

## Ethanol Extract of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. Reduces AICAR-induced Muscle Atrophy in C2C12 Myotubes

Young-Soon Kang<sup>1</sup>, Cheol Park<sup>2</sup>, Min-Ho Han<sup>1</sup>, Su-Hyun Hong<sup>1</sup>, Hye-Jin Hwang<sup>3,4</sup>, Byung Woo Kim<sup>3,5</sup>, Cheol Min Kim<sup>6</sup> and Yung Hyun Choi<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Donggeui University College of Korean Medicine, Busan 614-052, Korea

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences & Human Ecology, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

<sup>3</sup>Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

<sup>4</sup>Department of Food and Nutrition, College of Natural Sciences & Human Ecology, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

<sup>5</sup>Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Sciences & Human Ecology, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

<sup>6</sup>Department of Biochemistry, Busan National University College of Medicine, Yangsan 626-870, Korea

Received October 13, 2014 / Revised October 25, 2014 / Accepted October 28, 2014

Muscle atrophy, known as a sarcopenia, is defined as a loss of muscle mass resulting from a reduction in the muscle fiber area or density due to a decrease in muscle protein synthesis and an increase in protein breakdown. *Schisandrae fructus* (SF) extract of the fruits of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon has been used as a tonic in traditional medicine for thousands of years. Although a great deal of work has been carried out on the therapeutic potential of SF, its pharmacological mechanisms of action in muscle diseases actions remain unclear. In the present study, we investigated the inhibitory effects of SF ethanol extracts on the production of muscle atrophy factors in C2C12 myotubes stimulated with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleotide (AICAR), an AMP-activated kinase (AMPK) activator, and sought to determine the underlying mechanisms of action. AICAR upregulated atrophy-related ubiquitin ligase muscle RING finger-1 (MuRF-1) and stimulated the levels of the forkhead box O3a (FoxO3a) transcription factor in the C2C12 myotubes. SF supplementation effectively and concentration-dependently counteracted AICAR-induced muscle cell atrophy and reversed the increased expression of MuRF-1 and FoxO3a. Our study demonstrates that SF can reverse the muscle cell atrophy caused by AICAR through regulation of the AMPK and FoxO3a signaling pathways, followed by inhibition of MuRF-1.

**Key words** : AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleotide), FoxO3a (forkhead box O3a), muscle atrophy, MuRF-1 (muscle RING finger-1), *Schisandrae Fructus*

### 서 론

노화 과정은 우리 신체를 구성하는 모든 기관이 시간이 흐르면서 나타나는 자연스러운 퇴화 과정이다. 이러한 신체의 퇴행성에는 노화에 의한 근위축(muscle atrophy; sarcopenia) 또한 중요한 인자로 고려되고 있으며, 근위축은 근육을 지배하는 신경의 손상이나 장기간의 불용성 상태에서 근육의 절대적인 양과 근력이 감소되는 현상을 포함한다[18, 20]. 근위축은 정확한 진단이나 원인의 규명이 어려워 완전한 치료가 이루어지지 않으며, 진행을 늦추어주는 약물 효과만 연구되고 있는 상황이다. 노화에 따른 근위축에는 근육 물질대사의 부족에 따

른 산화적 손상 및 영양 부족 현상 등에 의한 근육 손상이 동반되는데, 이는 근육 단백질의 분해 증가와 합성의 감소를 야기한다[8, 22]. 한편 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 세포 내 에너지 상태를 감지하며 골격근에서 지방산 대사를 조절하는 중요한 효소이며, 활성화된 AMPK는 정상적인 에너지 균형을 회복시키기 위해 다양한 대사과정의 경로를 조절하는 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 AMPK 활성화제는 근육세포 내 ATP 농도의 감소를 야기시켜 에너지 부족 상황 유도에 의한 인위적인 근위축 상황을 초래하는 모델 약물로 사용할 수 있다[3, 17, 21].

낙엽성의 덩굴성 관목인 오미자[*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon]의 열매(*Schisandrae Fructus*) 부분은 대한민국, 중국, 일본 및 러시아를 포함한 아시아 국가에서 중금속 해독, 중추신경계 보호, 교감신경계와 내분비계 및 면역계 교란 억제, 호흡기와 심혈관계 및 위장관계의 보호, 죽상동맥경화증, 혈당 조절 및 근육 긴장증 해소 등의 다양한 질환의 치료 목적으로 오랫동안 사용되어 왔다[12, 14]. 최근 연구에 의하면 오미자는 항당뇨, 항염증 및 항암활성 등의 효능도 가지며[6, 9,

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

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.

11, 15, 16, 25, 26], K<sup>+</sup> 채널의 활성을 통하여 평활근세포 이완 효능을 가지고 있음이 밝혀졌다[4]. 아울러, 오미자의 lignan 계열 생리활성 물질들이 myosin light chain의 활성 저해를 통하여 평활근세포의 섬유화를 억제시킨다는 연구가 보고된 바 있어[5], 오미자의 근기능 강화 효능 가능성이 제시된 바 있다. 그러나 노화성 근위축 관련 오미자의 효능 연구는 거의 수행된 바 없기에, 본 연구에서는 AMPK 활성화인자인 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR)를 이용한 인위적 근위축 *in vitro* 모델계를 구축하고, 오미자 에탄올 추출물의 근위축 억제 효능의 여부를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약 및 항체

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), bovine serum (FBS), horse serum (HS), penicillin/streptomycin (PS) 등 세포배양관련 시약은 WELGENE (Daegu, Korea)에서 구입하였고, AICAR와 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. AMPK, phospho-AMPK, forkhead box O3a (FOXO3a), phospho-FOXO3a, myogenin-1 및 actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, myosin heavy chain 항체는 Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, IA, USA)에서 구입하였다. 그리고 각 1차 항체에 해당하는 2차 항체들은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였으며, 기타 언급되지 않은 시약들은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.

#### 오미자 추출물의 준비

본 연구에 사용된 오미자 열매는 2013년 경상북도 문경시 지역에서 채취한 것을 사용하였으며, 채취 후 -20°C에 보관하였다. 준비된 오미자 열매를 동결 건조한 후, 균질화하여 20% 에탄올 용액에 24시간 동안 침전시킨 후 여과하여 rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R-144, BÜCHI Labortechnik, Flawil, Switzerland)를 이용하여 농축시켰다. 농축 분말 (SF)은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 50 mg/ml 농도로 희석하여 stock solution으로 만든 후, 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

#### 세포 배양 및 분화 유도

American Type Culture Collection (Manassa, VA, USA)에서 구입한 C2C12 근원세포는 10% FBS와 100 unit/ml PS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, 2-3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다. 분화 유도를 위하여 C2C12 세포(360×10<sup>3</sup>/ml)를 6 well plate에 분

주하고 2일 뒤 새로운 배지로 교환한 후, 1일 뒤 2% HS, 100 unit/ml PS가 함유된 DMEM 배지(분화배지)를 사용하여 한번 세척한 뒤 배지를 교체하여 주었다.

#### MTT assay를 이용한 세포 생존능 측정

SF 및 AICAR의 C2C12 세포에 대한 독성 효과를 측정하기 위하여 SF와 AICAR가 단독 또는 복합처리된 조건에서 배양된 세포를 함유하는 6 well plate의 well 당 MTT 시약을 0.5 mg/ml로 희석하여 200 µl씩 분주하고 37°C에서 2시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 2 ml씩 각 well에 분주하여 생성된 formazan을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 ELISA microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 실험의 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였다.

#### RNA의 분리 및 reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR)

전사 수준에서 muscle RING finger-1 (MuRF-1)의 발현 변화를 조사하기 위하여 준비된 세포를 수거하여 Tryzol® Reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 ONE-STEP RT-PCR PreMix kit (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 PCR을 실시하기 위하여 RNA 1 µg에 ONE-STEP RT-PCR PreMix 8 µl, primers (Table 1) 2 µl를 혼합한 후 45°C에서 30분 반응시켜 cDNA 합성을 합성하였다. 그리고 denaturation을 위해 94°C에서 30초, annealing을 위해 52~55°C에서 30초 및 extension을 위해 72°C에서 30초 조건으로 30 cycle을 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하여 수행하였다. PCR 반응 산물을 1.5% agarose를 이용하여 100 V에서 20분간 전기 영동하여 분리한 후, ethidium bromide (EtBr) 염색을 통하여 발현의 정도를 비교하였다.

#### 단백질의 분리와 Western blot analysis

번역 수준에서 해당 유전자들의 발현 변화 조사를 위해 준비된 세포를 250 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM ethylene diaminetetra acetic acid, 1% NP-40 와 0.1 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, protease inhibitors를 함유하는 lysis buffer를 사용하여 용해시켰다. 세포 용해액을 13,000

Table 1. Oligonucleotides for RT-PCR used in this study

Target	5' - 3'	Sequence
MuRF-1	Forward	GAT GTG CAA GGA ACA CGA A
	Reverse	CCT TCA CCT GGT GGC TAT TC
GAPDH	Forward	GTC ATC ATC TCC GCC CCT TCT GC
	Reverse	GAT GCC TGC TC ACC ACC TTC TTG

mg으로 4°C에서 30분간 원심 분리하여 잔해 물질을 제거하였다. 분리된 단백질들의 농도를 측정 후, 동량의 단백질들을 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 분리하고 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 각각의 membrane을 적정 항체 및 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Corp.) 용액을 이용하여 단백질들의 발현 변화를 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**C2C12 근원세포(myoblast)의 근관세포(myotube)로의 분화**

오미자 추출물이 근위축 회복능을 가지는지의 여부를 조사하기 위하여 C2C12 근원세포를 근관세포로의 분화를 유도하였다. 본 연구에 사용된 골격근 기원 C2C12 근원세포는 매우 빠르게 증식하며 분화 유도 시 더 이상 증식하지 않고 근육세포의 특징을 가지게 된다. 따라서 C2C12 세포를 근위축 모델로 사용하기 위해서는 근관세포로의 분화유도가 필수적이기 때문에 2% HS가 첨가된 배지로 분화를 유도하여 근관세포 상태가 되도록 하였다[19, 24]. Fig. 1A에 나타난 바와 같이, 근원세포의 근관세포로 길게 신장된 형태적 변화의 관찰을 통하여 분화 유도의 정도를 파악한 후, 분화 여부의 직접적인 증거를 제시하여 위하여 대표적인 두 가지 골격근 분화 유도 마크 유전자(myosin heavy chain 및 myogenin) [7, 10]의 발현 여부를 조사하였다. 이를 위한 Western blot 분석의 결과, Fig. 1B에 나타난 바와 같이 분화 시간의 경과에 따라 myosin heavy chain 및 myogenin의 발현이 분화 유도 시간 의존적으

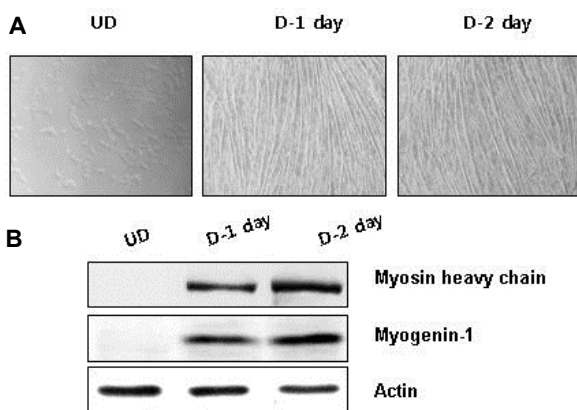


Fig. 1. Differentiation induction of mouse skeletal C2C12 myoblasts. (A) C2C12 myoblasts were incubated with 2% HS to induce myotube differentiation for different day periods, and representative photographs are shown (UD, undifferentiation; D, differentiation). (B) Total proteins were isolated and used to assess the Western blot analysis of myosin heavy chain and myogenin. Actin was used as an internal control for Western blot assay.

로 증가하였음을 확인하였으며, 이는 형태적 변화의 결과와 아울러 C2C12 근원세포가 근관세포로 분화가 적절히 유도되었음을 의미하는 결과이다.

**AMPK 활성화에 의한 C2C12 근관세포의 근위축 유도**

AMPK는 AMP가 증가되는 스트레스 상황에서 활성화되어 세포 내 에너지인 ATP 생산을 촉진시키는 효소이며, AICAR는 세포 내에서 AMP와 유사 구조를 가지는 ZMP의 생산을 촉진시킴으로써 AMPK의 인산화를 증가시키는 AMPK 활성화인자로서 인위적 근위축 유도인자로서 활용될 수 있다[3, 17, 21]. 따라서 본 연구에서도 AICAR가 근관세포로 분화된 C2C12 세포에서 근위축을 유발할 수 있는지의 가능성을 먼저 조사하였다. Fig. 2A의 형태적 변화 결과에서 알 수 있듯이, AICAR 처리 농도의 증가에 따라 근관세포의 굵기가 더 가늘어지는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 세포독성에 따른 결과가 아님을 MTT assay 결과로서 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

한편 ubiquitin-proteasome 경로는 골격근 단백질의 분해를 일으키는 가장 중요한 경로로서, ubiquitin-activating enzyme (E1)과 conjugating enzymes (E2s) 및 ligases (E3s)라는 효소들이 매개하여 분해가 될 표적 단백질과 ubiquitin의 공유 결합 및 단백질 분해 개시를 유도한다. 그중, E3 중 하나인 MuRF-1은 AICAR 처리에 따른 근관세포의 단백질 분해를 촉진시켜 근 위축을 유도하는 핵심 인자이므로, 근위축 유도 표적 인자로 사용될 수 있다[1, 2]. 따라서 AICAR 처리에 따른 MuRF-1의 전사활성 증가 여부를 mRNA 발현 수준으로 조사한 결과, AICAR 처리 농도 의존적으로 MuRF-1 mRNA의 발

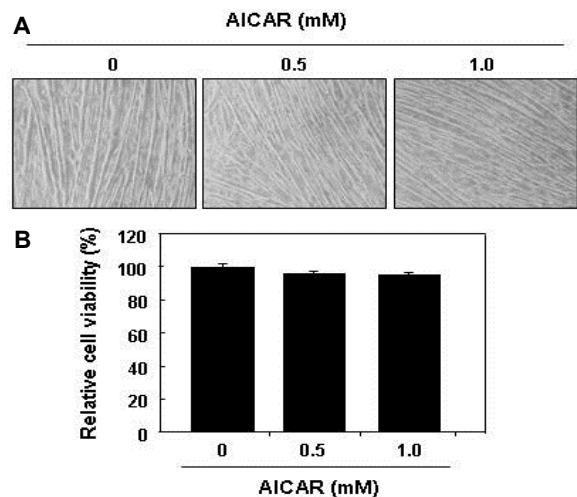


Fig. 2. Induction of atrophic responses by AICAR treatment in C2C12 myotubes. (A) C2C12 myotubes at 4 days of differentiation were treated with the indicated concentrations of AICAR for 24 hr and then assessed for morphological changes. (B) Cell viability was assessed using an MTT reduction assay. Data are expressed as mean ± SD of three independent experiments.

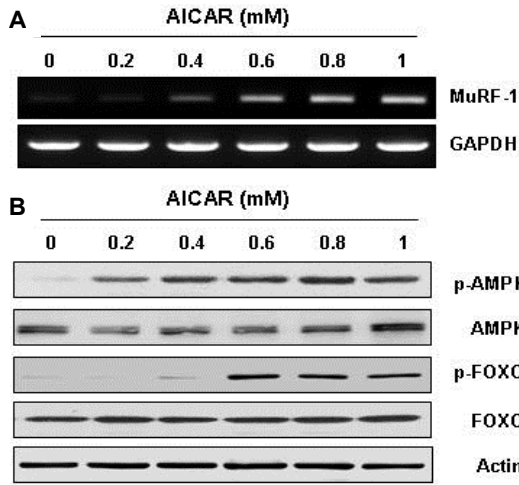


Fig. 3. Induction of MuRF-1 and activation of FoxO3a by AICAR treatment in C2C12 myotubes. (A) Total RNA was prepared from cells grown under the same conditions as in Fig. 2 for RT-PCR analysis of MuRF-1 gene expression. The amplified PCR products were run on 1.5% agarose gels and visualized by EtBr staining. (B) Total cellular proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes, and detected with the indicated antibodies using an ECL detection system. Glyceraldehyde-3'-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and actin were used as internal controls for the RT-PCR and Western blot assays, respectively.

현이 매우 증가하였다(Fig. 3A). 또한 근위축 과정에서 MuRF-1의 전사 활성 증가는 FoxO3a의 활성화 증가에 의하여 이루어지기 때문에[13, 23], AICAR 처리에 따른 FoxO3a 발현의 변화를 조사한 결과, FoxO3a의 총 단백질 발현에는 AICAR가 큰 영향을 미치지 못하였으나, FoxO3a의 인산화 정도는 AICAR 처리 농도 의존적으로 증가되었음을 확인하였다(Fig. 3B). 이러한 현상이 AICAR 처리에 따른 AMPK의 활성화에 의한 것임은 AICAR 처리에 따른 AMPK의 인산화의 증가로 재확인할 수 있었다. 이는 AMPK 활성 증가를 통하여 C2C12 세포의 근위축이 유도되었으며, 본 연구의 조건이 근위축 모델로서의 사용이 적절함을 보여주는 결과이다.

**C2C12 근관세포에서 AICAR에 의해 유도된 근위축에 미치는 SF의 영향**

다음은 상기에서 설정된 AICAR 유도 근위축 모델에서 SF의 영향, 즉 SF의 근위축 억제 효능 여부를 조사하였다. 이를 위하여 C2C12 근관세포의 AICAR 처리에 따른 근위축 연관 형태적 변화에 미치는 SF의 영향을 먼저 세포독성이 없는 조건의 설정(Fig. 4A) 하에서 관찰한 결과, SF 전처리군과 비교하여 AICAR 단독 처리군에서 의해 근관세포의 길이가 다소 가늘어져 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 4B).

형태적 변화 수준에서 관찰된 SF의 근위축 억제 가능성을

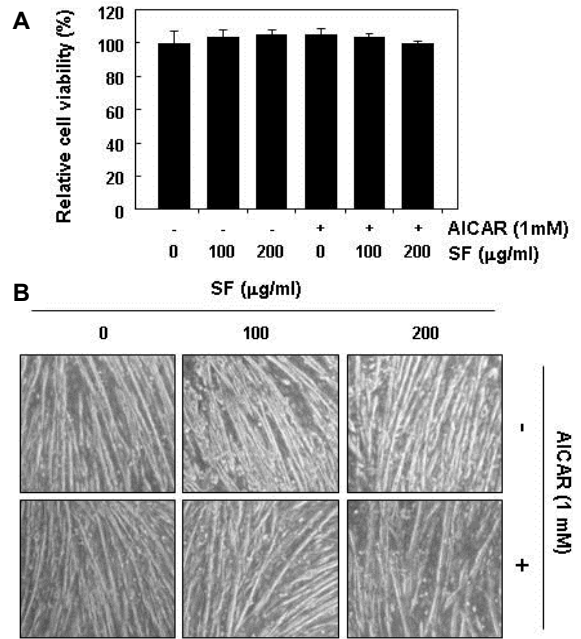


Fig. 4. Effects of SF on AICAR-induced atrophic morphological changes in C2C12 myotubes. (A) C2C12 myotubes were pretreated with SF (100 and 200 µg/ml) for 1 hr, incubated with and without 1 mM AICAR for 24 hr, and then cell viability was assessed using an MTT reduction assay. (B) Representative photographs are shown.

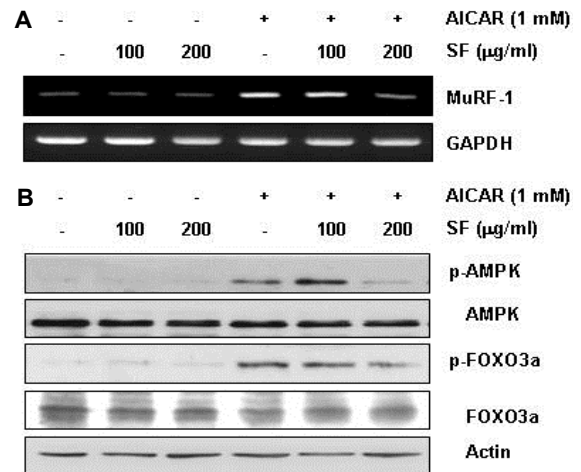


Fig. 5. Effects of SF on AICAR-induced induction of MuRF-1 and activation of FoxO3a in C2C12 myotubes. (A) Total RNA was prepared from cells grown under the same conditions as in Fig. 4 for RT-PCR analysis of MuRF-1 gene expression. The amplified PCR products were run on 1.5% agarose gels and visualized by EtBr staining. (B) Total cellular proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes, and detected with the indicated antibodies using an ECL detection system. GAPDH and actin were used as internal controls for the RT-PCR and Western blot assays, respectively.

근위축 관련 유전자들의 발현 변화 여부와의 연관성을 조사하기 위하여 AICAR 처리에 의한 근위축 조건에서 유도되었던 근위축 조절 관련 유전자들의 발현에 미치는 SF의 영향을 조사하였다. 먼저 RT-PCR의 결과에 의하면, AICAR 처리에 의하여 증가되었던 MuRF-1의 mRNA 발현이 SF의 전처리 조건에서는 SF 처리 농도 증가에 따라 매우 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 5A). 또한 MuRF-1의 전사 활성 증가를 통하여 근단백질의 분해를 촉진시키는 FoxO3a의 인산화도 SF가 전처리된 배지에서 배양된 C2C12 세포에서는 SF 처리 농도 의존적으로 감소되었으며, 이는 또한 AMPK의 활성 억제와도 연관성이 있었다(Fig. 5B).

따라서 SF 전처리군에서의 AICAR에 의한 MuRF-1의 전사 활성 감소는 FoxO3a 활성의 감소에 의한 것이며, 이는 아마도 AMPK 활성 증가에 의한 ubiquitin-proteasome 경로 활성을 차단시켰을 것으로 추정된다. 비록 AMPK와 FoxO3a 신호전달계와 근위축 연관 상위 조절인자들의 관련성에 대한 연구가 지속되어야겠지만, 본 연구의 결과는 최근 알려진 오미자의 근기능 향상 관련 결과들[4, 5]과 아울러 근위축에 따른 근기능 퇴화를 제어할 수 있는 매우 유용한 식의약 소재로서 개발 가능성이 매우 높음을 의미하는 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 및 한국산업기술평가관리원의 항노화 산업 제품화 기술개발사업의 일환으로 수행하였음(10040391, 노화성 근기능 저하 방지를 위한 기능성식품소재 및 기기 개발).

## References

1. Attaix, D., Ventadour, S., Codran, A., Béchet, D., Taillandier, D. and Combaret, L. 2005. The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays Biochem.* **41**, 173-186.
2. Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L., Clarke, B. A., Poueymirou, W. T., Panaro, F. J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z. Q., Valenzuela, D. M., DeChiara, T. M., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D. and Glass, D. J. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704-1708.
3. Buhl, E. S., Jessen, N., Schmitz, O., Pedersen, S. B., Pedersen, O., Holman, G. D. and Lund, S. 2001. Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside increases insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation in rat skeletal muscles in a fiber type-specific manner. *Diabetes* **50**, 12-17.
4. Choo, S. H., Sung, H. H., Chae, M. R., Kang, S. J., Han, D. H., Park, J. K., So, I. and Lee, S. W. 2014. Effects of *Schisandra chinensis* extract on the relaxation of isolated human prostate tissue and smooth muscle cell. *J. Ethnopharmacol.* **156**, 271-276.
5. Chun, J. N., Kim, S. Y., Park, E. J., Kwon, E. J., Bae, D. J., Kim, I. S., Kim, H. K., Park, J. K., Lee, S. W., Park, H. H., So, I. and Jeon, J. H. 2014. Schisandrin B suppresses TGF $\beta$  1-induced stress fiber formation by inhibiting myosin light chain phosphorylation. *J. Ethnopharmacol.* **152**, 364-371.
6. Dilshara, M. G., Jayasooriya, R. G., Kang, C. H., Lee, S., Park, S. R., Jeong, J. W., Choi, Y. H., Seo, Y. T., Jang, Y. P. and Kim, G. Y. 2013. Downregulation of pro-inflammatory mediators by a water extract of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill fruit in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **36**, 256-264.
7. Eom, Y. W., Lee, J. E., Yang, M. S., Jang, I. K., Kim, H. E., Lee, D. H., Kim, Y. J., Park, W. J., Kong, J. H., Shim, K. Y., Lee, J. I. and Kim, H. S. 2011. Effective myotube formation in human adipose tissue-derived stem cells expressing dystrophin and myosin heavy chain by cellular fusion with mouse C2C12 myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 167-173.
8. Jackson, M. J. and O'Farrell, S. 1993. Free radicals and muscle damage. *Br. Med. Bull.* **49**, 630-641.
9. Kim, J. H., Choi, Y. W., Park, C., Jin, C. Y., Lee, Y. J., Park, D. J., Kim, S. G., Kim, G. Y., Choi, I. W., Hwang, W. D., Jeong, Y. K., Kim, S. K. and Choi, Y. H. 2010. Apoptosis induction of human leukemia U937 cells by gomisin N, a dibenzocyclooctadiene lignan, isolated from *Schisandra chinensis* Baill. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 807-813.
10. Kook, S. H., Choi, K. C., Son, Y. O., Lee, K. Y., Hwang, I. H., Lee, H. J., Chung, W. T., Lee, C. B., Park, J. S. and Lee, J. C. 2008. Involvement of p38 MAPK-mediated signaling in the calpeptin-mediated suppression of myogenic differentiation and fusion in C2C12 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **310**, 85-92.
11. Kwon, D. Y., Kim, D. S., Yang, H. J. and Park, S. 2011. The lignan-rich fractions of Fructus Schisandrae improve insulin sensitivity via the PPAR- $\gamma$  pathways in *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Ethnopharmacol.* **135**, 455-462.
12. Lu, Y. and Chen, D. F. 2009. Analysis of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera*. *J. Chromatogr. A* **1216**, 1980-1990.
13. Mallinson, J. E., Constantin-Teodosiu, D., Sidaway, J., Westwood, F. R. and Greenhaff, P. L. 2009. Blunted Akt/FOXO signalling and activation of genes controlling atrophy and fuel use in statin myopathy. *J. Physiol.* **587**, 219-230.
14. Panossian, A. and Wikman, G. 2008. *Pharmacology of Schisandra chinensis* Baill.: an overview of Russian research and uses in medicine. *J. Ethnopharmacol.* **118**, 183-212.
15. Park, C., Choi, Y. W., Hyun, S. K., Kwon, H. J., Hwang, H. J., Kim, G. Y., Choi, B. T., Kim, B. W., Choi, I. W., Moon, S. K., Kim, W. J. and Choi, Y. H. 2009. Induction of G1 arrest and apoptosis by schisandrin C isolated from *Schisandra chinensis* Baill in human leukemia U937 cells. *Int. J. Mol. Med.* **24**, 495-502.
16. Park, J. Y., Choi, Y. W., Yun, J. W., Bae, J. U., Seo, K. W., Lee, S. J., Park, S. Y. and Kim, C. D. 2012. Gomisin J from *Schisandra chinensis* induces vascular relaxation via activation of endothelial nitric oxide synthase. *Vascul. Pharmacol.*

- 57, 124-130.
17. Saha, A. and Ruderman, N. B. 2003. Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: An expanding partnership. *Mol. Cell. Biochem.* **253**, 65-70.
  18. Sayer, A. A., Robinson, S. M., Patel, H. P., Shavlakadze, T., Cooper, C. and Grounds, M. D. 2013. New horizons in the pathogenesis, diagnosis and management of sarcopenia. *Age Ageing* **42**, 145-150.
  19. Thinakaran, G., Ojala, J. and Bag, J. 1993. Expression of c-jun/AP-1 during myogenic differentiation in mouse C2C12 myoblasts. *FEBS Lett.* **319**, 271-276.
  20. Thomason, D. B., Biggs, R. B. and Booth, F. W. 1989. Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am. J. Physiol.* **257**, R300-R305.
  21. Velasco, G., Geelen, M. J. H. and Guzman, M. 1997. Control of hepatic fatty acid oxidation by 5-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, 169-175.
  22. Walker, P. M. 1991. Ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Ann. Vasc. Surg.* **5**, 399-402.
  23. Wu, Y., Zhao, W., Zhao, J., Zhang, Y., Qin, W., Pan, J., Bauman, W. A., Blitzer, R. D. and Cardozo, C. 2010. REDD1 is a major target of testosterone action in preventing dexamethasone-induced muscle loss. *Endocrinology* **151**, 1050-1059.
  24. Yamaguchi, A. 1995. Regulation of differentiation pathway of skeletal mesenchymal cells in cell lines by transforming growth factor-beta superfamily. *Semin. Cell Biol.* **6**, 165-173.
  25. Yang, J. M., Ip, P. S., Che, C. T. and Yeung, J. H. 2011. Relaxant effects of *Schisandra chinensis* and its major lignans on agonists-induced contraction in guinea pig ileum. *Phytomedicine* **18**, 1153-1160.
  26. Zhang, J., Shi, L. L. and Zheng, Y. N. 2010. Dibenzocyclooctadiene lignans from *Fructus Schisandrae Chinensis* improve glucose uptake *in vitro*. *Nat. Prod. Commun.* **5**, 231-234.

**초록 : 마우스 C2C12 근관세포에서 AICAR로 유도된 근위축에 미치는 오미자 추출물의 영향**

강영순<sup>1</sup> · 한민호<sup>1</sup> · 박 철<sup>2</sup> · 홍수현<sup>1</sup> · 황혜진<sup>3,4</sup> · 김병우<sup>3,5</sup> · 김철민<sup>6</sup> · 최영현<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실, 자연 · 생활과학대학 <sup>2</sup>동의대학교 분자생물학과, <sup>3</sup>동의대학교 항노화연구소 및 블루바이오소재개발센터, <sup>4</sup>동의대학교 식품영양학과, <sup>5</sup>동의대학교 생명응용학과, <sup>6</sup>부산대학교 의과대학 생화학 교실)

근위축은 근육 단백질 합성의 저하와 근육 단백질의 분해 증가에 따른 근섬유의 감소에 의한 근육량이 감소되는 현상이다. 오미자(*Schisandrae Fructus*, fruits of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon)는 오랫동안 전통의학에서 강장제로서 널리 사용되어 왔다. 비록 다양한 질병 연관 오미자의 생리활성 효능이 폭넓게 연구되어져 왔으나 근육 질환 관련 연구는 매우 제한적으로 이루어져 왔다. 본 연구에서는 오미자 에탄올 추출물(SF)이 AMPK 활성인자 AICAR 처리에 의한 C2C12 근관세포의 근위축 모델계를 이용하여 근위축 억제 효능을 가지는지의 여부와 관련 기전의 해석을 시도하였다. AICAR 처리는 근단백질 분해 연관 ubiquitin ligase muscle RING finger-1 (MuRF-1)의 발현을 전사 수준에서 증가시켰고, MuRF-1 조절 전사인자의 하나인 forkhead box O3a (FoxO3a) 단백질의 인산화를 증가시켰으며, 이러한 변화는 근위축과 연관된 C2C12 근관세포의 형태적 변형과 동반된 현상이었다. 그러나 SF의 전처리에 의하여, AICAR에 의하여 유도된 근위축성 형태변화를 억제하였으며, MuRF-1의 발현과 FoxO3a의 활성화를 억제시켰다. 본 연구의 결과는 SF가 AICAR 처리에 의한 C2C12 근관세포의 근위축을 AMPK 및 FoxO3a 신호전달계 조절을 통하여 억제하였음을 보여주는 것으로 오미자는 근기능 향상을 위한 식의 약 소재로서의 개발 가능성이 매우 높음을 시사하여 준다.