

Effect of Submerged Culture of *Ceriporia lacerata* Mycelium on Insulin Signaling Pathway in 3T3-L1 Cell

Eun Ji Shin^{1*}, Ji-Eun Kim², Ji-Hye Kim³, Yong Man Park¹, Sung Kyoonyoon¹, Byeong-Churl Jang³, Sam-Pin Lee² and Byoung-Cheon Kim⁴

¹Fugenbio, Seoul 06740, Korea

²Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

³Department of Medical Genetic Engineering, Keimyung University School of Medicine, Daegu 42601, Korea

⁴Worldbiotech Co., Ltd., Sangju 37272, Korea

Received January 28, 2016 / Revised March 10, 2016 / Accepted March 11, 2016

In this study, we evaluated the antidiabetic effect of submerged culture of *Ceriporia lacerata* mycelium (CL01) on glucose uptake and the expression of mRNA and protein of major signal markers of insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. After 3T3-L1 adipocytes were pre-treated by CL01 (0, 2, 10 mg/ml) for 8 hours, followed with treatment of insulin, the glucose uptake levels significantly increased by more 55.1%, 94.4% than negative control respectively ($p < 0.01$, 0.001) in a dose-dependent manner. However, in case of CL01 pre-treatment without insulin, the glucose uptake did not increase compared with insulin-treated 3T3-L1. Also we demonstrated that the protein expression levels of pIR β , pAkt, pPI3K and pAMPK and the mRNA expression levels of GLUT4 in adipocytes inducing insulin resistance increased in CL01-treated group compared with negative control. These results demonstrated that CL01 affected glucose metabolism and the protein and gene expression through insulin signaling pathway, and increased glucose uptake levels effectively. More than 90% of those who have suffered for type 2 diabetes are more likely to have from hyperinsulinemia, hypertension, obesity and etc. because of altered insulin signaling pathway. So, it is probably considered that intake of CL01 may treat type 2 diabetes by normalization of insulin signaling pathway, and it will provide useful evidences regarding a mechanism for cure of type 2 diabetes.

Key words : 3T3-L1 adipocyte, *Ceriporia lacerata*, diabetes, GLUT4, insulin signaling pathway

서 론

인체는 해당과정 및 당 신생 과정을 통해 체내 혈당을 일정하게 유지하여 정상적인 대사 활동을 하게 되는데[1] 이러한 과정이 정상적으로 이루어지지 않아 혈당조절이 제대로 유지되지 않는 것을 당뇨병이라고 한다. 당뇨병은 원인에 따라 췌장 베타세포가 인슐린을 생산하지 못해 발생하는 제 1형 당뇨병과 인슐린이 상대적으로 부족하거나 인슐린 저항성이 커서 인슐린이 제 기능을 하지 못하여 발생하는 제 2형 당뇨병으로 분류할 수 있다[2, 6]. 현재 임상에서 이용되는 경구용 혈당 강하제에는 알파 글루코시다제 저해제, 인슐린 분비를 촉진하는 설폰닐우레아계 약제, 인슐린 감수성을 촉진시키는 메트포르민 및 티아졸리디네디온계 약제 등이 있는데 이들 혈당 강하

제는 혈당 조절에만 초점이 맞춰져 있으며 저혈당, 간독성, 체중증가, 젖산 축적 등의 부작용을 유발하기 때문에 이를 최소화 하며 당뇨병을 근본적으로 치료할 수 있는 혈당 강하 소재의 개발이 필요하다[10]. 세계적으로 당뇨병 치료에 효과가 있을 것으로 보고된 천연물은 전세계적으로 약 400여 종이상으로 추정되며[12, 31] 국내에 지금까지 소개된 혈당 강하 활성을 가지는 천연물에는 인삼열매[14], 알로에[9], 담쟁이덩굴[5] 등 다양한 소재가 있고 큰느타리버섯[11], 표고버섯[25], 잎새버섯[22] 등 버섯에서 추출한 다당체가 혈당 강하 효능을 가진다는 연구가 다수 보고되고 있다.

*Ceriporia lacerata*는 구멍장이버섯목(Polyporales) 유색과 약버섯과(Phanerochaetaceae) 버섯으로 목재의 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 등을 분해하는 백색 부후균[16]으로 2003년 일본에서 처음으로 발견되어[8] *C. lacerata* P2 균사체의 크리스탈 바이올렛 제거[18], 프탈산디메틸의 생분해[20] 등에 관한 연구가 보고되었다. 의약학적 연구로 *C. lacerata* 균사체 배양액 추출물의 제1형 당뇨병 쥐에서의 항당뇨 효과[13], *C. lacerata* 균사체 배양물의 제 2형 당뇨병에서의 효과와 세포 수준에서의 기전 연구[24], *C. lacerata* 균사체 배양물의 제 2형 당뇨병 동물에서의 인슐린 신호 전달 상의 기전 연구

*Corresponding author

Tel : +82-2-3463-5409, Fax : +82-2-3463-5411

E-mail : eunji.shin@fugenbio.com

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.

[24]가 보고되었다.

기존의 GLUT4 발현 관련 인슐린 신호 전달 상의 기전 연구는 동물 실험 단계에서만 보고되어 있어 동물 실험 단계에서 누락된 바이오마커를 포함하여 세포 단계에서의 GLUT4 발현 관련 인슐린 신호 전달 상의 기전을 세밀하게 규명하고자 추가 실험을 진행하였다. *C. lacerata* 균사체 배양물이 세포 단계에서 인슐린 신호 전달 상에서의 기전을 연구하기 위하여 *C. lacerata* 균사체 배양물을 농축 건조하여 3T3-L1 세포에서 포도당 흡수, 인슐린 신호 전달 기전 상의 유관 단백질 및 mRNA 발현을 분석하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 균주는 (주)월드바이오테크(World Biotech Co., LTD., Sangju, Korea)에서 보유한 *C. lacerata* 균사체를 potato dextrose agar (PDA, Difco Co., Maryland, USA) 배지에 접종하여 25°C에서 9일 배양하여 사용하였다. *C. lacerata* 균사체를 Shin 등[24]의 방법을 이용하여 전분 4 g/l, 포도당 20 g/l, 정제수 600 ml을 혼합하여 만든 액체 배지에서 pH 5, 온도 23°C, 회전속도 300 rpm으로 10일 전배양하였다. 전배양이 종료된 균사체 배양액을 설탕 12.5 g/l, 탈지대두분 2.5 g/l, 전분 2.5 g/l, 소포제 0.125 g/l, 정제수 400 l를 혼합하여 만든 액체 배지에 옮겨 pH 5, 온도 23°C, 공기주입량 1.0 kgf/cm², 회전 속도 100 rpm으로 9일 배양하였다. 배양한 *C. lacerata* 균사체 배양물을 농축 건조 및 분쇄(CL01)하여 건조 중량을 기준으로 각 실험군의 용량에 맞게 사용하였다.

세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), trypsin-EDTA, penicillin (10,000 U/ml)/streptomycin (10,000 µg/ml) (P/S), fetal bovine serum (FBS), calf serum, bovine serum albumin (BSA), phosphate buffered saline (PBS)은 Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, Scotland)로부터 구입하여 사용하였고, GLUT4는 바이오니아(Daejeon, Korea)에서 구입하였고 그 외 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

세포 배양 및 분화

인슐린 신호 전달계 연구를 위해 마우스 지방전구세포(3T3-L1 fibroblast cell)는 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 사용하였다. 3T3-L1 세포를 3×10⁵ cell/well로 6 well plate에 분주하여 10% calf serum과 1% P/S를 첨가한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂로 조정된 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포가 100% confluent 해졌을 때 분화 유도를 위해 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM 덱사메타손, 10 µg/ml 인슐린이 첨가된 DMEM 배지로 교환한 후 2일간 배양하고 다시 10% FBS, 5

µg/ml 인슐린이 첨가된 DMEM 배지로 2일간 배양하였다. 그 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 2일 간격으로 배지를 교환하며 4일간 배양하였다[22]. 현미경으로 관찰하여 세포가 분화된 것을 확인한 후 실험에 사용하였다.

2-deoxyglucose (2-DG) uptake 측정

분화된 세포를 포도당 흡수 측정[4]에 이용하였다. 분화된 세포를 혈청을 첨가하지 않은 low-glucose DMEM 배지에 CL01을 각각 0, 2, 10 mg/ml의 농도로 녹여 8시간 배양한 후, 2% BSA가 첨가된 Krebs-Ringer-Phosphate-HEPES (KRPH) buffer (20 mM HEPES, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, pH 7.4)로 두 차례 세척하여서 plate 안에 잔존하는 glucose를 제거하였다. 그 후 2% BSA와 1 µM insulin이 첨가된 KRPH buffer로 37°C에서 20분 배양한 후 1 mM [³H]-2-deoxyglucose (1 µCi/ml)를 첨가하였고, 대조군에는 insulin을 첨가하지 않고 진행하였다. 20분 후 배지를 제거하고, 차가운 PBS를 가하여 반응을 정지시켰다. 세포를 용해시키기 위해 1% Triton X-100을 첨가한 10 mM Tris-HCl (pH 8.1)를 이용하여 세포를 모으고 95°C에서 15분 가온한 후, 4°C, 17,800× g에서 15분 원심 분리하였다. 상등액을 취하여 10 mM Tris-HCl (pH 8.1) 용액으로 20배 희석하여 Liquid scintillation counter (Tri-Carb 2900TR, PerkinElmer, CT, USA)로 radioactivity를 측정하였다.

Western blot analysis

분화된 세포에 인슐린 저항성을 유도하여 인슐린 신호 전달 관련 단백질 발현 정도를 측정하였다. 분화된 세포를 혈청을 첨가하지 않은 low-glucose DMEM 배지에서 24시간 배양하여 기아 상태로 만든 후 10% FBS가 첨가된 low-glucose DMEM 배지에서 36시간 배양하였다. 1% FBS, 1% BSA가 첨가된 low-glucose DMEM 배지에 CL01을 각각 0, 0.2, 2 mg/ml의 농도로 녹여 3 시간 처리하고 100 nM 인슐린을 첨가하여 30분 배양하였다. 차가운 PBS로 2회 세척한 후 lysis buffer 이용하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 BCA법을 이용하여 정량하였다[19]. 단백질을 SDS-PAGE를 수행하여 전기 영동하고 0.2 µM Trans-Blot Turbo mini PVDF transfer pack (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 단백질을 전이하였다. 비특이적 단백질은 0.1% Tween 20과 5% BSA를 함유한 Tri-buffered saline (TBS)에 1시간 반응시켜 blocking 하였다. 일차 항체 IR-β, pIR-β, PI3K, pPI3K, Akt, pAkt가 각각 첨가된 용액에서 1시간 30분, 이차 항체가 첨가된 용액에서 1시간 30분 반응시켜 chemiluminescence (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ, USA)으로 단백질 발현을 분석하였다[17].

RT-PCR

단백질 측정 세포와 동일하게 세포에 인슐린 저항성을 유도하고 시료를 처리하여 RT-PCR을 이용해 GLUT4 mRNA 발현을 측정하였다. 시료를 처리한 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 후 1 ml Trizol을 이용하여 total RNA를 분리하였다[26]. 추출한 RNA 2 µg는 High Capacity RNA-to-cDNA reverse transcriptase Kit를 이용하여 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였고 세포 내 포도당 수송에 특이적인 GLUT4 mRNA 발현량을 측정하기 위해 합성된 cDNA로 RT-PCR을 수행하였다. mRNA 발현은 5'-CTGTAAC TTCATTGTCGGCATGG-3', 5'-AGGCAGCTGAGATCTGGTCAAAC-3' GLUT4 primer와 5'-GTATGATCCACTCACGGCA-3', 5'-GGTCTCGCTCCTGGAAGAGG-3' GAPDG primer에 100 µM SYBER® premix Ex Taq (Takara biotechnology Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 첨가하여 94°C에서 45초, 57°C에서 30초, 72°C에서 45초의 간격으로 40회 반복하여 형광 유전자 증폭기(Termal Cycler Dice Real Time System, Takara, biotechnology Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 증폭하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균값과 표준오차로 나타났다. SPSS (Statistical Package for Social Science, version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)로 유의성을 확인하였으며, 음성대조군과 CL01 처리군 간의 비교를 실시하여 $p < 0.05$ 인 경우 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결과 및 고찰

3T3-L1 세포에서 CL01이 포도당 흡수에 미치는 영향

3T3-L1 세포에서 CL01 처리에 따른 포도당 흡수 정도를 측정하였다(Fig. 1), 분화된 3T3-L1 세포에 인슐린을 처리하지 않고 CL01을 각각 0, 2, 10 mg/ml로 처리하였을 때 포도당 흡수가 거의 증가하지 않았고, 인슐린만 처리하였을 때 포도당 흡수가 약 26.2%로 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 인슐린을 처리한 세포에 CL01을 각각 2, 10 mg/ml로 처리했을 때 인슐린만 처리하고 CL01을 처리하지 않은 군에 비해 각각 55.1%, 94.4%로 농도 의존적이며 유의적으로 증가하였다($p < 0.01, 0.001$).

3T3-L1 세포에서의 포도당 흡수는 인슐린에 의한 신호전달 과정을 통해 이루어지기 때문에 포도당 흡수 증가는 인슐린의 작용과 밀접한 관계를 나타낸다. 세포에 작용하는 인슐린 양이 증가하거나 인슐린 저항성이 감소되어 포도당 흡수 효과가 증가되게 되는데[21] 이 실험에서 CL01을 인슐린과 병용 처리한 경우 포도당 흡수 정도가 증가하였지만 CL01을 단독으로 처리하였을 경우 포도당 흡수가 증가하지 않은 것으로 보아

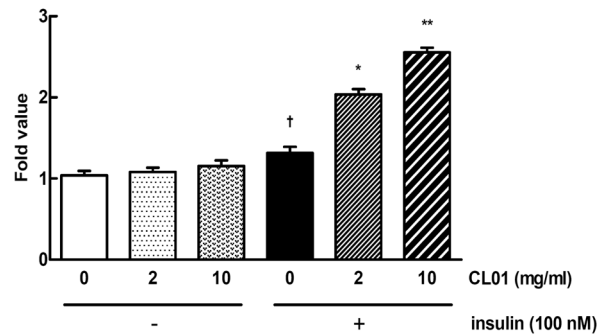


Fig. 1. Effects of CL01 on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes in the absence or presence of insulin. Data are expressed as mean ± SE, (n=3). The results were statistically analyzed by one-way ANOVA method. † Significantly different from group of absence of insulin ($p < 0.05$). *, **Significantly different from group of presence of insulin without CL01 ($p < 0.05, 0.01$).

CL01이 인슐린 저항성을 감소시키는 것으로 판단된다. CL01에 의한 포도당 흡수 메커니즘을 확인하기 위하여 인슐린 신호 전달 과정에 관여하는 단백질 및 mRNA 발현을 추가로 측정하였다.

CL01이 인슐린 신호 전달 관련 단백질 및 mRNA 발현에 미치는 영향

CL01이 3T3-L1 세포에서 인슐린 신호 전달 관련 단백질 및 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 시험 물질을 농도별로 처리한 분화 3T3-L1 세포를 채취하여 인슐린 신호 전달에 관여하는 유관 단백질 및 mRNA 발현을 측정하였다. Western blot으로 3T3-L1 세포에서의 단백질을 측정된 결과를 단백질에 대한 인산화 단백질의 상대적인 수치로 나타내었다 (Fig. 2, Fig. 3). 세포에 인슐린을 처리했을 때 이미 알려진 대로 IRβ, Akt, PI3K, AMPK 단백질의 인산화가 증가하였다. 인슐린을 처리한 세포에 CL01 2 mg/ml를 처리하였을 때 인슐린만 처리한 세포에 비해 IR, AMPK 단백질이 유의적($p < 0.05$)으로 인산화 되었고, Akt, PI3K 단백질은 CL01 저농도 및 고농도에서 유의적($p < 0.05, 0.01$)으로 인산화 되었음을 알 수 있었다. 측정된 모든 단백질은 CL01 시료의 농도 의존적으로 발현이 증가되었다. 또한 RT-PCR로 GLUT4 mRNA 발현을 측정된 결과(Fig. 4), 세포에 인슐린을 처리하였을 때 GLUT4 mRNA 발현이 유의적($p < 0.001$)으로 증가하였고, 인슐린을 처리한 세포에 CL01을 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적이고 고농도에서 유의적($p < 0.01, 0.001$)으로 발현이 증가하였다.

포도당을 세포 내로 이동시키는 인슐린 신호 전달 경로는 크게 두 가지로 보고 되어있는데[3] 하나는 포도당이 체내에 유입되어 인슐린이 분비되면 세포막의 인슐린 수용체(IR)와 결합하여 세포 내 tyrosine kinase, insulin receptor substrate 1, 2 (IRS1, IRS2), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phos-

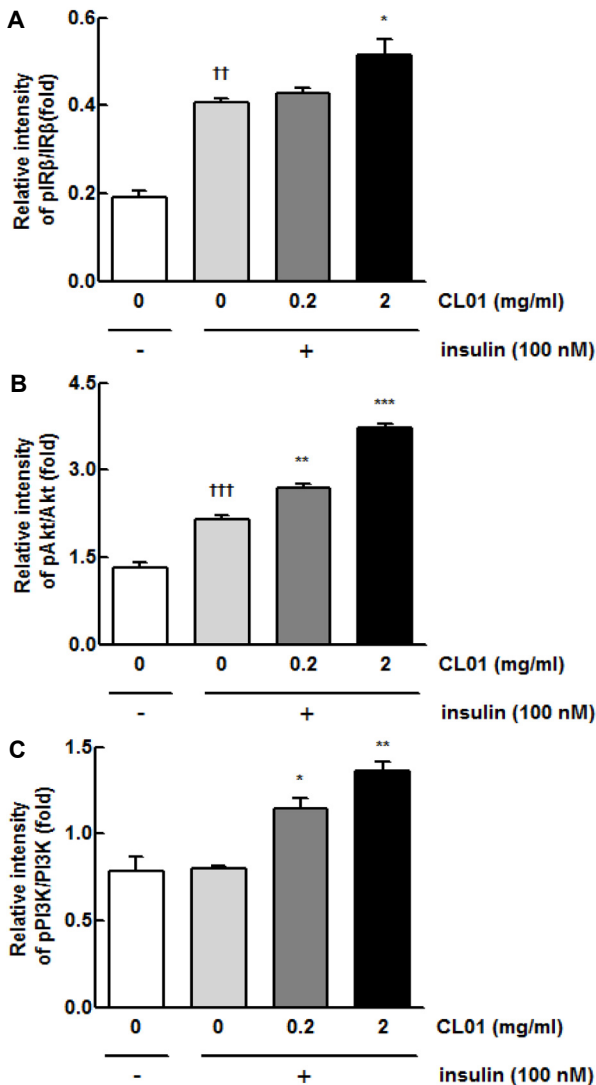


Fig. 2. Effects of CL01 on pIRβ, pAkt, pPI3K protein expression on insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes in the absence and presence of insulin. A: expression of pIRβ/IRβ, B: expression of pAkt/Akt, C: pPI3K/PI3K. Data are expressed as mean ± SE, (n=3). The results were statistically analyzed by one-way ANOVA method. ††, ††† Significantly different from group of absence of insulin ($p < 0.01, 0.001$). *, **, ***Significantly different from group of presence of insulin without CL01 ($p < 0.05, 0.01, 0.001$).

phatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, Akt를 순차적으로 인산화 시켜서 GLUT4 발현을 유도하여 혈당을 조절하는 경로이고[7, 27, 28, 30], 두 번째는 독립적으로 adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)가 인산화 되어 지방산 산화를 촉진시키고 GLUT4 발현을 유도하여 당 흡수를 촉진시키는 경로이다[15, 29]. 본 연구에서 CL01의 섭취를 통해 지방 세포에서 인슐린 전달 경로의 IR-β, PI3K, Akt 단백질을 인산화에 도움을 주고 그에 따라 GLUT4를 증가시키는

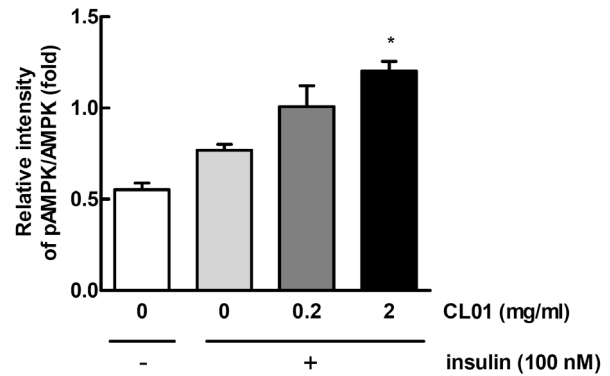


Fig. 3. Effects of CL01 on pAMPK protein expression on insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes in the absence and presence of insulin. Data are expressed as mean ± SE, (n=3). The results were statistically analyzed by one-way ANOVA method. *Significantly different from group of presence of insulin without CL01 ($p < 0.05$).

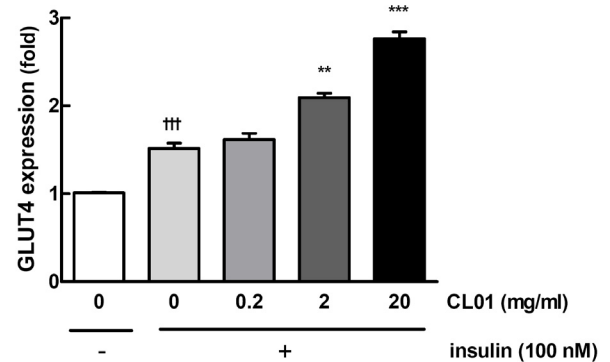


Fig. 4. Effects of CL01 on GLUT4 mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes in the absence and presence of insulin. Data are expressed as mean ± SE, (n=3). The results were statistically analyzed by one-way ANOVA method. ††† Significantly different from group of absence of insulin ($p < 0.001$). **, ***Significantly different from group of presence of insulin without CL01 ($p < 0.01, 0.001$).

것을 알 수 있었고, 추가적으로 AMPK의 인산화로 인한 GLUT4 증가 또한 확인할 수 있었다. *C. lacerata* 균사체 배양물이 제 2형 당뇨 동물에서의 인슐린 신호 전달 경로에 관여하는 단백질 및 mRNA 발현을 증가시키고 그에 따라 인슐린 저항성 회복 및 혈당 강하에 영향을 미친다는 최근 연구[23]의 기초 증거로 활용할 수 있을 것이다.

References

- Allard, M., Schonekess, B., Henning, S., English, D. and Lopaschuk, G. D. 1994. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am. J. Physiol.* **267**, H742-H750.
- Beckman, J. A., Creager, M. A. and Libby, P. 2002. Diabetes

- and atherosclerosis; *epidermiology, pathophysiology, and management*. *JAMA* **287**, 2570-2581.
3. Cartee, G. D. and Wojtaszewski, J. F. 2007. Role of Akt substrate of 160 kDa in insulin-stimulated and contraction-stimulated glucose transport. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **32**, 557-566.
 4. Chen, G., Liu, P., Pattar, G. R., Tackett, L., Bhonagiri, P., Stawbridge, A. B. and Elmendorf, J. S. 2006. Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhance insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. *Mol. Endocrinol.* **20**, 857-870.
 5. Cho, E. K. and Choi, Y. J. 2013. Antioxidant, antidiabetic and anti-inflammatory effects of extracts and fractions from *Parthenocissus tricuspidata* stems. *J. Life Sci.* **23**, 399-405.
 6. Fonseca, V. 2006. The role of basal insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Insulin* **1**, 51-60.
 7. Hayashi, T., Wojtaszewski, J. F. and Goodyear, L. J. 1997. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **273**, 1039-1051.
 8. Hiroto, S., Nitaro, M., Shuhei, K., Tsutomu, H., Kokki, S. and Ryuichiro, K. 2003. A new species, *Ceriporia lacerata*, isolated from white-rotted wood. *Mycotaxon* **86**, 335-347.
 9. Im, S. A., Kim, K. H., Shin, E. J., Do, S. G., Jo, T. H., Park, Y. I. and Lee, C. K. 2013. Effects of antidiabetic agent, aloe QDM complex, on intracellular glucose uptake. *Kor. J. Pharmacogn.* **44**, 75-82.
 10. Kang, H. J. 2007. Exercise physiologic mechanisms related to effective exercise prescription in type 2 diabetes mellitus. *Kor. J. Health Promot. Dis. Prev.* **7**, 9-16.
 11. Kang, T. S., Kang, M. S., Sung, J. M., Kang A. S., Shon, H. R. and Lee, S. Y. 2001. Effects of *Pleurotus eryngii* on the blood glucose and cholesterol in diabetic rats. *Kor. J. Mycol.* **29**, 86-90.
 12. Kim, D. H., Kang, Y. G., Kim, H. and Chae, H. J. 2004. Investigation of antidiabetic medicinal plants using an oriental medicinal database. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 125-131.
 13. Kim, J. E., Kim, H. J. and Lee, S. P. 2012. Hyperglycemic effect of submerged culture extract of *Ceriporia lacerata* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Sci. Biotechnol.* **21**, 1685-1693.
 14. Kwon, E. J., Hong, S. G., Kim, M. M, Kim, J. W., Kim, D. W. and Chung, K. T. 2014. Effects of ginseng berry water extract on the polysaccharide hydrolysis of extracellular enzymes and intracellular PTP1B and AKT1. *J. Life Sci.* **24**, 1006-1001.
 15. Lanner, J. T., Buruton, J. D., Katz, A. and Westerblad, H. 2008. Ca²⁺ and insulin-mediated glucose uptake. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 339-345.
 16. Lee, J. W., Gwak, K. S., Park, J. Y., Park, M. J., Choi, D. H., Kwon, M., and Choi, I. G. 2007. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *J. Microbiol.* **45**, 485-491.
 17. Lin-Moshier, Y. and Marchant, J. S. 2013. A rapid western blotting protocol for the *Xenopus* oocyte. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2013**, 262-265.
 18. Lin, Y., He, X., Han, G., Tian, Q. and Hu, W. 2011. Removal of crystal violet from aqueous solution using powdered mycelia biomass of *Ceriporia lacerata* P2. *J. Environ. Sci.* **23**, 2055-2062.
 19. Lorenzen, A. and Kennedy, S.,W. 1993. A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Anal. Biochem.* **214**, 346-348.
 20. Park, J. Y. 2007. Biodegradation of dimethyl phthalate by white rot fungus, *Ceriporia lacerata*. M.S. thesis. Seoul National University, Seoul, Korea.
 21. Park, K. J., Oh, Y. J., Lee, S. Y., Kim, H. S. and Ha, H. C. 2007. Anti-diabetic effect of crude polysaccharides from *Grifola frondosa* in KK-A^y diabetic mouse and 3T3-L1 adipocyte. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **39**, 330-335.
 22. Perrini, S., Natalicchio, A., Laviola, L., Belsanti, G., Montrone, C., Cignarelli, A., Minielli, V., Grano, M., De pergola, G. and Giorgino, R. 2004. Dehydroepiandrosterone stimulates glucose uptake in human and murine adipocytes by inducing GLUT1 and GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Diabetes* **53**, 41-52.
 23. Shin, E. J., Kim, J. E., Kim, J. H., Park, Y. M., Yoon, S. K., Jang, B. C., Lee, S. P. and Kim, B. C. 2015. Effect of submerged culture of *Ceriporia lacerata* mycelium on GLUT4 protein in db/db mouse. *Kor. J. Food Preserv.* **22**, 893-900.
 24. Shin, E. J., Kim, J. E., Kim, J. H., Park, Y. M., Yoon, S. K., Jang, B. C., Lee, S. P. and Kim, B. C. 2015. Hypoglycemic effect of submerged culture of *Ceriporia lacerata* mycelium. *Kor. J. Food Preserv.* **22**, 145-153.
 25. Song, J. Y., Yoon, K. J., Yoon, H. K. and Koo, S. J. 2001. Effect of β -glucan from *Lentinus edodes* and *Hordeum vulgare* on blood glucose and lipid composition in alloxan-induced diabetic mice. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **33**, 802-807.
 26. Tan, S. C. and Yiap, B. C. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, 574398.
 27. Thirone, A. C., Huang, C. and Klip, A. 2006. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 72-78.
 28. Thong, F. S., Dugani, C. B. and Klip, A. 2005. Turning signals on and off : GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology (Bethesda)* **20**, 271-281.
 29. Van-pelt, R. E., Jones, P. P., Davy, K. P., Desouza, C. A., Tanaka, H., Davy, B. M. and Seals, D. R. 1997. Regular exercise and the age-related decline in resting metabolic rate in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 3208-3212.
 30. White, M. F. 2003. Insulin signaling in health and disease. *Science* **302**, 1710-1711.
 31. Xu, M. L., Hu, J. H., Wang, L., Kim, H. S., Jin, C. W. and Cho, D. H. 2010. Antioxidant and anti-diabetes activity of extracts from *Machilus thunbergii* S. et Z. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **18**, 34-39.

초록 : *Ceriporia lacerata* 균사체 배양물이 3T3-L1 세포에서 인슐린 신호 전달에 미치는 영향

신은지^{1*} · 김지은² · 박용만¹ · 윤성균¹ · 장병철³ · 이삼빈² · 김병천⁴

(¹㈜퓨젠바이오농업회사법인, ²계명대학교 식품가공학과, ³계명대학교 의과대학, ⁴㈜월드바이오텍)

본 연구에서는 선행 연구에서 항당뇨 효능이 확인된 *Ceriporia lacerata* 균사체 배양물 건조물(CL01)을 3T3-L1 세포에 인슐린과 병용 혹은 단독 처리하여 CL01이 세포 단계에서 인슐린 신호 전달에 미치는 영향을 분석하였다. 분화된 3T3-L1 세포에서 포도당 흡수 정도를 측정한 결과, 인슐린과 CL01을 병용 처리한 군에서 농도 의존적으로 유의적으로 포도당 흡수 정도가 증가하였고, 인슐린 부재 상태에서 CL01을 처리하였을 때는 포도당 흡수 작용이 거의 일어나지 않았음을 확인하였다. 또한 분화된 세포에서 인슐린 신호 전달 관련 단백질 및 mRNA 발현을 측정 한 결과, IR β , Akt, PI3K, AMPK 단백질의 인산화가 진행되었고, GLUT4 mRNA 발현이 증가하였음을 알 수 있었다. 이들 결과를 통해 CL01이 당 대사 및 인슐린 신호 전달에 관여하는 유관 단백질 및 유전자 발현에 영향을 미치며 이에 따라 세포 내로 포도당 흡수를 증가시키는 것을 확인하였다.