

연구논문

# 근육세포 배양 계 에서 Biochanin A의 항 당뇨 효능평가

황진택\*, 김성희

## Evaluation of Anti-diabetic Effect of Biochanin A in C2C12 Myotube

Jin-Taek Hwang\* and Sung Hee Kim

접수: 2011년 10월 26일 / 게재승인: 2011년 12월 14일  
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** In this study, we evaluated the effects of Biochanin A on glucose uptake in C2C12 myotube. We found that Biochanin A significantly stimulated 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose (2-NBDG) uptake in a dose-dependent manner. In addition, AMPK and PPAR-gamma activities were markedly increased by Biochanin A in a dose-dependent manner. However, Akt, an insulin dependent signaling molecule, did not change by Biochanin A. These results suggest that Biochanin A stimulates glucose uptake via AMPK and PPAR-gamma pathways.

**Keywords:** Biochanin A, Anti-diabetes, C2C12 myotube, PPAR-gamma, AMP-activated protein kinase

### 1. 서론

Metabolic disorder는 대표적인 생활 습관성 질환으로서 당뇨, 고혈압, 비만 등을 포함하고 있다. 이들 질환 중 특히 당뇨는 크게 type 1과 type 2의 두 가지 타입으로 나뉘어져 있다. type 1은 대표적 특징으로서 췌장의 베타세포로부터 인슐린의 분비가 일어나지 않아 혈액 내의 포도당이 세포로의 유입을 할 수 없게 된다 [1]. 현재까지 알려진 발병원인으로는 유전적, 환경적, Diet 그리고 바이러스 등이 있고 계속하여 다양한 발병원인이 연구자들에 의해 밝혀지고 있다. type 2는 metabolic disorder의 질환이며 대체적으로 인슐린

은 잘 분비가 되나 인슐린 저항성이 생기며 포도당의 유입이 세포로 일어나지 않는 것을 특징으로 한다. 원인으로는 대개 운동부족과 비만 등 생활습관이 문제시 되며 발병초기에는 운동 및 식습관을 개선시키는 것만으로도 극복될 수 있다. 따라서 이러한 당뇨를 개선하기 위하여 임상적으로는 비교적 가벼운 당뇨에는 운동과 식습관개선을 권장하고 있다. 이와 더불어 최근에는 천연물로부터 유래된 약물에 비해 비교적 안전하다고 믿어지는 당뇨예방 소재 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 또한 연구를 통해서 당뇨를 예방할 수 있는 건강기능성 식품의 개발 또한 활발히 이루어지는 것을 알 수 있다.

한편, 많은 당뇨예방소재를 발굴하기위하여 세포내 타겟 바이오마커에 대한 영향 평가가 이루어지고 있는데, 당뇨예방의 바이오마커로서 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 최근에 주목받고 있는 당뇨예방바이오마커 중 하나이다. AMPK는 세포내 에너지 수준을 감지하여 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데, 운동 또는 외부의 스트레스등의 자극이 오면 AMPK는 활성화 되어 에너지를 소모하는 지방 산합성, 콜레스테롤 합성, 단백질 합성등의 경로는 차단하고, 반대로 에너지를 만들어내는 지방산 산화, 혈당흡수등의 경로는 활성화한다고 알려져 있다 [2]. 최근에 임상에서 쓰이는 약물인 메트포민 (Metformin)이 AMPK를 활성화시킨다는 사실이 알려지면서 AMPK는 항당뇨의 바이오 마커로서 각광 받게 되었다 [3]. AMPK와 더불어 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma)도 오래전부터 잘 알려진 당뇨예방의 타겟으로서 임상에서 쓰이는 글리타존 약물 계열이 작용하는 타겟이 된다 [4]. 따라서 최근 천연물로부터 AMPK와 PPAR-gamma를 타겟으로 한 당뇨예방소재의 발굴이 이루어지고 있다.

Biochanin A는 O-메틸화된 이소플라본으로서, 대두, 알팔과 짝, 땅콩, 병아리 콩 및 다른 콩과식물에 다양하게 포함

한국식품연구원  
Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea  
Tel: +82-31-780-9315, Fax: +82-31-709-9876  
e-mail: jthwang@kfri.re.kr

되어 있다. Biochanin A는 항산화, 항염 및 항암 효능을 나타낸다고 되어있다 [5,6]. 최근에 Biochanin A는 암 세포에서 세포사멸을 유도하고 항염효능을 나타낸다고 알려졌는데 RAW264.7세포에서 lipopolysaccharide에 의해 유도된 iNOS 및 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하는 것으로 확인하였다 [5].

현재까지 다양한 Biochanin A의 생리활성이 보고되었음에도 불구하고, Biochanin A의 당뇨예방효능에 대한 연구 및 작용 바이오마커에 대한 연구는 아직까지 미미하다. 이에 본 연구진은 C2C12 근육세포모형을 이용하여 Biochanin A가 당뇨의 예방 효과가 있는지, 그리고 관련되어진 바이오마커는 무엇이 있는지 규명하여 Biochanin A의 당뇨예방소재로서의 이용 가능성을 평가하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약 및 기기

비오카닌 A는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, C2C12 근육세포를 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. 세포배양을 위한 소태아혈청 (FBS)과 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 웰진 (Daegu, South Korea)에서 구입하였다. Phospho-AMPK Thr172 항체, 및 Akt는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였고,  $\beta$ -액틴 항체는 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)로부터 구입하였다. Horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose(2-NBDG)는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터 구입하였다.

### 2.2. 근육세포 분화 및 혈당 흡수능 평가

C2C12 cell이 100% confluent해졌을 때 세포를 Normal DMEM medium에 1% horse serum이 첨가된 medium으로 교체한 후 6일 동안 더 배양하였다. 완전히 근육으로 분화되었을 때 세포를 serum free-low glucose medium으로 overnight incubation한 후 2-NBDG를 24시간동안 샘플과 함께 처리 하였다. 그 후 2-NBDG uptake assay를 fluorometer의 excitation/emission 485/535에서 측정하여 혈당 흡수의 정도를 fold induction으로 나타내었다.

### 2.3. 웨스턴블롯팅

세포를 PBS로 두 번 세척하고, lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, 1  $\mu$ g/mL aprotinin, 1  $\mu$ g/mL leupeptin, and 1  $\mu$ g/mL pepstatin)를 넣고 약 5분간 얼음에 배양시킨 후 14000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상등액을 취해서 SDS 샘플완충액을 넣은 후 100°C에서 5분 동안 끓여서 단백질의 변성을 유도하였다. 그 후 10% SDS PAGE를 이용하여 단백질을 분리 한 후 나이트로셀룰로오즈막에 옮긴

후 웨스턴 블롯팅 분석을 각각의 항체를 이용하여 실시하였다.

### 2.4. PPAR-gamma 전사활성 측정

PPAR- $\gamma$  전사활성 측정하기 위하여 HEK293 (ATCC) 세포를 1  $\mu$ g의 총 DNA (300 ng PPAR- $\gamma$ 를 위한 발현벡터, 300 ng RXR $\alpha$ , PPAR-response element (PPRE)를 함유한 루시퍼라제 리포터 벡터 300 ng, 및  $\beta$ -갈락토시다제 100 ng)를 Superfect Transfection Reagent (Qiagen, 발렌시아, CA, 미국)를 이용하여 transfection하였다. 18시간 지난 후, 세포에 로지글리타존 단독 또는 비오카닌 A를 각각 24시간동안 처리하였다. 이때 로지글리타존은 양성대조군으로 사용하였다. 그 후 luciferase assay system (프로메가, 메디슨, WI, 미국)을 가지고, 마이크로플레이트 리더 (LMax II384; Molecular Devices, 콩코드, 온타리오, 캐나다)를 이용하여 측정하였다.  $\beta$ -갈락토시다제 활성을 이용하여 정규화하였다.

### 2.5. 통계처리

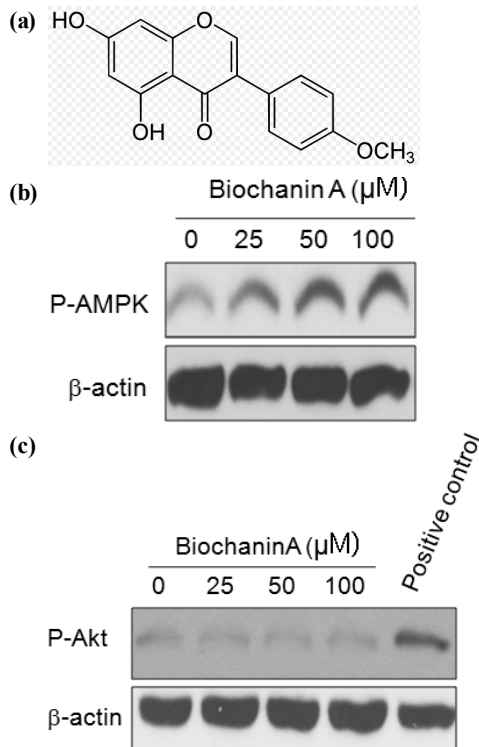
실험결과는 SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) 프로그램을 이용하여 실시하였다. 평균 $\pm$ SD로 표시하였고 각 샘플간의 통계적 유의성은 one-way ANOVA를 실시하여 다 군간의 차이는  $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test로 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Biochanin A의 인슐린 감수성 개선 신호전달활성 영향 평가

천연식물유래 활성물질들은 최근의 보고에 따르면 다양한 생리학적 효능을 나타내고 있으며 세포내 다양한 신호전달 단백질들을 조절하여 효능을 나타내고 있음이 알려져 있다 [7,8]. 이에 본 연구에서 식물유래 이소플라본인 Biochanin A의 당뇨예방 효능을 검증하기 위하여, 우선 세포 내 항 당뇨의 타겟으로 잘 알려진 AMPK의 활성에 미치는 영향을 웨스턴 블롯팅 법을 이용하여 측정하였다. C2C12세포에 Biochanin A를 각각의 농도별로 1시간 처리 한 후 AMPK의 활성을 인산화 정도로 평가하였는데, Fig. 1(b)에서 볼 수 있는 것과 같이 Biochanin A는 농도 의존적으로 AMPK의 인산화를 증가시키는 것으로 확인되었다. 최근 AMPK는 당뇨 예방 효능연구에 있어서 중요한 타겟이 되고 있는데, 이는 임상에서 쓰이는 약물인 Metformin이 AMPK단백질을 활성화 시킨다고 알려지면서 중요성이 인식되어지고 있다 [3]. 또한 천연물 유래의 각종 compound들이 AMPK를 표적으로 하여 당뇨 예방 효능을 나타낸다고 보고되어지고 있다. 최근논문에 의하면, 레드와인에 많이 포함되어 있는 Resveratrol은 AMPK를 활성화시키고, 당뇨예방을 포함한 다양한 효능을 나타낸다고 잘 알려져 있다 [9]. 또한 또 다른 연구에서 보고된 바에 의하면 Genistein은 Biochanin A와 비슷한 구조의 이소플라본으로 잘 알려져 있는데, 근육세포 배양계에서 이들의 derivatives들이 glucose uptake를 증가시킨다는 보고가 있다 [10]. 본 연구에서 Biochanin A가 AMPK를 활성화 시켰기 때문에 선행연구들의 결과와 유사한 것으로 판단되며,

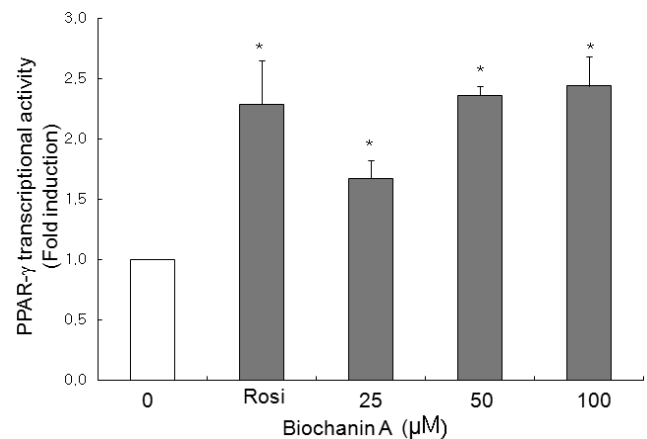
Biochanin A가 혈당을 증가시킨다면 이들 선행연구와 비슷하게 적어도 AMPK가 타겟 분자로서 관여하고 있을 것으로 추정하게 되었다.



**Fig. 1.** The effects of Biochanin A on AMPK and Akt phosphorylations in C2C12 myotube. The structure of Biochanin A (a). Cells were treated with Biochanin A for 3 h in a dose-dependent manner, and then, western blot analysis was performed with phospho-specific AMPK and Akt antibodies (b, c).

다음으로 Biochanin A의 인슐린신호전달경로에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 인슐린 의존적 신호전달 분자인 Akt의 활성화를 웨스턴 블롯팅법을 통하여 측정하였다. Fig. 1(c)에서 볼 수 있는 것과 같이 Biochanin A는 Akt의 인산화를 증가시키지 못하는 것으로 확인되었다. Glucose uptake를 증가시키는 세포내 신호전달 경로에는 크게 두 가지가 보고되었는데, 하나는 인슐린 receptor로부터 시작되어 PI3kinase/Akt를 거쳐 glucose transporter의 이동에 의해 포도당을 유입하는 경로가 있고, 이와는 독립적으로 AMPK가 AS160을 통하여 glucose transporter의 이동을 직접 관여하고, 포도당을 유입하는 경로가 있다 [11]. 본 연구에서 Biochanin A는 인슐린 신호전달 경로와는 무관하게, AMPK의 인산화를 선택적으로 증가시켜 포도당 유입을 증가시킬 수 있을 것으로 기대되었다. 그러므로 Biochanin A의 작용기전은 인슐린 신호전달과 독립적으로 AMPK를 타겟으로 하는 것을 알 수 있었다. 그러나 Biochanin A의 작용에 있어서 AMPK 활성화 가능성을 밝혀냈음에도 불구하고, 어떻게 AMPK가 활성화되는지, 그것의 명확한 upstream 또는 downstream 타겟이 무엇인지 밝혀내지 못했다. 향후 연구에서 메커니즘의 연구가 꼭 필요할 것이다.

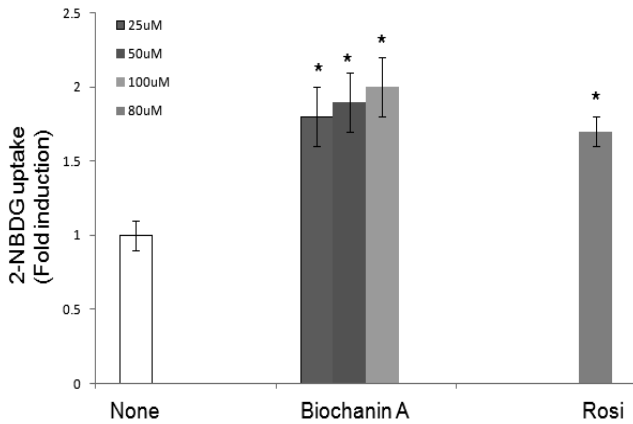
**3.2. Biochanin A의 PPAR-gamma 전사활성에 미치는 영향**  
Biochanin A의 AMPK활성증가 효과와 더불어 대표적 항 당뇨 약물 로지글리타존 계열의 타겟분자인 PPAR-gamma의 전사활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 HEK293 cell을 이용하여 PPAR관련 gene들을 transfection 후 luciferase assay를 실시하였다. Fig. 2에서 보여주듯 PPAR-gamma의 전사활성에 대한 Biochanin A의 효과역시 positive control로 쓰인 로지글리타존 수준으로 활성화 시키는 것을 관찰할 수 있었다. PPAR-gamma는 세포의 핵 수용체이며 지질대사 및 당대사를 조절하는 gene들의 발현을 증가시키는 것으로 잘 알려져 있다 [12]. 글리타존 계열의 항 당뇨제의 대표적인 타겟으로 잘 알려져 있는데, 이들은 계속하여 부작용이 보고되고 있어 많은 연구자들은 비교적 안전하다고 알려진 천연식물 소재로부터 PPAR-gamma의 agonist를 발굴하여 당뇨예방 효능을 기대하고 있다. 본 연구에서 Biochanin A는 AMPK와 더불어 PPAR-gamma의 활성화에 대한 영향도 뛰어난 것으로 확인되어, 이는 Biochanin A는 PPAR-gamma의 agonist가 될 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서 PPAR-gamma와 AMPK의 상호간의 조절에 대한 명확한 메커니즘은 찾아내지 못했다. 향후 연구에서 Biochanin A 처리 시 PPAR-gamma와 AMPK가 활성화 되는 작용기전 및 PPAR-gamma와 AMPK와의 상관관계에 대하여 연구할 필요하다.



**Fig. 2.** The effect of Biochanin A on PPAR-gamma transcriptional activity. PPAR-gamma expression vector and PPRE-luc vectors were co-transfected as described in material and methods. PPAR-gamma transcriptional activity was measured by luciferase assay system. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  vs. Control (0).

**3.3. Biochanin A의 처리가 glucose uptake에 미치는 영향**  
이상의 결과들을 토대로 Biochanin A의 직접적인 세포내 포도당 유입에 미치는 영향을 분석하기 위하여 2-NBDG assay를 실시하였다. 2-NBDG는 fluorescent derivate of glucose로서 세포 내 포도당 유입을 측정하기 위해 유용하게 사용되어지고 있다 [13]. 본 연구에서 완전히 분화된 C2C12 근육세포에 각각의 농도별 Biochanin A를 처리한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 비오카닌 A는 농도의존적으로 2-NBDG의 세포내 유입을 증가시키는 것으로 나타났다. 이

때 로지글리타존은 positive control로 사용하였다. 이로서 Biochanin A는 근육세포 내로의 포도당 유입을 유의하게 촉진할 수 있음을 알 수 있었다.



**Fig. 3.** The effect of Biochanin A on glucose uptake in C2C12 myotube. Cells were treated with Biochanin A in a dose-dependent manner, and the glucose uptake ability was evaluated using 2-NBDG uptake assay. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  vs. Control (0).

#### 4. 결론

본 연구를 통하여 다양한 식물에 함유되어 있는 이소플라본인 Biochanin A가 근육세포모델에서 당뇨예방 효능이 있는지를 평가하였다. Biochanin A는 근육세포에서 포도당의 세포내 유입을 증가시키는 것으로 확인되었고, 이는 인슐린 신호전달과는 독립적으로, AMPK의 활성을 증가시켜 효과를 나타내는 것으로 판단되었다. 또한 항 당뇨효능의 또 다른 타겟인 PPAR-gamma의 전사활성도 Biochanin A에 의해서 농도의존적으로 증가되는 것을 관찰하였다. 따라서 Biochanin A는 당뇨예방 효능이 있을 것으로 판단되며 이는 AMPK 및 PPAR-gamma의 활성을 증가시킴으로서 나타낼 것으로 사료되었으며 이는 향후 Biochanin A를 이용한 항 당뇨 기능성 식품의 개발이 가능할 것으로 예측된다.

#### 감사

이 연구는 한국식품연구원의 사업연구비 및 농림수산 식품

부 “Food Functionality Evaluation program”에서 지원 받아 수행한 연구결과로 이에 감사드립니다.

#### References

1. Lee, M. S., J. T. Hwang, S. H. Kim, S. Yoon, M. S. Kim, H. J. Yang, and D. Y. Kwon (2010) Ginsenoside Rc, an active component of *Panax ginseng*, stimulates glucose uptake in C2C12 myotubes through an AMPK-dependent mechanism. *J. Ethnopharmacol.* 127: 771-776.
2. Hardie, D. G. (2011) Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am. J. Clin. Nutr.* 93: 891S-896S.
3. Wong, A. K., J. Howie, J. R. Petrie, and C. C. Lang (2009) AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease. *Clin. Sci (Lond).* 116: 607-620.
4. Stolarczyk, M., W. Gutman, and R.A. Derlacz (2011) Nuclear receptors PPAR as a drug target in metabolic disorders. *Postepy Biochem.* 57:207-14.
5. Kole, L., B. Giri, S. K. Manna, B. Pal, and S. Ghosh (2011) Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NFkB nuclear translocation. *Eur. J. Pharmacol.* 653: 8-15.
6. Moon, Y. J., B. S. Shin, G. An, and M. E. Morris (2008) Biochanin A inhibits breast cancer tumor growth in a murine xenograft model. *Pharm. Res.* 25: 2158-2163.
7. Meinwald, J. (2011) Natural products as molecular messengers. *J. Nat. Prod.* 74: 305-309.
8. Genovese, S. and F. Epifano (2011) Auraptene: a natural biologically active compound with multiple targets. *Curr. Drug Targets* 12: 381-386.
9. Dolinsky, V. W. and J. R. Dyck (2011) Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1812: 1477-1489.
10. Lee, M. S., C. H. Kim, D. M. Hoang, B. Y. Kim, C. B. Sohn, M. R. Kim, and J. S. Ahn (2009) Genistein-derivatives from tetracera scandens stimulate glucose-uptake in L6 myotubes. *Biol. Pharm. Bull.* 32: 504-508.
11. Cartee, G. D. and J. F. Wojtaszewski (2007) Role of Akt substrate of 160 kDa in insulin-stimulated and contraction-stimulated glucose transport. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32: 557-566.
12. Cho, N. and Y. Momose (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress. *Curr. Top Med. Chem.* 8: 1483-1507.
13. Zou, C., Y. Wang, and Z. Shen (2005) 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods* 64: 207-215.