

C2C12 myotube의 산화적 손상에 대한 혼합 한약재 추출물(HME)의 Akt/FoxO3 신호 조절을 통한 보호 효과

김소영^{1#}, 최문열¹, 이은택², 추성태², 김미려^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 농업회사법인 (주)이비체

Protective Effects of Medicinal Herbal Mixture (HME) through Akt/FoxO3 Signal Regulation in Oxidative Damaged C2C12 Myotubes

So Young Kim^{1#}, Moon-Yeol Choi¹, Un Tak Lee², Sung Tae Choo², Mi Ryeo Kim^{1*}

1 : Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea
2 : Ebiche co., Ltd, Yeongheon, Gyengbuk, Korea

ABSTRACT

Objectives : In this study, we investigated the synergistic protective effects of medicinal herbal mixture (HME) including Mori Ramulus (MR), Acanthopanax Cortex (AC), Eucommiae Cortex (EC), and Black soybean (BS) in C2C12 cells, mouse myoblasts.

Methods : Effects of HME on cell viability of C2C12 myoblasts were monitored by MTT assay. Anti-atrophic activity of HME was determined in myoblasts and myotubes under oxidative stress by H₂O₂. C2C12 myoblasts were differentiated into myotubes in a medium containing 2% horse serum for 6 days. After that, we measured that expression of MyoD and myogenine, the myogenic regulatory factors, to identify the mechanism of inhibiting muscle atrophy after HME treatment. In addition, suppression of phosphorylation of Akt, FoxO3a and MARF-1, transcription factors of degradation proteins were analyzed via western blotting.

Results : As a result of MTT, HME there was no show cytotoxicity up to a concentration of 1 mg/ml. The cytoprotective effects on oxidative stressed myoblast and myotube was better in HME extract than those of MR, AC, EU, and BS, respectively. HME treatment in Myotube induced by oxidative stress after H₂O₂ treatment increased Myo D, Myogenine activation, and Akt, FoxO3a phosphorylation and decreased expression of MuRF-1. As the results, HME has synergistic effects on protection against proteolysis of C2C12 myotubes through activation of the Akt signaling pathway under oxidative stress.

Conclusions : These results suggest that HME may also be useful as a preventing and treating material for skeletal muscle atrophy caused by age-related diseases.

Key words : Sarcopenia, C2C12 cells, Medicinal herbal mixture (HME), Oxidative stress

*Corresponding author : Mi Ryeo Kim, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea.

· Tel : +82-53-770-2361

· E-mail : mrkim@dhu.ac.kr

#First author : So Young Kim, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Korea.

· Tel : +82-53-770-2241

· E-mail : un7849@naver.com

· Received : 14 June 2022

· Revised : 19 July 2022

· Accepted : 25 July 2022

I. 서론

근감소증은 골격근량, 근력 및 기능의 점진적인 손실을 특징으로 하는 상태를 말하며, 신체 장애, 삶의 질 저하 및 노인 사망의 주요 원인이다^{1,2)}. 건강한 성인의 경우 근육량은 신체의 약 42%를 차지하고 있으며, 노인의 경우 약 27%로 크게 감소한다³⁾. 근감소증의 유병률은 연령에 따라 60세 이상에서 5%에서 50%까지 다양하게 발병한다⁴⁾. 근감소증은 또한 낙상, 골절, 신체 장애 및 사망 위험을 높일 뿐만 아니라 인슐린 저항성, 당뇨병 및 심혈관 질환과 상관관계가 있다고 알려져 있다⁵⁻⁶⁾. 의료 기술의 발달로 기대 수명이 늘어남에 따라 전 세계적으로 노인인구가 급격히 증가하고 있으며, 이에 삶의 질을 개선하고 의료 비용을 절감하기 위한 근감소증 진단 도구 및 약물 개발에 대한 관심이 급증하고 있다.

산화 스트레스는 근감소증 발병의 주요 기전이며, 단백질 분해 증가, 단백질 합성 감소, 미토콘드리아 기능 장애 및 세포사멸과 관련이 있다⁷⁾. 활성 산소종 (ROS)은 세포 대사의 부산물로 생성되며, 낮은 수준의 ROS는 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자 및 인슐린과 같은 여러 신호 전달 성장 인자를 활성화하는 데 필수적으로 작용하는 반면⁸⁻⁹⁾, 과도한 ROS의 생성은 세포 항상성, 구조 및 기능에 해로운 영향을 미치고 산화 스트레스를 유발한다. 과산화수소 (H_2O_2)는 근관의 위축과 손실을 유발하며, 외인성 산화제 치료로 사용되어 고립된 골격근과 시험관 내 근관 모두에서 자유 라디칼 생성을 촉진한다¹⁰⁾.

혼합물의 구성 한약재 4가지 중 하나인 상지 (桑枝, Mori Ramulus, MR)는 뽕나무 (*Morus alba*, L)의 가지인데 예로부터 류머티즘 및 관절염, 혈압, 당뇨, 혈중 지질농도 조절에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며¹¹⁾, 동의보감에서는 서근활락약으로 간경에 들어가 풍습비통, 사지구련, 관절불리에 사용한다고 기술되어 있다¹²⁾. 생리활성 연구로는 대장염 완화 효능¹³⁾, 항비만¹⁴⁾, 항산화 활성 및 신경세포 보호 효능¹⁵⁾ 등이 보고되어 있다.

또한 오가피 (五加皮, *Acanthopanax Cortex*, AC)는 오갈피나무 (*Acanthopanax sessiliflorum* Seeman)의 줄기 껍질 또는 뿌리줄기로서, 거풍습강근골약으로 간 및 신경에 들어가 발산, 구풍, 강근골하여 신경통, 중풍, 고혈압, 당뇨병, 류마티스성 관절염 치료 등에 널리 사용되고 있다¹⁶⁾. 생리활성 연구로는 항산화 및 지질 개선¹⁷⁾, 면역 및 항암¹⁸⁾, 혈압강화 작용¹⁹⁾ 등이 보고되어 있다.

그리고 두충 (杜仲, *Eucommiae Cortex*, EC)은 두충 (*Eucommia ulmoides* Oliver)의 수피를 건조한 보양약으로 간과 신을 보하여 강근골, 안태지혈 및 강혈압 효능이 있다고 알려져 있다²⁰⁾. 또한 약리학적으로 항노화 및 항염²¹⁾ 작용과 근위축²²⁾, 골다공증²³⁾ 등의 개선에 관한 연구가 보고되어 있다.

마지막으로 검은콩인 흑두 (黑豆, Black soybean, BS)는 한의학에서 전통적으로 골다공증 예방에 사용하였으며, 항염²⁴⁾, 항산화²⁵⁾, 항비만²⁶⁾ 및 혈관기능개선²⁷⁾ 등의 효능이 보고되어 있다.

이에 본 연구에서는 한의학의 이론 중 장부론 (臟腑論)에 근거하여 간 및 근육에 효능이 있는 9가지 한약재를 선정하여 H_2O_2 로 산화적 스트레스를 유도한 C2C12 myoblast에서 스

크리닝을 한 결과, 상지, 오가피, 두충 및 흑두가 제일 우수한 효능을 보였다 (data not shown). 이에 상지 (MR), 오가피 (AC), 두충 (EC), 흑두 (BS)를 혼합하여, 혼합 추출물 (HME, herbal mixture extract)를 제조하였으며, mouse 유래 myoblast인 C2C12 세포에서 근위축 관련 단백질의 발현을 중심으로 산화 스트레스에 의한 추출물의 세포 보호 효능을 평가하였다.

II. 재료 및 실험 방법

1. 재료

1) 시료의 제조

본 실험에 사용한 MR, AC, EC, BS은 보현산 청정 약초 영농 조합법인(영천, 대한민국)에서 국내산을 구입하여 추출하였다. 단독 추출 시 MR은 500 g에 증류수 2 kg을 가하여 110℃에서 1시간 추출하였으며, 동결건조하여 분말을 얻었으며(수득율: 2.74%), AC는 200 g에 증류수 2 kg을 가하여 110℃에서 4시간 추출하고 동결건조하여 분말을 얻었다(수득율: 5.25%). 또한 EC는 껍질 200 g에 증류수 2 kg을 가하여 110℃에서 4시간 추출하였으며, 동결건조 하여 분말을 얻었으며(수득율: 5.4%), BS는 1 kg에 증류수 10 kg을 가하여 24시간 불린 후 불린 콩을 부직포에 넣어 다시 증류수 10 kg을 가한 뒤 110℃에 4시간 추출한 후 동결 건조하여 분말을 얻었다(수득율: 18.44%). 각 단일 추출물은 3차 증류수에 100 mg/ml 농도로 녹여 stock solution을 제조하였으며, 실험에 사용 시 적정 농도로 배지에 희석하여 사용하였다. HME는 MR 2 kg, AC, EC 및 BS 각 0.4 kg에 정제수 100 kg을 가하여 110℃에서 4시간 추출하여 40℃까지 자연냉각하여 여과시킨 후 동결건조하여 분말을 얻었다(수득율: 3.84%). HME의 배합 비율은 여러 배합비의 효능 실험을 통하여 최적의 배합비를 선정하였으며 (data not shown), 추출조건은 단일 추출물의 추출법과 동일하게 실시하였다. 이후 얻어진 분말은 3차 증류수에 100 mg/ml 농도로 녹여 stock solution을 제조하였으며, 실험에 사용 시 적정 농도로 배지에 희석하여 사용하였다.

2) 시약

C2C12 세포 배양을 위해 사용된 배지는 FBS (fetal bovine serum) 및 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하고 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 제품을 구입하였다. 세포 분화를 유도하기 위한 HS (horse serum) 또한 Hyclone에서 구입하였다. 세포 독성 측정 시약인 MTT (thiazoly blue tetrazolium bromid) 및 H_2O_2 는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 또한 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 덕산약품 (안산, 경기도, 한국) 제품을 사용하였으며, western blot 분석 시 사용된 lysis buffer는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 항체인 MyoD, Myogenin 및 β -actin은 Santa-Cruz

Biotechnology (CA, USA)에서 구입하였으며, FoxO3a, p-FoxO3a, Akt, p-Akt은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양 및 분화유도

본 실험에 사용된 마우스 유래 근육세포인 C2C12 cell (CRL-1772)은 ATCC (USA)에서 분양받아 사용하였으며, 배양 배지는 10% FBS와 1% penicillin을 첨가한 DMEM 배지를 배양액으로 37°C incubator (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, BB15)에서 배양하였으며, myotube로 분화 시 10%의 FBS 대신 2% HS로 변경하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 6일간 배양하였다.

2) 세포 독성 평가

C2C12 myoblast에서 HME의 세포 생존능 평가는 MTT 시약을 이용하여 측정하였다. C2C12 세포를 96-well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 배양 후 각 추출물 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1 mg/ml 농도로 24시간 동안 단독 처리 조건에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 500 µg/ml 농도로 MTT 용액을 각 well에 처리하여 37°C, 4시간 반응시켜 형성된 formazan을 DMSO로 용해시켜 ELISA microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, Multiskan skyhigh spectrophotometer)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) H₂O₂ 처리에 따른 산화 스트레스에 의한 세포 손상 보호능 측정

H₂O₂ 처리에 따른 산화적 스트레스에 의한 HME의 세포 손상 보호 효과를 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 세포 배양용 6-well plate에 해당 세포를 1×10^6 cells/well로 분주하고 48시간 동안 안정화 시킨 후 적정 농도의 각각의 추출물을 2시간 전 처리한 후 H₂O₂를 처리하였다. 24시간 배양 후, MTT 시약을 1 mg/ml 농도로 희석하여 처리한 후 37°C에서 4시간 반응시켜 형성된 formazan을 DMSO로 용해시켜 ELISA microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Western blot 분석

C2C12 myotube에서 HME의 근감소 및 근손상 회복 작용점을 규명하기 위해 단백질 분석을 수행하였다. 60 mm dish에 2.5×10^6 cells/well으로 분주한 cell을 80% 되게 배양한 후 6일간 분화한 뒤 lysis buffer (20 uM Tris pH 7.2, 20 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin)와 protease inhibitor를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 그 후 세포를 분쇄하여 13,000 rpm, 4°C에서 30분간

원심분리한 뒤 상층액을 취한 후 Bradford 법을 이용하여 단백질량을 정량하였다. 정량된 단백질 25 µg의 동일한 양의 단백질을 변성시키고 12% SDS-PAGE에서 전기영동으로 단백질을 분리한 후, PVDF membrane으로 이동시킨 뒤 membrane을 TBST로 용해한 5% BSA로 1시간 동안 blocking을 실시하였다. 연이어 MyoD, Myogenin (1:1000, dilution), FoxO3a, p-FoxO3a, Akt, p-Akt (1:1000, dilution) 및 β-actin (1:3000, dilution)의 항체들을 각각 처리하여 overnight 동안 4°C에서 반응시켰다. TBST로 세척한 후 1차 항체에 알맞은 2차 항체로 실온에서 1시간 동안 처리하여 다시 TBST 세척 후 ECL detection 시약 (super signal west pico plus chemiluminescent substrate, Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH)으로 처리 후 Chemidoc system (UVITEC cambridge, Massachusetts, USA, alliance)을 이용해 western band를 확인하였으며, image J 프로그램을 사용하여 정량하였다.

5) 통계 처리

본 연구의 모든 실험 결과는 SPSS statistics 27을 이용하여 산출되었다. 각 군 간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였다. 군 간의 차이는 Duncan's multiple range test에 $P < 0.05$ 이상의 수준에서 사후 검정을 실시하였으며, mean ± SD로 표시하였다.

III. 결 과

1. HME가 C2C12 myoblast의 세포 독성에 미치는 영향

C2C12 myoblast에서 HME가 세포 독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1 mg/ml 농도 별로 처리한 결과 1 mg/ml 농도까지 세포 독성은 나타나지 않았다. 따라서 HME 농도를 1 mg/ml 농도 이하로 선정하여 실험하였다 (Figure 1).

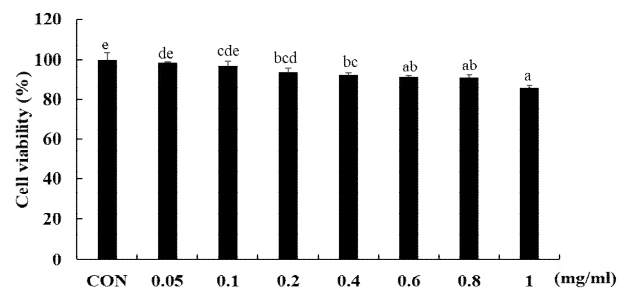


Figure 1. Effect of HME on cell viability in C2C12 myoblasts. Cell were treated with the various concentrations of HME for 24h. The Results are values are mean ± S.D.(n=3), Different letters indicated a significant difference by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

2. HME가 H₂O₂로 산화스트레스 유도된 C2C12 myoblast의 세포 보호에 미치는 영향

C2C12 myoblast에서 HME 0.1, 0.2 및 0.4 mg/ml 농도로 처리 시 각 78.43±4.97, 78.11±1.81 및 92.75±16.66% 로 세포 생존율이 증가함으로써, H₂O₂ 처리 시 감소된 세포 생존율이 HME 처리로 농도 의존적 증가를 보였다 (Figure 2-a).

또한 0.1 mg/ml 농도에서 MR, EC, AC, BS 단일 추출물과 HME 0.1 mg/ml 농도에서 세포 보호능 비교 결과 HME에서 제일 우수한 세포보호능이 나타났으므로, 각 추출물들의 시너지 효과가 있는 것으로 사료된다 (Figure 2-b).

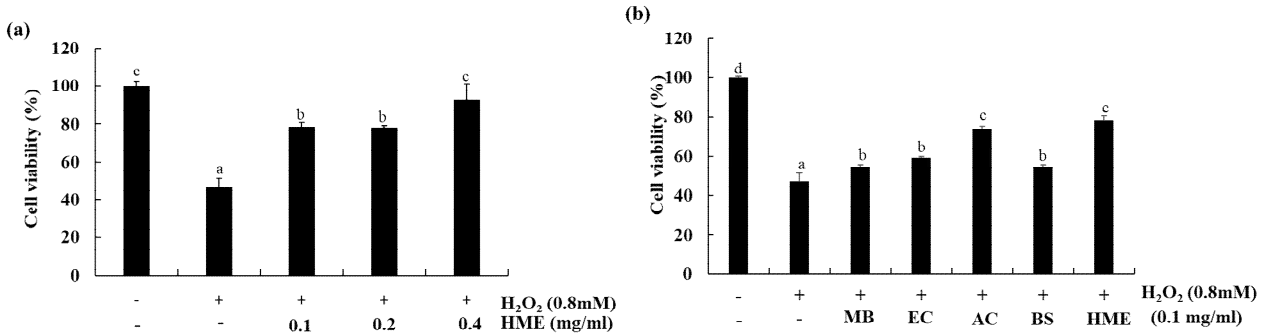


Figure 2. Cell protective effects of HME on H₂O₂-induced in C2C12 myoblasts. (a) : Protective effects of HME in C2C12 myoblast against H₂O₂-induced cytotoxicity. (b) : Comparison of the cytoprotective effect of candidate substances in H₂O₂-induced C2C12 myoblast. The Results are values are mean± S.D.(n=3). Different letters indicated a significant difference by Duncan's multiple range test at p(0.05).

3. H₂O₂로 산화스트레스 유도된 C2C12 myotube에서 HME가 세포 보호효과에 미치는 영향

C2C12 myotube에서의 실험 결과, H₂O₂ 1.8 mM 농도에서 대조군에 비해 65.98±2.16%의 생존률로 측정되었고, HME 0.1, 0.2 및 0.4 mg/ml 농도로 처리 시 각 127.46±16.90, 103.48±2.09 및 99.67±3.05%로 H₂O₂ 단독 처리하였을 때 감소된 생존률이 HME 처리 시 비록 농도 의존적이지 않으나

산화적 스트레스에 의한 생존을 저하를 억제한다는 것을 확인하였다 (Figure 3-a). 또한 0.1 mg/ml 농도에서 MR, AC, EC, BS 단일 추출물과 HME의 효력 비교 결과, HME에서 제일 우수한 세포 보호능이 나타났으므로, 각 추출물들의 시너지 효과가 있음이 확인되었다 (Figure 3-b).

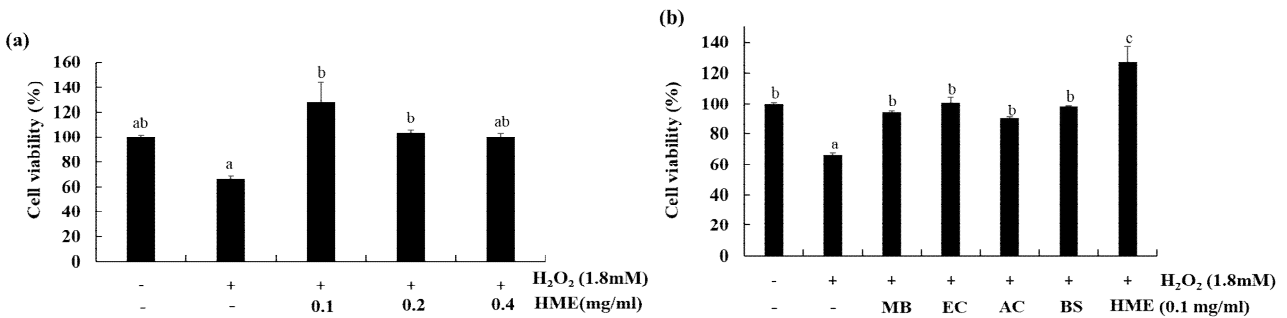


Figure 3. Cell protective effects of HME on H₂O₂-induced in C2C12 myotubes. (a) : Protective effects of HME in C2C12 myotube against H₂O₂-induced cytotoxicity. (b) : Comparison of the cytoprotective effect of candidate substances in H₂O₂-induced C2C12 myotube. The Results are values are mean± S.D.(n=3). Different letters indicated a significant difference by Duncan's multiple range test at p(0.05).

4. H₂O₂로 산화스트레스 유도된 C2C12 myotube에서 HME가 근분화 관련인자에 미치는 영향

C2C12 myotube에서의 실험 결과, H₂O₂ 1.8 mM 농도에서 대조군에 비해 65.98±2.16%의 생존률로 측정되었고, HME 0.1, 0.2 및 0.4 mg/ml 농도로 처리 시 각 127.46±16.90, 103.48±2.09 및 99.67±3.05%로 H₂O₂ 단독 처리하였을 때 감소된 생존률이 HME 처리 시 비록 농도 의존적이지 않으나

산화적 스트레스에 의한 생존을 저하를 억제한다는 것을 확인하였다 (Figure 3-a). 또한 0.1 mg/ml 농도에서 MR, AC, EC, BS 단일 추출물과 HME의 효력 비교 결과, HME에서 제일 우수한 세포 보호능이 나타났으므로, 각 추출물들의 시너지 효과가 있음이 확인되었다 (Figure 3-b).

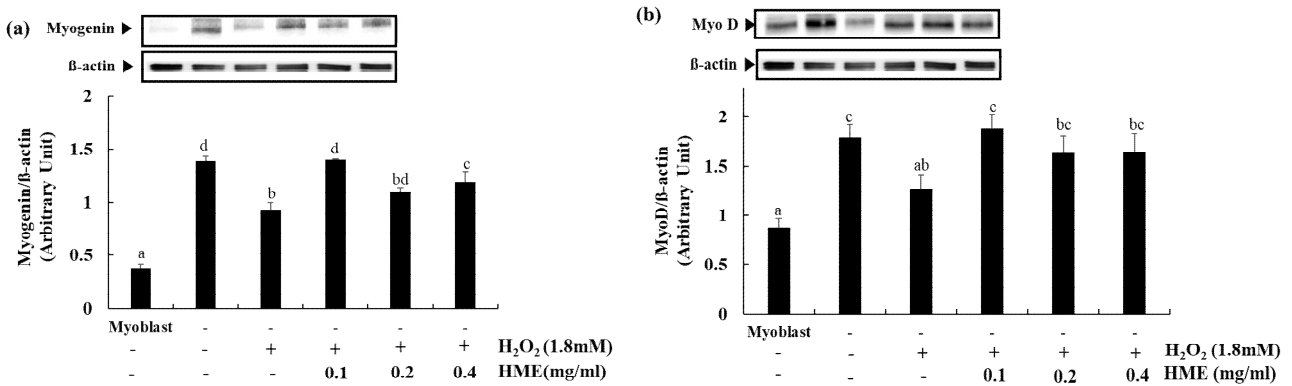


Figure 4. Effects of HME on the protein expression levels of myogenin and MyoD in H₂O₂-induced C2C12 myotubes. (a) : The relative expression of myogenin/β-actin was quantified by densitometry analyses. (b) : The relative expression of myoD/β-actin was quantified by densitometry analyses. The Results are values are mean ± S.D.(n=3), Different letters indicated a significant difference by Duncan's multiple range test at p<0.05.

5. H₂O₂로 산화스트레스 유도된 C2C12 myotube에서 HME가 근위축 관련인자에 미치는 영향

H₂O₂로 산화스트레스 유도된 C2C12 myotube에서 HME 처리가 근위축 관련 인자에 미치는 영향을 확인하기 위해 Akt, p-Akt, p-FoxO3a, FoxO3a 및 MuRF-1 단백질 발현을 확인하였다. 근육 형성과 재생에 관여하는 중요한 동화작용 체계인 insulin-like growth factor 1/PI3K/Akt 신호전달경로를 확인하기 위해 Akt 발현량 분석 결과, H₂O₂ 처리 시 Akt의 발현량이 유의적으로 감소 되었으며, HME 처리 시 H₂O₂ 처리군에 비해 유의적으로 증가한 것을 확인하였다 (Figure 5-a). 또한 근위축 과정에서 MuRF-1의 전사 활성 증가는 FoxO3a의 활

성화 증가에 의하여 이루어지기 때문에, H₂O₂ 처리에 따른 FoxO3a 발현의 변화를 조사한 결과, H₂O₂ 처리 시 FoxO3a의 인산화가 감소되었음을 확인하였으며, HME 처리 시 H₂O₂ 처리에 비해 유의적으로 FoxO3a의 인산화를 증가시킨 것을 확인하였다 (Figure 5-b). MuRF-1 발현을 조사한 결과, H₂O₂ 처리 시 MuRF-1의 발현을 유의적으로 증가시켰으며, HME 처리에 의해 각 농도에서 유의적으로 발현량을 감소시켰다 (Figure 5-c).

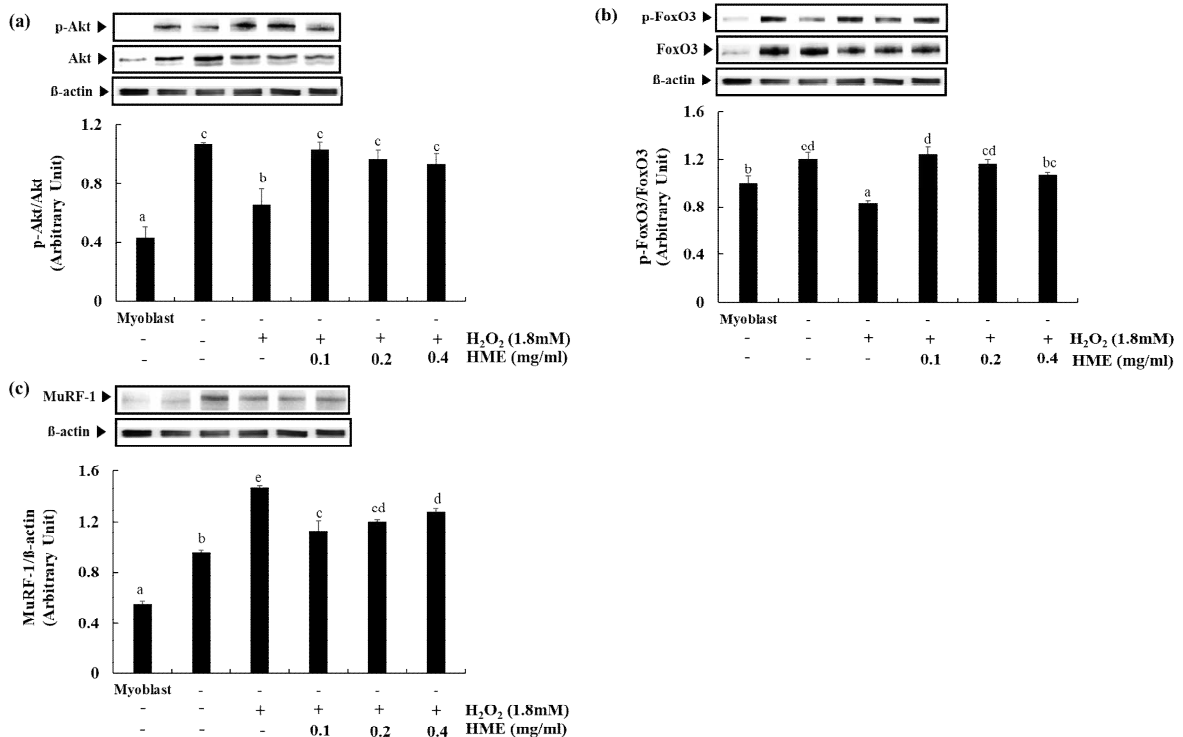


Figure 5. Effects of HME on the protein expression levels of MuRF-1, p-FoxO3a and p-Akt in H₂O₂-induced C2C12 myotubes. (a) : The relative expression of p-Akt/Akt was quantified by densitometry analyses. (b) : The relative expression of p-FoxO3a/FoxO3a was quantified by densitometry analyses. (c) : The relative expression of MuRF-1/β-actin was quantified by densitometry analyses. The Results are values are mean ± S.D.(n=3), Different letters indicated a significant difference by Duncan's multiple range test at p<0.05.

IV. 고찰

건강한 골격근은 미토콘드리아 대사 과정을 통해 적당한 수준의 활성산소 (ROS)를 지속적으로 생성하여 근육세포 증식 및 분화, 미토콘드리아 기능, 칼슘 신호 전달 및 포도당 흡수를 조절하는 등의 전반적인 세포 기능에 영향을 미친다²⁸⁻³⁰. 그러나 근육세포에서 과도한 ROS 생성은 피로를 유발하고 세포에 대한 산화적 손상을 증가시켜 근수축 기능에 영향을 줄 수 있으며, 이는 근이영양증 및 근감소증 등 질병의 발병 원인으로 알려져 있다³¹. 따라서 항산화제를 적용하여 ROS 유발 산화 스트레스를 억제함으로써 산화 환원 시스템을 조절하는 것은 근육 기능을 보존하기 위한 유망한 접근법으로 간주되고 있다. 이에 본 연구에서는 근육에 효능이 있다고 알려진 한약재인 MR, AC, EC 및 BS가 포함된 HME가 H₂O₂로 산화스트레스 유도된 C2C12 세포에서 근세포 보호 효능 및 근위축 예방 효과를 확인하기 위해 실험을 진행하였다.

마우스 유래 근육세포인 C2C12 세포에서 H₂O₂로 유도 시킨 산화스트레스 모델은 미토콘드리아의 기능적 손상을 유도하여 근모세포 손상을 유발할 수 있기에 다양한 산화스트레스에 대한 시험관 내 모델로 널리 사용되고 있다³². H₂O₂는 DNA 손상을 활성화하고 C2C12 근세포에서 ROS 생성을 유도함으로써 세포자멸사를 유도한다는 것이 보고되어 있다³³. 본 연구에서도 마찬가지로 C2C12 myoblast 및 myotube에서 H₂O₂ 처리 시 세포 생존을 저하를 유발한 것을 확인하였다. 그러나 HME 전처리 시 myoblast 및 myotube 모두에서 H₂O₂에 의해 유도된 세포 생존을 저하를 억제 및 회복시키는 것으로 확인되었다.

골격근 분화는 MyoD, Myf5, myogenin, MRF4 등의 근육 조절 인자(MRF)로 알려진 전사 인자 계열에 의해 조절된다³⁴. MyoD는 증식하는 myoblast에서 발현되어 세포 주기 조절 및 근모세포 분화 유도를 촉진한다고 보고되어 있으며, myogenin은 분화 후기에 관여하여 근관 형성을 유도한다고 알려져 있다³⁵⁻³⁶. 따라서 본 연구에서 H₂O₂로 유발된 C2C12 세포 손상 모델에서 HME가 근세포 분화인자에 미치는 영향을 알아보기 위해 myogenin 및 MyoD 단백질 발현여부를 확인하였다. 그 결과, figure 4.에 나타난 바와 같이 myoblast에서 myotube에 비해 myogenin 및 MyoD 단백질 발현이 감소되었음을 확인하였으며, H₂O₂ 단독처리군에 비해 HME 전처리군에서 단백질 증가를 확인하였다.

골격근에서 단백질 합성은 근육 형성과 재생에 관여하는 중요한 동화작용 체계인 insulin-like growth factor 1/PI3K/Akt 신호전달경로를 통하여 단백질 합성이 촉진되며, Akt는 serine/threonine kinase로 Akt1/PKB α , Akt2/PKB β , 및 Akt3/PKB γ 세가지 아형이 밝혀져 있으며 모두 골격근에서 발현된다³⁷. 근육에서 IGF-1, 인슐린, 기타 성장인자조절, 근육 수축에 의한 근세포 포도당 수송 및 글리코겐 합성, 근육 비대 조절은 주로 Akt에 의해 매개된다³⁸⁻⁴⁰. 따라서 Akt 활성화는 골격근에서 단백질 분해 및 단백질 합성과 직접적으로 연관된다⁴¹. 즉, Akt에 의해 이들이 인산화되면 불활성화되어 핵 밖의 세포질로 이동하게 되고, Akt의 활성화가 감소되면, FOXO가 핵에서 활성화되어 atrogen-1과 MuRF-1의 발현을 증가시켜 단백질을 분해한다. Akt 발현량 분석 결과, H₂O₂ 처리 시 Akt의 발현량이 유의적으로 감소되었으며, 혼합추출물

처리 시 H₂O₂ 처리군에 비해 유의적으로 증가한 것을 확인하였다 (Figure 5-a).

골격근에서 단백질 분해는 ubiquitin-proteasome 경로의 활성화를 통해 이루어지며 ubiquitin-proteasome 경로는 ubiquitin-activating enzymes (E1), ubiquitin-conjugating enzymes (E2) 및 ubiquitin ligases (E3)라는 효소들이 매개하여 표적 단백질과 ubiquitin의 공유결합을 유발시킴으로서 단백질 분해 개시를 유도한다⁴². 특히 골격근에서 특이적으로 발현되는 E3 ligase인 MAFbx/atrogen-1 및 MuRF-1은 근위축을 유발하는 다양한 조건에서 증가하여 세포주기를 억제하며, 근육 특이적인 유전자 발현을 증가시킨다⁴³. 따라서 MuRF-1 발현을 조사한 결과, H₂O₂ 처리 시 MuRF-1의 발현을 유의적으로 증가시켰으며, HME 처리에 의해 각 농도에서 유의적으로 발현량을 감소시켰다. 또한 근위축 과정에서 MuRF-1의 전사 활성 증가는 FoxO3a의 인산화 증가에 의하여 이루어지기 때문에⁴⁴, H₂O₂ 처리에 따른 FoxO3a 발현의 변화를 조사한 결과, H₂O₂ 처리 시 FoxO3a의 인산화가 감소되었음을 확인하였다 (Figure 5-b). 또한 HME 처리 시 H₂O₂ 처리군에 비해 유의적으로 FoxO3a의 인산화가 증가한 것을 확인하였다. 따라서 H₂O₂에 의해 근위축이 유발된 C2C12세포에서 HME처리는 Akt 및 FoxO3a 인산화를 통해, MuRF-1 발현을 억제시킴으로써, 근위축 보호 효능을 나타내는 것으로 사료 된다.

V. 결론

본 연구에서는 HME 처리가 H₂O₂로 산화스트레스 유도된 C2C12 세포에서 산화스트레스에 대한 근세포 보호 효능 및 근위축 예방 효과를 확인하기 위해 실험을 진행하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. C2C12 myoblast에서 HME 처리 시 세포 독성은 1 mg/ml 농도까지 나타나지 않았으며, H₂O₂로 산화스트레스 유도된 C2C12 myoblast에서 HME 처리시 농도 의존적으로 세포 보호 효능이 나타났다.
2. H₂O₂로 산화스트레스 유도된 C2C12 myotube에서 HME 처리시 농도 의존적으로 세포 보호 효능이 나타나지 않았으나, 산화적 스트레스에 의한 생존을 저하를 억제한다는 것을 확인하였다.
3. C2C12 myoblast 및 myotube 모두에서 단일 추출물 처리군 보다 HME 처리에서 산화적 스트레스에 의한 세포 보호 효능이 더 우수하게 나타났으므로, 각 추출물의 시너지 효능이 있는 것으로 사료된다.
4. H₂O₂로 산화스트레스 유도된 C2C12 myotube에서 HME 처리가 근분화 인자인 myogenin 및 myoD의 발현량이 H₂O₂ 단독 처리군에 비해 유의적으로 증가하였다.

5. H₂O₂로 산화스트레스 유도된 C2C12 myotube에서 HME 처리가 근육 재생 또는 근위축 관련 인자인 Akt, p-Akt, p-FoxO3a, FoxO3a 및 MuRF-1 단백질 발현 확인 결과, HME 처리 시 H₂O₂ 단독 처리군에 비해 p-Akt 및 p-FoxO3a 발현을 유의적으로 증가시켰으며, MuRF-1 발현은 유의적으로 억제시켰다.

따라서 H₂O₂에 의해 근위축이 유발된 C2C12세포에서 HME 처리는 Akt 및 FoxO3a의 인산화를 통해 MuRF-1 발현을 억제하여 단백질 분해를 억제시킴으로써, 근위축 보호 효능을 나타내는 것으로 사료 된다.

감사의 글

이 논문은 중소벤처기업부 지역주력산업육성사업(R&D) (No.S2934141)과 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었습니다(No. 2021R1A2C201471711).

References

- Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J. Nutr.* 1997 ; 127(5) : 990-1.
- Dao T, Kirk B, Phu S, Vogrin S, Duque G. Prevalence of sarcopenia and its association with antirheumatic drugs in middle-aged and older adults with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Calcif Tissue Int.* 2021 ; 109(5) : 475-89.
- Lee RC, Wang ZM, Heymsfield SB. Skeletal muscle mass and aging: Regional and whole-body measurement methods. *Can. J. Appl. Physiol.* 2001 ; 26 : 102-22.
- Papadopoulou SK. Sarcopenia: A contemporary health problem among older adult populations. *Nutrients.* 2020 ; 12(5) : 1293.
- Pereira RA, Cordeiro AC, Avesani CM, Carrero JJ, Lindholm B, Amparo FC, Amodeo C, Cuppari L, Kamimura MA. Sarcopenia in chronic kidney disease on conservative therapy: Prevalence and association with mortality. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2015 ; 30 : 1718-25.
- Lai S, Muscaritoli M, Andreozzi P, Sgreccia A, De LS, Mazzaferro S, Mitterhofer AP, Pasquali M, Protopapa P, Spagnoli A, Amabile MI, Molino A. Sarcopenia and cardiovascular risk indices in patients with chronic kidney disease on conservative and replacement therapy. *Nutrition.* 2019 ; 62 : 108-14.
- Meng SJ, Yu LJ. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int. J. Mol. Sci.* 2010 ; 7 : 1509-26.
- Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2005 ; 41 : 1272-81.
- Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. 1997 Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1997 ; 272 : 217-21.
- Scicchitano BM, Pelosi L, Sica G, Musarò A. The physiopathologic role of oxidative stress in skeletal muscle. *Mech. Aging Dev.* 2018 ; 170 : 37-44.
- Jang YJ, Leem HH, Jeon YH, Lee DH, Choi SW. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from morus root bark. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015 ; 44(7) : 1090-9.
- Hur J, Donguibogam, Donguehak Institute, Ryogang Pub. Co., Seoul, Korea, 1994 : 2803-5.
- Cui X, Ahn EJ, Kim EJ. Anti-colitis effects of mulberry root bark and mulberry twig extracts in high protein diet fed mice. *J East Asian Soc Diet Life.* 2018 ; 30(1) : 47-55.
- Park JE, Lee GH, Kim JH, Choi SW, Kim EJ. Anti-obesity effect of Ramulus mori extracts and stilbenes in high fat diet-fed C57BL/6J mouse. *J Nutr Health.* 2020 ; 53(6) : 570-82.
- You SH, Jang MR, Kim GH. Antioxidant activity and neuroprotective effect of root bark of *Morus alba* L. extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2018 ; 47(5) : 519-27.
- Kim SK, Kim YG, Lee MK, Han JS, Lee JH, Lee HY. Comparison of biological activity according to extracting solvents four acanthopanax root bark. *Korean J Med Crop Sci.* 2000 ; 8 : 21-8.
- Park YS. Antioxidant effects and improvement of lipid metabolism of *Acanthopanax* cortex water extract in rats fed high fat diet. *J East Asian Soc Diet Life.* 2010 ; 20(1) : 37-45.
- Rho YH, Lee GS, Kim CJ, Jeon BG, Jeong HW. Experimental effects of *Acanthopanax* Cortex extract on the immunity, anti-cancer and obesity in mice. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2005 ; 19(2) : 389-97.
- Ko ST, Kim SY, Lim DY. A study on the hypotensive action of acanthopanax extract in rabbit. *J Pharm Investig.* 1978 ; 8(1) : 106-16.
- Seo BI, Jung KY. Easy to understand herbal medicine. 2nd. Gyeongsan ; Daegu haany university publishing department, 2010 : 415-6.
- Choi DH, Kim MR, Kim MY, Kim HH, Park SY.

- Studies on antioxidant, anti-inflammatory and whitening effects of oriental herbal extracts (mix) including *Eucommiae cortex*. *J Soc Cosmet Sci, Korea*. 2019 ; 45(1) : 37-47.
22. Cho JH, Kim KS, Cha JD, Lee HS, Choi H, Jung HS, Sohn NW, Sohn YJ. Effect of *Eucommiae cortex* on hind limb muscle atrophy of sciatic nerve transected Rats. *J Physiol & Pathol Korean Med*. 2008 ; 22(6), 1454-61.
 23. Choi HS. The efficacy of *Cynomorii herba* and *Eucommiae cortex* on treatment of osteoporosis in ovariectomized rats. *Kor. J. Herbology*. 2008 ; 23(2) : 19-24.
 24. Widowati W, Prahastuti S, Ekayanti NLW, Munshy UZ, Kusuma HSW, Wibowo S HB, Amalia A, Widodo WS, Rizal R. Anti-inflammation assay of black soybean extract and its compounds on lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cell. *J Phys Conf Ser*. 2019 ; 1374(1) : 1-10.
 25. Kim SH, Kwon TW, Lee YS, Choung MG, Moon GS. A major antioxidative components and comparison of antioxidative activities in black soybean. *Kor J Food Sci Technol*. 2005 ; 37(1) : 73-7.
 26. Kim H., Kim JN, Han SN, Nam JH, Na HN, Ha TJ. Black soybean anthocyanins inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *J. nutres*. 2012 ; 32(10) : 770-7.
 27. Yamashita Y, Nakamura A, Nanba F, Saito S, Toda T, Nakagawa J, Ashida H. Black soybean improves vascular function and blood pressure: A randomized, placebo controlled, crossover trial in humans. *Nutrients*. 2020 ; 12(9) : 1-14.
 28. Barbieri E, Sestili P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct*. 2012 ; doi:10.1155/2012/982794.
 29. Musaro A, Fulle S, Fano G. Oxidative stress and muscle homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 ; 13(3) : 236-42.
 30. Powers SK, Talbert EE, Adhietty PJ. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol*. 2011 ; 589(9) : 2129-38.
 31. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008 ; 88 : 1243-76.
 32. Siu PM, Wang Y, Always SE. Apoptotic signaling induced by H₂O₂-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. *Life Sci*. 2009 ; 84 : 468-81.
 33. Park C, Choi SH, Jeong JW, Han MH, Lee H, Hong SH, Kim GY, Moon SK, Choi YH. Honokiol ameliorates oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis of c2c12 myoblasts by ROS generation and mitochondrial pathway. *Anim Cells Syst*. 2020 ; 24(1) : 60-8.
 34. Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CPJ. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002 ; 18: 747-83.
 35. Ishibashi J, Perry RL, Asakura A, Rudnicki MA. MyoD induces myogenic differentiation through cooperation of its NH₂-and COOH-terminal regions. *J Cell Biol*. 2005 ; 171(3) : 471-82.
 36. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 ; 4(2) : 1-17.
 37. Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, Alessi DR. Activation of protein kinase B β and γ isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B α . *Biochem J*. 1998 ; 331(1) : 299-308.
 38. Bouzakri K, Zachrisson A, Al-Khalili L, Zhang BB, Koistinen HA, Krook A, Zierath JR. siRNA-based gene silencing reveals specialized roles of IRS-1/Akt2 and IRS-2/Akt1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Cell Metab*. 2006 ; 4 : 89-96.
 39. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB III, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*. 2001 ; 292 : 1728-31.
 40. Sakamoto K, Arnolds DE, Fujii N, Kramer HF, Hirshman MF, Goodyear LJ. Role of Akt2 in contraction-stimulated cell signaling and glucose uptake in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 ; 291 : 1031-7.
 41. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Yancopoulos Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol*. 2001 ; 3(11) : 1014-19.
 42. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980 ; 77 : 1783-86.
 43. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 ; 307(6) : 469-84.
 44. Mallinson JE, Constantin TD, Sidaway J, Westwood FR, Greenhaff PL. Blunted Akt/FOXO signalling and activation of genes controlling atrophy and fuel use in statin myopathy. *J Physiol*. 2009 ; 587(1) : 219-30.