

## Ethanol Extract of Mori Folium Inhibits AICAR-induced Muscle Atrophy Through Inactivation of AMPK in C2C12 Myotubes

Yu Sung Lee<sup>1</sup>, Hong Jae Kim<sup>2</sup>, Jin-Woo Jeong<sup>3</sup>, Min-Ho Han<sup>4</sup>, Su Hyun Hong<sup>2</sup>, Yung Hyun Choi<sup>2,5\*</sup> and Cheol Park<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticultural Biotechnology, College of Life Sciences, Kyunghee University, Yongin-si, Gyeonggi-do 17104, Korea

<sup>2</sup>Open Laboratory for Muscular & Skeletal Disease Control and Department of Biochemistry, Dongeui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

<sup>3</sup>Freshwater Bioresources Utilization Bureau, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Korea

<sup>4</sup>Team of Marine Bio-Resources, National Marine Biodiversity Institute of Korea, Seocheon 33662, Korea

<sup>5</sup>Anti-Aging Research Center and Blue-Bio Industry RIC, Dongeui University, Busan 47340, Korea

<sup>6</sup>Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Dongeui University, Busan 47340, Korea

Received February 19, 2018 / Revised April 27, 2018 / Accepted April 27, 2018

AMP-activated protein kinase (AMPK) functions as a metabolic master through regulating and restoring cellular energy balance. In skeletal muscle, AMPK increases myofibril protein degradation through the expression of muscle-specific ubiquitin ligases. Mori Folium, the leaf of *Morus alba*, is a traditional medicinal herb with various pharmacological functions; however, the effects associated with muscle atrophy have not been fully identified. In this study, we confirmed the effects of AMPK activation by examining the effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR), an activator of AMPK, on the induction of atrophy and expression of atrophy-related genes in C2C12 myotubes. We also investigated the effects of the ethanol extract of Mori Folium (EEMF) on the recovery of AICAR-induced muscle atrophy in C2C12 myotubes. It was found that exposure to AICAR resulted in the stimulation of Forkhead box O3a (FOXO3a); an up-regulation of muscle-specific ubiquitin ligases such as Muscle Atrophy F-box (MAFbx)/atrogin-1 and muscle RING finger-1 (MuRF1), and a down-regulation of muscle-specific transcription factors, such as MyoD and myogenin; with the activation of AMPK. In addition, AICAR without cytotoxicity indicated a decrease in diameter of C2C12 myotubes. However, treatment with EEMF significantly suppressed AICAR-induced muscle atrophy of C2C12 myotubes in a dose-dependent manner as confirmed by a decrease in myotube diameter, which is associated with a reversed stimulation of FOXO3a by the inhibition of AMPK activation. These results indicate that the activation of AMPK by AICAR induces muscle atrophy, and EEMF has pre-eminent effects on the inhibition of AICAR-induced muscle atrophy through the AMPK signaling pathway.

**Key words** : AICAR, AMPK, atrophy, C2C12 myotubes, EEMF

### 서 론

Protease 활성화, ubiquitin conjugation 및 autophagy 등과 같은 세포 내 변화에 의하여 나타나는 현상인 근위축(muscle atrophy)은 노화 및 영양부족 뿐 만 아니라 폐혈증, 암 등과 같은 여러 가지 질병에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다

[3, 4, 12, 29]. 근위축이 유발되면 근육 단백질 분해를 통한 단백질 함량의 감소 및 근섬유 지름의 감소에 의한 근력 감소 및 피로 저항 감소 등과 같은 현상이 나타난다[12, 23]. 특히 노화에 의한 근위축은 단백질 합성 감소 및 단백질 분해 증가 등에 의하여 유발되며, 결과적으로 운동능력 감소 및 보행 장애 등을 유발함으로써 삶의 질을 현저하게 악화시킬 뿐 만 아니라 사망률을 증가시키는 중요한 원인이 되므로 이를 극복하기 위한 관련 메커니즘을 규명하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다.

AMP-activated protein kinase (AMPK)는 serine - threonine heterotrimeric kinase로서 에너지 균형을 조절하는 중요한 조절자 및 에너지 센서이다[6, 8]. AMPK는 AMP/ATP ratio 증가에 따른 Thr172 인산화에 의하여 활성화되면 에너지 소비 과정을 억제할 뿐 만 아니라 glucose uptake 및 fatty acid oxidation을 유발함으로써 포도당 및 지질 대사를 조절하는

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1530, Fax : +82-505-182-6870

E-mail : parkch@deu.ac.kr (Cheol Park)

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

E-mail : choiyh@deu.ac.kr (Yung Hyun Choi)

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.

것으로 알려져 있다[9, 18, 25]. 최근 연구에서 AMPK가 활성화되면 전사인자인 forkhead box O3a (FoxO3a)를 경유하여 muscle-specific ubiquitin ligases인 muscle atrophy F-box (MAFbx)/atrogin-1 및 muscle RING finger-1 (MuRF1)의 증가를 통한 ubiquitin-proteasome 경로의 활성화를 유발함으로써 근육 단백질 분해에 의한 근위축에 직접적으로 관여하는 것으로 보고되고 있다[13, 22, 26, 28]. 또한 근위축이 유발되면 myogenic differentiation에 관여하는 muscle-specific transcription factors인 MyoD 및 myogenin의 발현이 감소하는 것으로 알려져 있다[11, 27].

상엽(桑葉, *Mori Folium*)은 뽕나무(*Morus alba* L.)의 잎을 건조한 한약재로서 예로부터 각기병, 몸이 붓는 증세, 배인 상처, 식은땀, 중풍 등에 사용되어져 왔다[14]. 최근 연구에서 상엽에는 rutin, quercetin, isoquercetin, moracetin, deoxy-nojirimycin, calistegin, GABA, morusin, umbelliferone이 함유되어 있으며, 항균, 항산화, 항염증, 항불안, 항당뇨, 혈당강하, 고지혈증 억제, 항비만 등과 같은 여러 가지 약리학적 효능을 가지는 것으로 보고되고 있다[16, 17, 30]. 특히 상엽에 함유되어 있는 주요 성분 중 하나인 rutin은 중성지방 억제 및 혈중 콜레스테롤 저하 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, quercetin은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 유발되는 DNA 손상 감소 및 염증반응 억제 효능이 있을 뿐 만 아니라 1-deoxynojirimycin (1-DNJ)은  $\alpha$ -glucosidase 저해를 통한 혈당상승 억제 기능을 가지는 것으로 보고되고 있다[5, 10, 15]. 현재까지 발표된 연구 결과에서 알 수 있듯이 상엽은 다양한 약리작용을 가지는 기능성 물질이지만 근위축 억제 효능 및 그에 따른 분자생물학적 기전에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 상엽 에탄올 추출물(ethanol extracts of *Mori Folium*, EEMF)이 유발하는 근위축 억제 효능 및 기전 해석을 실시하였다. 이를 위하여 먼저 분화가 유발된 C2C12 myotubes에서 에너지 조절 효소인 AMPK의 약리학적 활성제로서 세포에서 AMP/ATP 비율을 증가시키고 효소 활성화에 필요한 높은 에너지 소비 조건을 모방하는 AMP 유사체인 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR)를 이용한 인위적인 근위축 모델의 확립을 실시하였고, EEMF가 인위적으로 유발된 근위축 과정에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였으며, 이때 AMPK가 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서 세포배양 및 분화를 위하여 사용된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), horse serum (HS), penicillin/streptomycin (PS)은 WELGENE (Daegu, Korea)에서 구입하였고, AICAR 및 3-(4,5-Dimethyl-

thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. mRNA 분석을 위하여 사용된 primer는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 구입하였으며, 단백질 분석을 위하여 사용된 1차 항체인 AMPK, pAMPK, ACC, pACC, FoxO3a, pFoxO3a, MAFbx/atrogin-1, MuRF1, MyoD, myogenin 및 Actin과 2차 항체인 goat anti-mouse IgG-HRP 및 goat anti-rabbit IgG-HRP은 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

### 시료준비

실험에 사용된 상엽(전북, 임실)은 대한생약식품(주)에서 구입하였으며, 상엽 에탄올 추출물(ethanol extract of *Mori Folium*, EEMF)을 얻기 위하여 상엽 100 g 당 100% 에탄올 1 l를 첨가하여 60°C, 150 rpm으로 3일간 교반한 후 이를 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액만 분리하였다. 분리된 상층액을 Whatman 필터(No.2)로 여과하고 감압농축과정을 통하여 고형성분을 얻어내고 막자사발로 잘게 마쇄하고 밀봉시켜 -70°C 초저온 냉동고에 보관하였다. 실험 시에는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하여 100 mg/ml의 농도로 만든 다음 이를 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

### Myotubes 분화 및 근위축 유도

실험에 사용된 세포주인 C2C12 myoblasts는 American Type Culture Collection (Manassa, VA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 90% DMEM, 10% FBS 및 100 unit/ml PS가 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. C2C12 myoblasts를 myotubes로 분화시키기 위하여 100% confluent 상태의 세포를 대상으로 90% DMEM, 2% HS 및 100 unit/ml PS가 포함된 분화배지를 매 2일마다 교체하였으며, 근위축 유도를 위하여 적정농도의 AICAR를 24시간 동안 처리하였다. 근위축 과정 중 나타나는 형태변화를 확인하기 위하여 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Göttingen, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였으며, 근위축 유발 정도를 확인하기 위하여 myotube diameter를 측정 한 다음 image analysis program을 이용하여 분석하였다.

### Hemocytometer를 이용한 세포 생존율 측정

AICAR 및 EEMF 처리에 따른 C2C12 myoblasts의 생존율을 측정하기 위하여 100% confluent 상태의 C2C12 myoblasts에 AICAR 및 EEMF를 적정 농도로 처리하였다. 일정 시간 경과 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이렇게 모인 세포를 대상으로 각각 1 ml의 PBS와 0.5% trypan blue

solution (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 2분간 염색을 실시하고 hemocytometer에 적용시킨 다음 도립 현미경을 이용하여 살아있는 세포를 계수하였다.

**MTT assay를 이용한 성장억제 조사**

C2C12 myoblasts에서 AICAR 및 EEMF가 유발하는 성장 억제 정도를 확인하기 위하여 상기와 동일한 방법으로 처리된 세포를 대상으로 배지를 제거하고 0.5 mg/ml 농도의 MTT를 2 ml 씩 분주하고 빛을 차단한 다음 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시켰다. 2시간 경과 후 MTT 시약을 제거하고 dimethyl sulphoxide (DMSO, Amresco, Solon, OH, USA)를 적정량 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 다음 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**DAPI staining에 의한 apoptosis 유발의 확인**

Apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 24시간 동안 다양한 농도의 AICAR가 처리된 조건에서 배양된 세포를 모아 fixing solution (3.7% formaldehyde in PBS)을 처리하여 상온에서 10분 동안 고정하였다. 고정이 끝난 후 slide glass에 세포를 부착시키고 0.2% Triton X-100 (Amresco, Solon, OH, USA)을 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 2.5 µg/ml 농도의 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Co.) 용액으로 15분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 형광 현미경 (fluorescence microscope, Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

**Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) staining에 의한 apoptosis의 정량적 측정**

C2C12 myoblasts에서 AICAR 처리에 의한 apoptosis 유발 정도의 정량적 분석을 위하여 준비된 세포들을 모은 다음 10 mM HEPES/NaOH, pH7.4, 140 mM NaCl 및 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>가 포함된 annexin V binding buffer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 부유시킨 다음 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC, Becton Dickinson) 및 propidium iodide (PI, Becton Dickinson)를 처리하여 암실에서 20분 동안 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson)에 적용시켜 apoptosis가 유발된 세포 (V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>)를 형광반응에 따라 분석하였다.

**Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석**

근위축 조절 관련 유전자들의 발현을 단백질 수준에서 비교하기 위하여 준비된 세포에 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를

첨가하고 4°C에서 1시간 동안 반응시켜 단백질을 분리한 다음 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량하였다. Laemilni sample buffer (Bio-Rad)와 혼합된 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane에 각각의 1차 및 2차 항체를 처리하여 반응시킨 다음 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 특정 단백질의 발현 변화를 분석하였다.

**Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석**

동일한 조건에서 준비된 세포를 대상으로 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하고 정량한 다음 각각의 primer, DEPC water 및 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Seongnam, Korea)를 첨가하고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg,

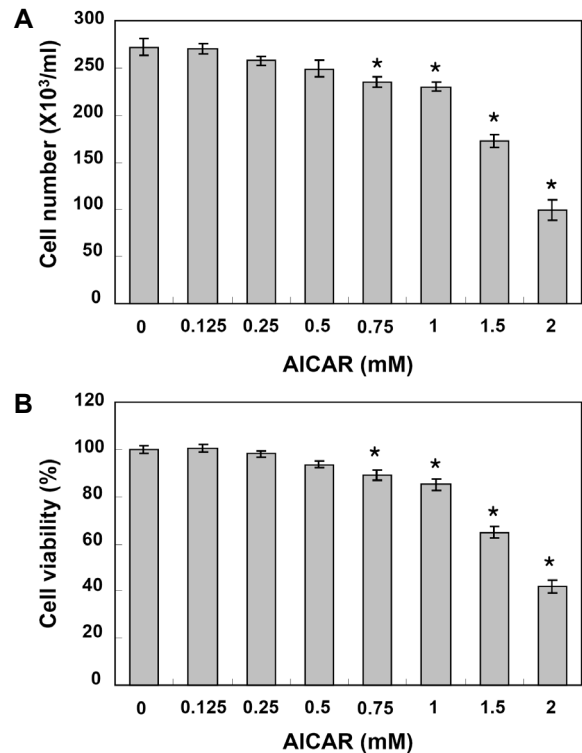


Fig. 1. Effects of AICAR on the cell growth in C2C12 myoblasts. Cells were treated with the indicated concentrations of AICAR for 24 hr Cell number (A) and viability (B) were determined by hemocytometer counts of trypan blue excluding cells and MTT assay, respectively. Values represent the means ± SD of three independent experiments (\*p<0.05 compared to the untreated control).

Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들을 양적 차이를 확인하기 위하여 1×TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 EtBr를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

**통계분석**

모든 실험 결과들의 유의성을 검증하기 위하여 분산분석

(ANOVA)을 실시한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range tests를 실시하였으며, 그 결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다.

**결과 및 고찰**

**AICAR가 C2C12 myoblasts의 생존을 및 성장에 미치는 영향**

근위축을 유발하기 위하여 사용된 AICAR가 C2C12 myo-

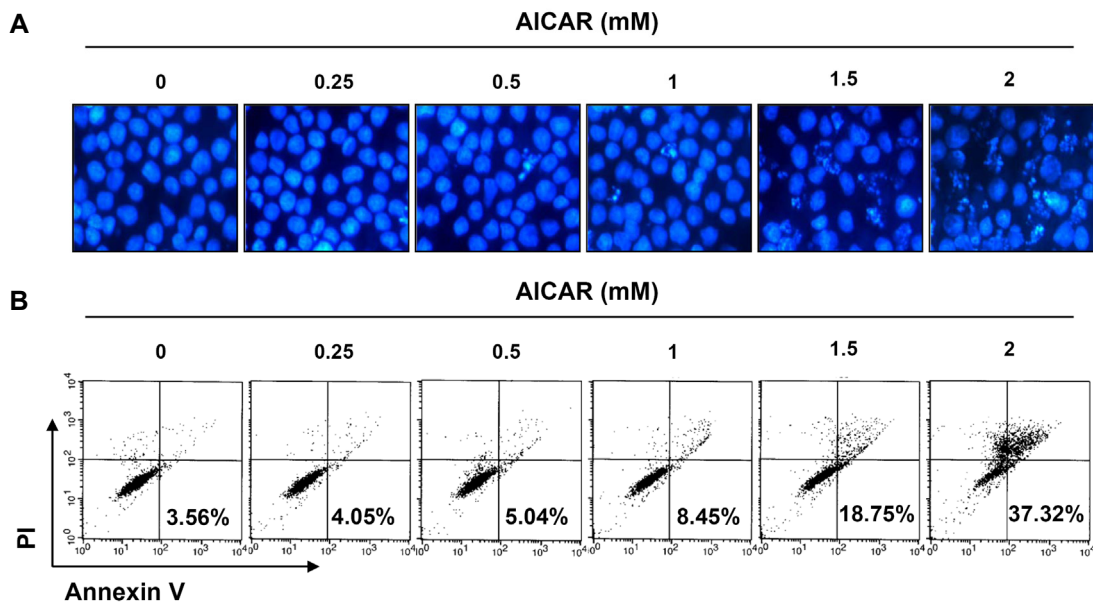


Fig. 2. Induction of apoptosis by AICAR treatment in C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts were treated with the indicated concentrations of AICAR for 24 hr. (A) The cells were fixed and stained with DAPI solution. The stained nuclei were observed under a fluorescent microscope (Original magnification, 400×). (B) To quantify the degree of apoptosis induced by AICAR, cells were stained with FITC-conjugated Annexin V and PI for DNA flow cytometry analysis. Apoptotic cells are determined by counting the % of annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> cells and the percent of annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> cells.

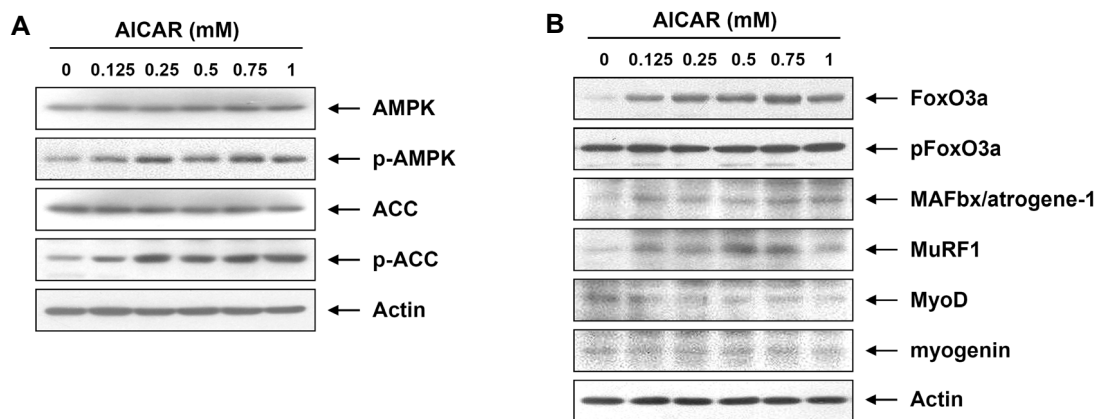


Fig. 3. Expression levels of atrophy-related proteins by AICAR treatment in C2C12 myoblasts. (A and B) Cells were treated with the indicated concentrations of AICAR for 24 hr. The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

blasts의 생존율 및 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 다양한 농도의 AICAR를 24시간 동안 처리한 후 trypan blue 염색 및 MTT assay를 이용하여 조사하였다. 먼저 trypan blue 염색을 실시한 후 hemocytometer를 이용하여 살아있는 세포의 수를 계수하여 비교한 결과 Fig. 1A에 나타난 바와 같이 1 mM 처리군까지는 생존율 감소 현상이 크게 나타나지 않았지만 1.5 mM 처리군에서부터는 처리농도 증가에 따른 생존율 감소 현상이 증가되는 것으로 나타났다. 또한 상기와 동일한 조건에서 AICAR가 유발하는 성장억제 정도를 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한 결과는 Fig. 1B에 나타난 바와 같다. 결과에서 나타난 바와 같이 AICAR가 유발하는 성장억제의 경우에도 1 mM 처리군까지는 큰 변화가 관찰되지 않았지만 1.5 mM 처리군에서부터는 성장억제 현상이 강하게 유발된다는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 AICAR 1 mM 처리군까지는 C2C12 myoblasts에 대한 세포독성이 거의 없는 것으로 판단되어 이후의 실험들은 1 mM의 농도범위에서 실시하였다.

**C2C12 myoblasts에서 AICAR에 의한 apoptosis 유발**

상기 결과에서 나타난 AICAR 처리에 의한 C2C12 myoblasts에서의 생존율 감소 및 증식 억제 현상이 apoptosis 유발과 관련성이 있는지의 여부를 조사하였다. 먼저 apoptosis 유

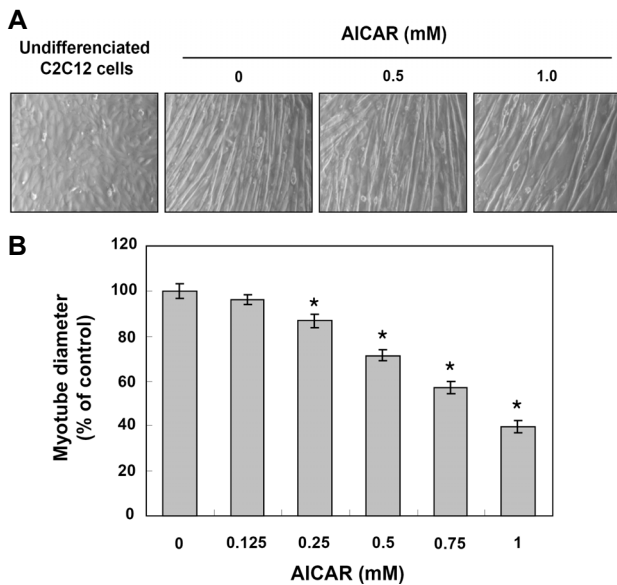


Fig. 4. AICAR induced atrophy in C2C12 myotubes. (A) Fully differentiated C2C12 myotubes were treated with AICAR treatment for 24 hr. Photographs were taken under a inverted microscope. (B) Relative changes in myotube diameter determined at intervals of 24 hr by treatment of AICAR. Myotube diameters from randomly selected fields were quantified using an image analysis program. Values represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments (\* $p$ <0.05 compared to the untreated control).

발 시 나타나는 핵의 형태변화를 확인하기 위하여 DAPI 염색을 실시한 결과 Fig. 2A에 나타난 바와 같이 정상 조건에서 배양된 세포에서는 아무런 변화가 나타나지 않았지만 1.5 mM AICAR 처리군에서부터 염색질의 응축에 의한 apoptotic body의 형성이 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 다음으로 C2C12 myoblasts에서 AICAR가 유발하는 apoptosis의 정량적인 비교를 위하여 상기와 동일한 조건에서 배양된 세포를 대상으로 annexin V-FITC/PI로 염색한 후 flow cytometry 분석을 실시하였다. Fig. 2B의 결과에서 알 수 있듯이 1 mM AICAR 처리군까지는 apoptosis 유발 정도가 크게 증가하지 않았지만 1.5 mM AICAR 처리군에서부터 급격하게 증가하여 2 mM AICAR 처리군에서는 약 37.32%의 세포에서 apoptosis가 유발되는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 C2C12 myoblasts에 AICAR를 고농도로 처리하였을 경우 나타나는 생존

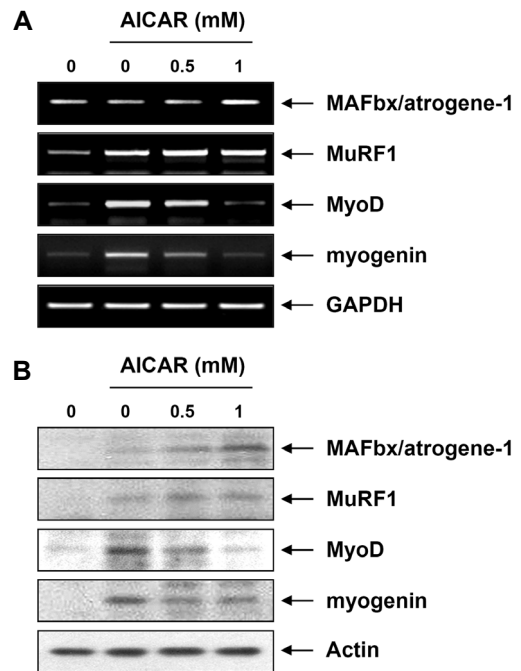


Fig. 5. Effects of AICAR on the levels of muscle-specific ubiquitin ligases (MAFbx/atrogen-1 and MuRF1) and muscle-specific transcription factors (MyoD and myogenin) expression in C2C12 myotubes. (A) Cells were treated with the indicated concentrations of AICAR for 24 hr. Total RNA was isolated and reverse-transcribed using the indicated primers. Resulting cDNAs were then subjected to PCR and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) Cells grown under the same conditions as (A) were sampled, lysed, and 20 mg of proteins were separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels. Western blotting was then performed using the indicated antibodies, and an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

을 감소 및 성장억제는 apoptosis에 의한 현상임을 알 수 있었다.

**C2C12 myoblasts에서 근위축 관련 유전자의 발현에 미치는 AICAR의 영향**

AMPK는 에너지 소비 과정의 억제 뿐 만 아니라 glucose uptake 및 fatty acid oxidation 유발을 통한 포도당 및 지질 대사를 조절하는 에너지 균형 조절자 및 에너지 센서이다[19, 20]. 뿐 만 아니라 AMPK는 ubiquitin-proteasome 경로의 활성화를 통한 근육 단백질 분해에 직접적으로 관여함으로써 근위축 유발에도 관여하는 것으로도 알려져 있다[2, 21]. AMPK가 활성화되면 FoxO3a를 경유하여 골격근에서 특이적으로 발현되는 muscle-specific ubiquitin ligases로서 F-box type E3 ligase인 MAFbx/atrogen-1 및 Ring Finger 유형의 E3 ligase인 MuRF1의 증가를 통한 ubiquitin-proteasome 경로의 활성화를 유발함으로써 myogenic differentiation에 관여하는 muscle-specific transcription factors인 MyoD 및 myogenin의 분해를 촉진하여 근위축을 유발시키는 것으로 보고되고 있다[1, 7, 13]. 따라서 C2C12 myoblasts에서 AICAR 처리에 따른 AMPK 및 근위축 관련 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 먼저 Fig. 3A 및 Fig. 3B에서 나타난 바와 같이 AICAR는 AMPK

및 AMPK의 하위단계에서 작용하는 ACC의 인산화를 농도의존적으로 증가시키는 것으로 확인되었으며, FoxO3a의 발현도 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 muscle-specific ubiquitin ligases인 MAFbx/atrogen-1 및 MuRF1의 발현 증가와 함께 muscle-specific transcription factors인 MyoD 및 myogenin의 발현 감소를 유발하였다. 이상의 결과에서 AICAR는 AMPK 및 FoxO3a를 경유한 근위축 관련 유전자의 발현을 조절함으로써 근위축에 관여한다는 것을 예상할 수 있었다.

**C2C12 myotubes에서 근위축에 미치는 AICAR의 영향**

근위축은 노화, 영양부족 및 여러 가지 질병에 의하여 유발되며, ubiquitin-proteasome 경로 활성화를 통한 근육 단백질 분해가 유발됨으로서 근섬유 수 및 지름의 감소를 통한 전체적인 근육량의 감소와 같은 특징을 가진다[2, 21, 24]. 이러한 근위축을 억제하기 위한 연구를 위하여 AICAR가 인위적인 근위축 유도인자로서 활용될 수 있는지를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 C2C12 myotubes에 세포독성이 없는 조건의 AICAR를 처리하였을 경우 나타나는 형태적인 특징 및 근위축 관련 유전자의 발현을 조사하였다. 먼저 Fig. 4A 및 Fig. 4B에 나타난 바와 같이 AICAR 처리에 따른 C2C12 myotubes의 형태적 특징 및 근섬유의 지름을 확인한 결과, AICAR 처리

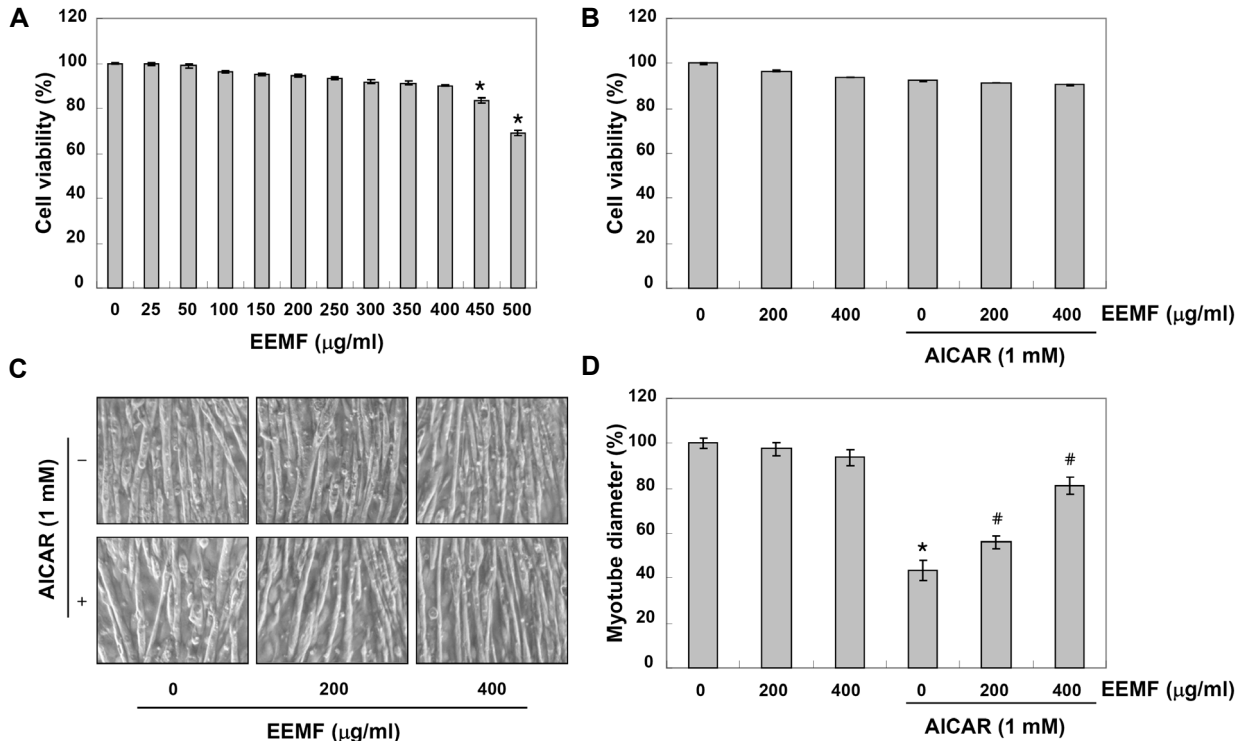


Fig. 6. Effects of EEMF on AICAR-induced atrophy in C2C12 myotubes. The cells were incubated with the indicated concentrations of EEMF (A) for 24 hr or EEMF in the presence or absence of 1 mM AICAR for 24 hr (B), and then cell viability was assessed using an MTT assay. (C) Photographs were taken under a inverted microscope. (D) Myotube diameters from randomly selected fields were quantified using an image analysis program. Values represent the means ± SD of three independent experiments (\**p*<0.05 compared to the untreated control. #*p*<0.05 compared to the to the AICAR treated group).

농도 의존적으로 근섬유의 수와 지름이 현저하게 감소하는 것으로 나타났다. 다음으로 AICAR에 의하여 유발되는 근위축과 관련하여 muscle-specific ubiquitin ligases 및 muscle-specific transcription factors의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 mRNA 및 단백질 수준에서 확인한 결과는 Fig. 5A 및 Fig. 5B에 나타난 바와 같다. 결과에서 볼 수 있듯이 myoblasts에서 myotubes로 분화를 유발한 후 AICAR를 처리하였을 경우 MAFbx/atrogen-1 및 MuRF1의 발현 증가와 함께 MyoD 및 myogenin의 발현 감소가 유발되었다. 이상의 결과에서 AMPK 활성화제인 AICAR는 C2C12 myotubes의 근위축을 유발한다는 것을 알 수 있었으므로 근위축 유도인자로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

**C2C12 myotubes에서 AICAR에 의해 유도된 근위축에 미치는 EEMF의 영향**

상엽은 많은 종류의 flavonoid 성분을 함유하고 있으므로 다양한 약리학적 효능을 가지는 기능성 물질이라고 보고되고

있을 뿐 만 아니라 AMPK의 활성을 조절한다고 알려져 있으므로 근위축을 억제할 수 있을 것으로 예상되지만 근위축 억제와 관련된 효능 및 기전에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 C2C12 myotubes에서 AMPK 활성화제인 AICAR에 의하여 유발되는 근위축 과정에서 상엽 에탄올 추출물인 EEMF가 어떠한 영향을 미치는 지를 확인하였다. 먼저 Fig. 6A 및 Fig. 6B에서와 같이 EEMF 및 AICAR 처리에 따른 세포독성을 가지지 않는 조건을 설정한 후 C2C12 myotubes의 형태적 특징 및 근섬유의 지름을 확인한 결과, Fig. 6C 및 Fig. 6D에서 나타난 바와 같이 AICAR 처리에 의하여 근섬유의 수와 지름의 감소가 유발되었지만 EEMF 처리에 의하여 회복되는 것으로 나타났으므로 EEMF가 근위축을 억제할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 다음으로 EEMF가 유발하는 근위축 억제와 관련된 유전자들의 변화를 확인한 결과 Fig. 7A 및 Fig. 7B에서 나타난 바와 같이 AICAR 처리에 의하여 증가된 AMPK 및 ACC의 인산화가 EEMF에 의하여 억제되는 것으로 나타났으며, FoxO3a의 발현도 억제하는 것으로 조사되었다. 또한 EEMF는 AICAR 처리에 의하여 증가된 MAFbx/atrogen-1 및 MuRF1의 발현을 감소시켰으며, 감소된 MyoD 및 myogenin의 발현을 회복시키는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 살펴볼 때 AICAR 처리에 의하여 유발된 근위축을 EEMF가 억제한다는 것을 알 수 있었으며, 이러한 현상은 AMPK 활성화 억제를 통한 전사인자인 FoxO3a를 억제함으로써 유발되는 ubiquitin-proteasome 경로의 차단이 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 본 연구 결과는 상엽이 근위축에 따른 근기능 퇴화를 제어할 수 있는 식의약 소재로 사용될 수 있는 가능성을 제시하는 자료로서 가치가 매우 높을 것으로 생각되지만 추가적으로 상엽에 포함되어 있는 유효성분에 대한 분석과 함께 에너지 대사 및 신호전달계 등과 연관된 기전 연구가 필요할 것으로 판단된다.

**감사의 글**

이 논문은 2017년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업지원(No. 2017R1D1A1B03032689) 및 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품 기술개발사업(No. 314043-3)의 지원으로 수행되었음.

**References**

1. Abe, S., Rhee, S., Iwanuma, O., Hiroki, E., Yanagisawa, N., Sakiyama, K. and Ide, Y. 2009. Effect of mechanical stretching on expressions of muscle specific transcription factors MyoD, Myf-5, myogenin and MRF4 in proliferated myoblasts. *Anat. Histol. Embryol.* **38**, 305-310.
2. Attaix, D., Combaret, L., Béchet, D. and Taillandier, D. 2008.

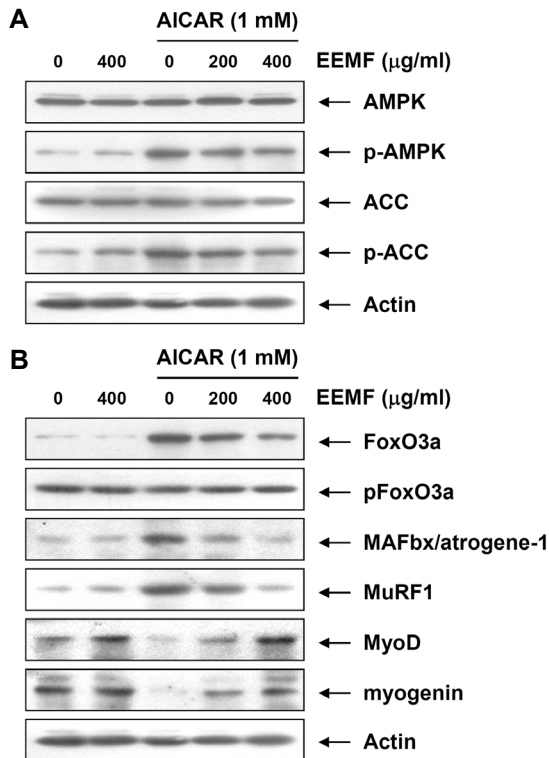


Fig. 7. Effects of EEMF on atrophy-related proteins expression in C2C12 myotubes. (A and B) Cells were incubated with EEMF in the presence or absence of 1 mM AICAR for 24 hr. The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

- Role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy in cachexia. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* **2**, 262-266.
3. Bédard, N., Jammoul, S., Moore, T., Wykes, L., Hallauer, P. L., Hastings, K. E., Stretch, C., Baracos, V., Chevalier, S., Plourde, M., Coyne, E. and Wing, S. S. 2015. Inactivation of the ubiquitin-specific protease 19 deubiquitinating enzyme protects against muscle wasting. *FASEB. J.* **29**, 3889-3898.
  4. Cao, P. R., Kim, H. J. and Lecker, S. H. 2005. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **37**, 2088-2097.
  5. Chao, P. Y., Lin, K. H., Chiu, C. C., Yang, Y. Y., Huang, M. Y. and Yang, C. M. 2013. Inhibitive effects of mulberry leaf-related extracts on cell adhesion and inflammatory response in human aortic endothelial cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, 267217.
  6. Fogarty, S. and Hardie, D. G. 2010. Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 581-591.
  7. Foletta, V. C., White, L. J., Larsen, A. E., Léger, B. and Russell, A. P. 2011. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch.* **461**, 325-335.
  8. Hardie, D. G. 2014. AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab.* **20**, 939-952.
  9. Huang, C. H., Tsai, S. J., Wang, Y. J., Pan, M. H., Kao, J. Y. and Way, T. D. 2009. EGCG inhibits protein synthesis, lipogenesis, and cell cycle progression through activation of AMPK in p53 positive and negative human hepatoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 1156-1165.
  10. Huang, S. S., Yan, Y. H., Ko, C. H., Chen, K. M., Lee, S. C. and Liu, C. T. 2014. A Comparison of food-grade Folium mori (Sāng Yè) extract and 1-deoxynojirimycin for glycemic control and renal function in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Tradit. Complement. Med.* **4**, 162-170.
  11. Hyatt, J. P., Roy, R. R., Baldwin, K. M. and Edgerton, V. R. 2003. Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **285**, C1161-1173.
  12. Jackman, R. W. and Kandarian, S. C. 2004. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C834-843.
  13. Jaitovich, A., Angulo, M., Lecuona, E., Dada, L. A., Welch, L. C., Cheng, Y., Gusarova, G., Ceco, E., Liu, C., Shigemura, M., Barreiro, E., Patterson, C., Nader, G. A. and Sznajder, J. I. 2015. High CO<sub>2</sub> levels cause skeletal muscle atrophy via AMP-activated kinase (AMPK), FoxO3a protein, and muscle-specific Ring finger protein 1 (MuRF1). *J. Biol. Chem.* **290**, 9183-9194.
  14. Jeon, Y. S. and Kim, M. W. 2011. The antioxidative effects and isolation and characterization of the extracts from Morus alba L.. *Kor. J. Food Nutr.* **24**, 94-100.
  15. Jiang, L. D., Xuan, G. D., Zhao, L., Zhu, Y. F. and Lou, X. F. 2011. Study on determination and pharmacokinetics of metabolites from Folium Mori extract in rats. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* **40**, 395-401.
  16. Kobayashi, Y., Miyazawa, M., Kamei, A., Abe, K. and Kojima, T. 2010. Ameliorative effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaves on hyperlipidemia in rats fed a high-fat diet: induction of fatty acid oxidation, inhibition of lipogenesis, and suppression of oxidative stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 2385-2395.
  17. Lee, J., Chae, K., Ha, J., Park, B. Y., Lee, H. S., Jeong, S., Kim, M. Y. and Yoon, M. 2008. Regulation of obesity and lipid disorders by herbal extracts from *Morus alba*, *Melissa officinalis*, and *Artemisia capillaris* in high-fat diet-induced obese mice. *J. Ethnopharmacol.* **115**, 263-270.
  18. Lee, S. K., Lee, J. O., Kim, J. H., Kim, N., You, G. Y., Moon, J. W., Sha, J., Kim, S. J., Lee, Y. W., Kang, H. J., Park, S. H. and Kim, H. S. 2012. Coenzyme Q10 increases the fatty acid oxidation through AMPK-mediated PPAR $\alpha$  induction in 3T3-L1 preadipocytes. *Cell. Signal.* **24**, 2329-2336.
  19. Marcinko, K. and Steinberg, G. R. 2014. The role of AMPK in controlling metabolism and mitochondrial biogenesis during exercise. *Exp. Physiol.* **99**, 1581-1585.
  20. Miranda, N., Tovar, A. R., Palacios, B. and Torres, N. 2007. AMPK as a cellular energy sensor and its function in the organism. *Rev. Invest. Clin.* **59**, 458-469.
  21. Murton, AJ, Constantin, D, Greenhaff, PL. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochim Biophys Acta.* **1782**, 730-743.
  22. Nakashima, K. and Yakabe, Y. 2007. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1650-1656.
  23. Price, S. R. and Mitch, W. E. 1998. Mechanisms stimulating protein degradation to cause muscle atrophy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **1**, 79-83.
  24. Price, S. R. 2003. Increased transcription of ubiquitin-proteasome system components: molecular responses associated with muscle atrophy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **35**, 617-628.
  25. Rutter, G. A., Da Silva Xavier, G. and Leclerc, I. 2003. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem. J.* **375**, 1-16.
  26. Sanchez, A. M., Csibi, A., Raibon, A., Cornille, K., Gay, S., Bernardi, H. and Candau, R. 2012. AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J. Cell. Biochem.* **113**, 695-710.
  27. Tintignac, L. A., Lagirand, J., Batonnet, S., Sirri, V., Leibovitch, M. P. and Leibovitch, S. A. 2005. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **280**, 2847-2856.
  28. Tong, J. F., Yan, X., Zhu, M. J. and Du, M. 2009. AMP-activated protein kinase enhances the expression of muscle-specific ubiquitin ligases despite its activation of IGF-1/Akt signaling in C2C12 myotubes. *J. Cell. Biochem.* **108**, 458-468.
  29. Troncoso, R., Paredes, F., Parra, V., Gatica, D., Vásquez-Trincado, C., Quiroga, C., Bravo-Sagua, R., López-Crisosto,



C., Rodriguez, A. E., Oyarzún, A. P., Kroemer, G. and Lavandro, S. 2014. Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. *Cell Cycle* **13**, 2281-2295.

30. Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. and Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of bacillus amyloliquefaciens RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* **91**, 181-187.

## 초록 : C2C12 근관세포에서 상업에 의한 AMPK의 불활성화와 AICAR로 유도된 근위축 억제제의 연관성에 관한 연구

이유성<sup>1</sup> · 김홍재<sup>2</sup> · 정진우<sup>3</sup> · 한민호<sup>4</sup> · 홍수현<sup>2</sup> · 최영현<sup>2,5\*</sup> · 박 철<sup>6\*</sup>

(<sup>1</sup>경희대학교 생명과학대학 원예생명공학과, <sup>2</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 근-골격계 질환제어 융합연구실, <sup>3</sup>나동강생물자원관 담수생물특성연구실, <sup>4</sup>국립해양생물자원관 해양생명자원관리부, <sup>5</sup>동의대학교 항노화연구소 및 Blue-Bio 소재개발센터, <sup>6</sup>동의대학교 자연과학대학 분자생물학과)

AMPK는 세포 내 에너지 균형을 조절하는 조절자 및 에너지 센서이며, 특히 골격근에서는 muscle-specific ubiquitin ligases의 조절을 통한 근육 단백질 분해를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 한편 상업은 다양한 약리학적 효능을 가지는 전통약재 중 하나이지만 근위축과 관련된 효능에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 C2C12 myotubes에서 AMPK 활성화제인 AICAR가 유발하는 근위축 및 관련 유전자의 발현과 함께 상업 에탄올 추출물(ethanol extracts of Mori Folium, EEMF)이 유발하는 근위축 억제 효능에 대해서 조사하였다. 먼저 C2C12 myoblasts에 AICAR를 처리하였을 경우 AMPK 활성화가 유발되었으며, 하위 단계에 있는 FoxO3a의 발현 증가와 함께 muscle-specific ubiquitin ligases인 MAFbx/atrogen-1 및 MuRF1의 발현 증가와 muscle-specific transcription factors인 MyoD 및 myogenin의 발현 감소가 유발되었다. 또한 분화가 유발된 C2C12 myotubes에 세포 독성이 없는 조건의 AICAR를 처리하였을 경우 근위축이 유발되었으며, EEMF는 AMPK 불활성화 및 FoxO3a 발현 억제를 유발함으로써 AICAR 처리에 의한 근위축을 억제하는 것으로 나타났다. 본 연구 결과에서 AICAR에 의한 AMPK 활성화가 근위축을 유발한다는 것을 알 수 있었으며, EEMF는 AMPK signaling pathway를 통하여 AICAR에 의한 근위축을 억제한다는 것을 알 수 있었다.