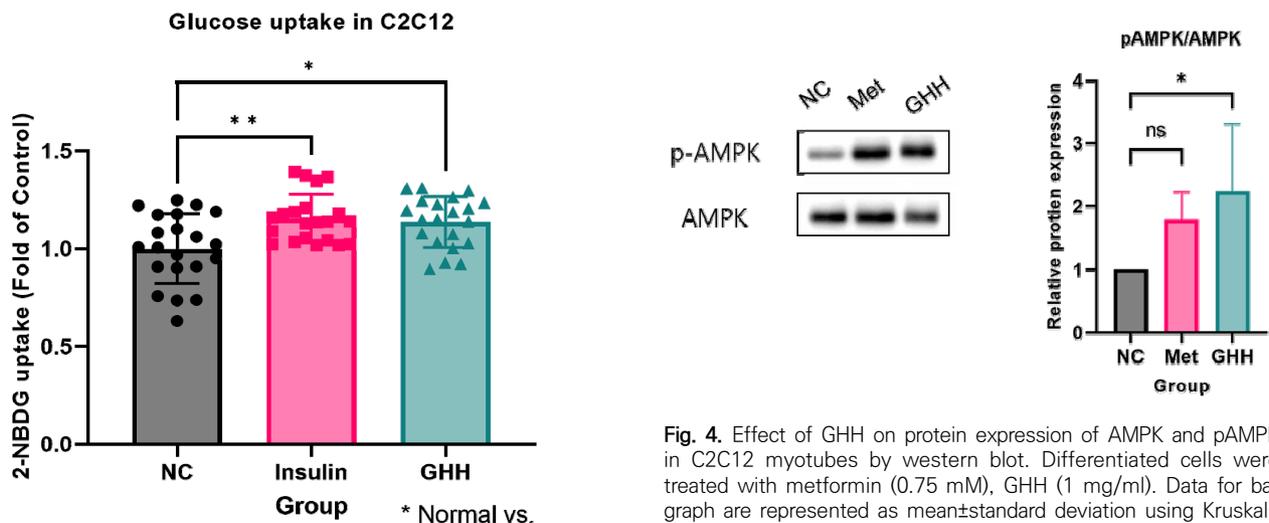


Fig. 3. Effect of GHH on glucose uptakes in C2C12 cells were observed by the amount of 2-NBDG uptake by cells. Differentiated cells were treated with insulin (100 nM), GHH (1 mg/ml). Data for bar graph are represented as mean±standard deviation using one way analysis of variance test and Dunnett's post hoc test. Each point in the bar graph indicates the value treated under the same conditions within the group. All experiments were repeated twice. \*P<0.05, \*\*P<0.01. NC: normal control, Insulin: insulin treatment, GHH: *Galgunhwanggumhwangryun-tang* treatment, 2-NBDG: 2-[N-(7-160 nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose.

### 3. AMPK 단백질 발현에 대한 작용

AMPK 단백질 발현 증가는 미토콘드리아 내에서 지방산 산화와 당 흡수를 촉진하는 역할을 한다. 갈근금련탕이 AMPK 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해

Fig. 4. Effect of GHH on protein expression of AMPK and pAMPK in C2C12 myotubes by western blot. Differentiated cells were treated with metformin (0.75 mM), GHH (1 mg/ml). Data for bar graph are represented as mean±standard deviation using Kruskal-Wallis test and Dunn's post-hoc test. All experiments were repeated twice. \*P<0.05 compared with the NC. 'ns' denotes no significant change. NC: normal control, Met: metformin treatment, GHH: *Galgunhwanggumhwangryun-tang* treatment, AMPK: adenosine monophosphate-activated protein kinase, pAMPK: phosphorylation AMPK.

western blot을 시행하여 pAMPK/AMPK를 분석한 결과 대조군에 비해 메트포민 처치군에서는 단백질 발현량이 증가했지만 통계적으로 유의하지 않았으나 갈근금련탕 처치군에서만 통계적으로 유의한 단백질 발현량 증가가 관찰되었다(Fig. 4).

#### 4. Slc2a4, Gk, Cpt1a mRNA 발현에 대한 작용

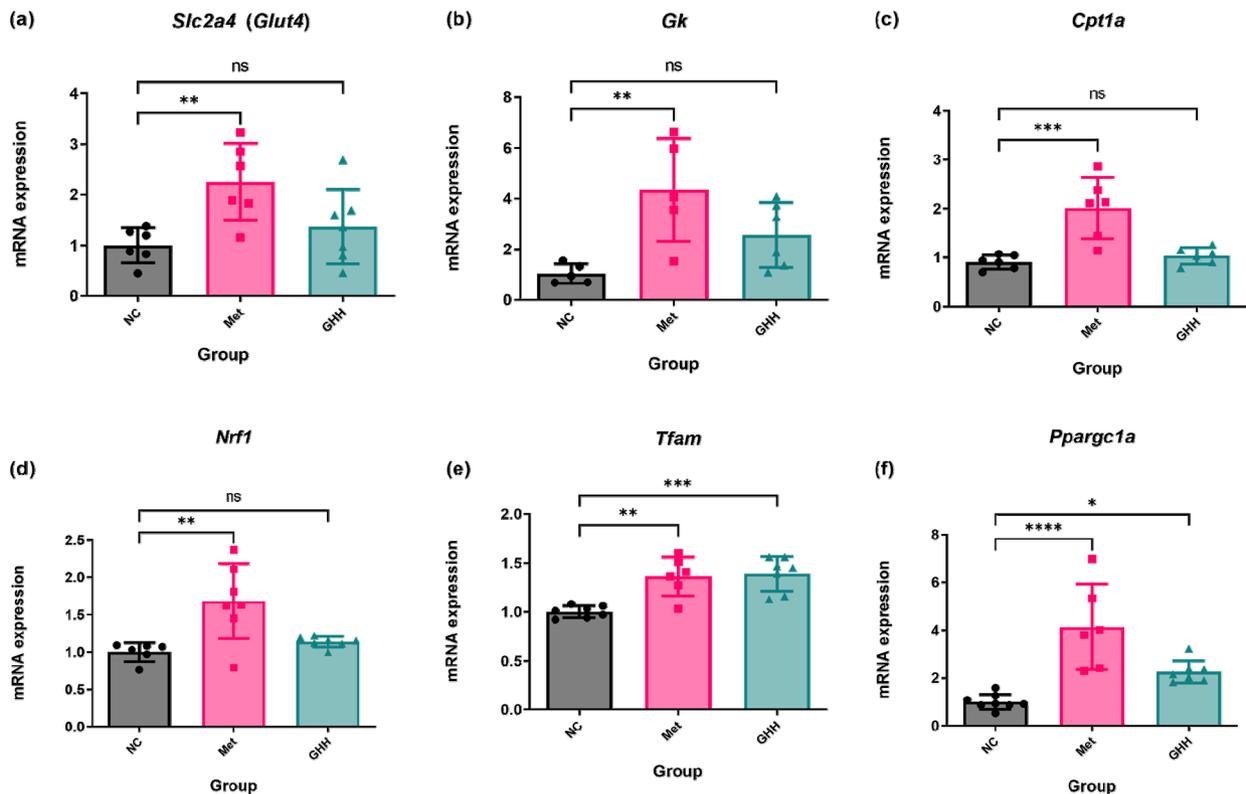
포도당 수송체인 Slc2a4 mRNA 발현량은 메트포민 처치군에서 통계적으로 유의하게 증가한 반면 갈근금련탕 처치군에서는 통계적으로 유의하지 않고 일부 세포에서 증가하는 양상을 보였다. 포도당 인산화 유전자인 Gk의 mRNA 발현량은 메트포민 처치군에서는 통계적으로 유의하게 증가했고, 갈근금련탕 처치군에서 유의하지는 않지만 증가하는 양상을 보였다(Figs. 5a, 5b). 지방산 산화 조절에 관여하는 Cpt1a의 mRNA 발현량은 갈근금련탕 처치군에서 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 5c).

#### 5. Nrf1, Tfam, Ppargc1a mRNA 발현에 대한 작용

근육세포에서 항산화 조절과 미토콘드리아 생합성에 관련된 Nrf1의 mRNA 발현량은 갈근금련탕 처치군에서 소폭 증가하는 양상을 보였으나 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지는 않았다(Fig. 5d). 근육세포의 미토콘드리아에서의 생합성에 관여하는 Tfam, Ppargc1a의 mRNA 발현량은 메트포민, 갈근금련탕 처치군 모두에서 통계적으로 유의하게 증가했다(Figs. 5e, 5f).

#### 고찰

당뇨병은 인슐린 분비의 기능이상이나 인슐린 저항성에 의해 포도당의 에너지 대사에 불균형이 발생해 고혈당



**Fig. 5.** Effect of GHH on messenger RNA expression of genes related to glucose transport (Slc2a4), glucose oxidation (Gk), fatty acid oxidation (Cpt1a), mitochondrial biogenesis (Nrf1, Tfam, Ppargc1a) in C2C12 myotubes by quantitative real time polymerase chain reaction analysis. Data for bar graph are represented as mean±standard deviation using one way analysis of variance test and Dunnet's post hoc test. Each point in the bar graph indicates the value treated under the same conditions within the group. All experiments were repeated twice. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 compared with the NC. 'ns' denotes no significant change. NC: normal control, Met: metformin treatment, GHH: *Galunhwanggumhwangryun-tang* treatment, Gk: glucokinase, Cpt1a: carnitine palmitoyltransferase IA, Nrf1: nuclear respiratory factors 1, Tfam: mitochondrial transcription factor A, Ppargc1a: peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ .

증 및 여러 합병증을 초래하는 대사질환이다. 골격근은 포도당을 이용 및 저장하는 대표적인 조직으로서 골격근에서의 포도당 이용 감소가 인슐린 저항성의 원인으로 꼽힌다. 골격근에서의 포도당 이용 감소는 지방산 산화, 포도당 산화, 미토콘드리아 기능 저하 등 다양한 기전에 의해 유발된다고 알려져 있다<sup>4)</sup>. 특히 비만과 제2형 당뇨병에서 나타나는 인슐린 저항성과 대사 장애는 근세포 내 미토콘드리아 기능 이상과 관련된다는 근거가 제안되었다<sup>15)</sup>.

갈근금련탕 및 갈근금련탕의 주요 구성 성분이 인슐린 저항성을 개선하고, 췌장 베타 세포에서의 보호효과를 보여 항당뇨 효과를 가진다는 연구가 있었고, 후향적 연구나 무작위 배정 연구를 통해 당뇨 환자에서의 혈당 개선 효과가 다수 보고되었다<sup>9,10,12,13)</sup>. 기존에 갈근금련탕이 제2형 당뇨병의 치료 효과를 나타내는 주요 성분과 메커니즘에 관한 네트워크 약리학 분석 연구에서 갈근금련탕 활성 성분 중 항당뇨 작용을 가질 것으로 예측된 성분 중 상당수가 항당뇨 효과를 보였다<sup>16)</sup>. 해당 연구에서 항당뇨 특성을 보인 성분과 대사 관련 경로와의 연관성을 예측한 결과, 세포 생합성 경로와 대사과정에서의 당 조절에 관여하는 경로와 관련이 있는 것으로 분석했다. 또한 항당뇨 효과가 보고되었던 황련의 주성분인 berberine과 항당뇨 표적에 함께 작용하여 시너지 효과를 낼 수 있는 갈근금련탕 구성 성분을 분석했을 때 갈근의 SA3, 황금의 indole, guaifenesin과 감초의 5,6,7,8-tetrahydro-4-methylquinoline, 1-(1H-pyrrol-2-yl)ethenone 성분과의 조합에서 시너지 효과를 보일 것으로 예측했다<sup>16)</sup>.

본 실험에서는 골격근을 구성하는 C2C12 세포에 갈근금련탕을 처치했을 때 세포 내로의 포도당 유입과 당 흡수에 영향을 미치는 단백질의 발현, 세포 수준에서 당 조절과 미토콘드리아 생합성 조절에 영향을 미치는 유전자의 발현을 평가했다. 세포 내로의 포도당 유입을 세포 내 2-NBDG uptake 정도로 측정했고, 형광염색을 통해 형광 intensity를 정량화했을 때 갈근금련탕 처치군에서 통계적으로 유의하지는 않지만 증가하는 경향성을 보였다. Black plate에서 시행한 2-NBDG assay 실험에서 갈근금련탕 처치군에서 통계적으로 유의하게 세포 내로의 포도당 유입이 증가되는 결과가 나타났다. 골격근에서 지방산의 산화와 당 흡수를 촉진하여 에너지 대사에서 중요한 역할을 하며 미토콘드리아의 생합성을 증가시키는 역할을 하는 AMPK 단백질의 발현도 갈근금련탕 처치로 증가했다<sup>17)</sup>.

AMPK 발현 증가는 골격근 조직에서 발현되는 당수송체인 GLUT4와 밀접한 관련이 있는데, 이번 실험에서 갈근금련탕 처치 후 GLUT4의 쥐 유전자에 해당하는 Slc2a4 유전자 발현은 통계적으로 유의하진 않았지만 증가하는 경향성을 보였고, 이는 갈근금련탕이 세포막 이동을 통해 당 흡수를 촉진할 수 있는 가능성을 시사한다. 에너지 생성에서 당 산화에 관여하는 Gk 또한 갈근금련탕 처치 후 통계적으로 유의하진 않지만 증가하는 경향성을 보였다. 반면 지방산의 산화에 관여하는 Cpt1a의 발현은 갈근금련탕 처치 후 통계적으로 유의한 변화가 나타나지 않았다. AMPK 활성은 골격근 조직에서 미토콘드리아 생합성 조절인자인 Ppargc1a, Tfam, Nrf1 증가와 관련되는데, 이번 실험에서도 갈근금련탕 처치 후 Ppargc1a, Tfam의 mRNA 발현량이 유의하게 증가했으며, Nrf1도 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다<sup>18,19)</sup>.

이번 실험 결과를 종합하면 갈근금련탕이 인슐린 저항성 조절에 관여하는 근육세포 내로의 당 흡수를 촉진하는 효과를 보였다. 잠재적 기전으로 당 흡수를 촉진하며 에너지 대사에서 중요한 역할을 하는 AMPK 단백질의 발현 증가와 미토콘드리아 생합성 및 산화적 인산화에 관여하는 유전자 발현 증가에 유의한 영향을 미친 것으로 보아 갈근금련탕이 미토콘드리아 생합성 및 에너지 대사에 관련된 유전자의 발현 증가를 통해 골격근 세포로의 당 흡수 효과를 보였다고 유추할 수 있다.

이번 연구에서 일부 지표는 제한적인 표본 수로 인해 세 그룹 비교 시 보다 보수적인 통계분석을 수행하여 다중 검정 이후 통계적으로 유의한 결과를 얻지 못하고 증가하는 경향성만 나타나는 결과를 보였다. 또한 adenosine triphosphate 생산량, 미토콘드리아 양이나 미토콘드리아 기능 조절과 관련된 여러 지표를 모두 분석하지는 못했다는 한계점이 있다. 그러나 기존에 갈근금련탕의 항당뇨 효과 기전에 대해 연구되지 않았던 골격근에서의 당 흡수 촉진 효과 및 당 대사에서 중요한 역할을 하는 단백질의 발현과 미토콘드리아 생합성과 관련된 유전자 발현을 세포 수준에서 탐색한 기초 연구로서 실험 내용을 보강하여 추후 갈근금련탕의 혈당 조절 기전 및 효능에 대한 연구를 수행하고자 한다.

## 결론

본 연구에서 갈근금련탕이 근육세포 유래 C2C12 세포에서 당흡수를 촉진하여 인슐린 저항성 개선 효과를 보였으며, 이러한 효과는 AMPK 단백질의 발현 증가와 Ppargc1a, Tfam 유전자 발현 증가로 미루어 보아 미토콘드리아 생합성 및 산화적 인산화 증가와 관련된 것으로 생각한다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 재원으로 ‘한국보건산업진흥원의 한의학혁신기술개발사업 (HF20C0020)’의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다. 한편 본 연구의 한약 시료를 제공해주신 한국한의학연구원의 양창섭 박사께 감사드립니다.

## References

1. Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, et al. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019 ; 127(S 01) : S1-S7.
2. Sangmo H. Recent perspective of metformin. *The Journal of Korean Diabetes*. 2021 ; 22 : 85-90.
3. Kim CH, Han KA, Oh HJ, Tan KE, Sothiratnam R, Tjokropawiro A, et al. Safety, tolerability, and efficacy of metformin extended-release oral antidiabetic therapy in patients with type 2 diabetes: an observational trial in Asia. *J Diabetes*. 2012 ; 4(4) : 395-406.
4. Cho EH, Koh EH, Kim MS, Park JY, Lee KU. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *Korean Diabetes Journal*. 2006 ; 30(6) : 409-15.
5. Montgomery MK, Turner N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocr Connect*. 2015 ; 4(1) : R1-R15.
6. Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest*. 2005 ; 115(12) : 3587-93.
7. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of

- action of metformin. *Diabetologia*. 2017 ; 60(9) : 1577-85.
8. Feng J, Wang X, Ye X, Ares I, Lopez-Torres B, Martínez M, et al. Mitochondria as an important target of metformin : The mechanism of action, toxic and side effects, and new therapeutic applications. *Pharmacol Res*. 2022 ; 177 : 106114.
9. Tian J, Lian F, Yu X, Cui Y, Zhao T, Cao Y, et al. The efficacy and safety of Chinese herbal decoction in type 2 diabetes : a 5-year retrospective study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016 ; 2016 : 5473015.
10. Li YM, Fan XM, Wang YM, Liang QL, Luo GA. [Therapeutic effects of gegen qinlian decoction and its mechanism of action on type 2 diabetic rats]. *Yao Xue Xue Bao*. 2013 ; 48(9) : 1415-21. Chinese.
11. Zhang CH, Xu GL, Liu YH, Rao Y, Yu RY, Zhang ZW, et al. Anti-diabetic activities of Gegen Qinlian Decoction in high-fat diet combined with streptozotocin-induced diabetic rats and in 3T3-L1 adipocytes. *Phytomedicine*. 2013 ; 20(3-4) : 221-9.
12. Shin JI, Baek JS, Cho CS. A study on the blood sugar improvement effect and safety of Galgunhwangryunhwangtang for type 2 diabetes without complications : a systemic review and meta-analysis. *Korean J Orient Int Med*. 2022 ; 43(1) : 22-40.
13. Ren L, Cheng Y, Qin F. Herbal formula Gegen-Qinlian Decoction for type 2 diabetes mellitus : a meta-analysis of randomized controlled trials. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020 ; 2020 : 3907920.
14. Shin NR, Bose S, Wang JH, Ansari A, Lim SK, Chin YW, et al. Flos Lonicera combined with metformin Ameliorates hepatosteatosis and glucose intolerance in association with gut microbiota modulation. *Front Microbiol*. 2017 ; 8 : 2271.
15. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 ; 51(10) : 2944-50.
16. Li H, Zhao L, Zhang B, Jiang Y, Wang X, Guo Y, et al. A network pharmacology approach to determine active compounds and action mechanisms of ge-ge-qin-lian decoction for treatment of type 2 diabetes. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014 ; 2014 : 495840.
17. Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug

- target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism*. 2009 ; 9(5) : 407-16.
18. Koh JH, Kim YW, Seo DY, Sohn TS. Mitochondrial TFAM as a signaling regulator between cellular organelles: a perspective on metabolic diseases. *Diabetes Metab J*. 2021 ; 45(6) : 853-65.
19. Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 ; 104(29) : 12017-22.