



Original Article / 원저

Dexamethasone으로 유도된 근위축 세포모델에서 glucoraphanin의 효과

전상규, 김옥현, 박수미, 이주희*, 박선동*

동국대학교 한의과대학

Effects of glucoraphanin in dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy *in vitro* model

Sang Kyu Jeon, Ok Hyeon Kim, Su Mi Park, Ju-Hee Lee*, Sun-Dong Park*

College of Korean Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : Glucoraphanin is one of the well-known natural glucosinolates found in cruciferous plants. In the present study, we investigated the effects and molecular mechanism of glucoraphanin in dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy *in vitro* model.

Methods : The cytotoxic effects of glucoraphanin on C2C12 myoblasts or myotubes were evaluated by MTT assay. The glucoraphanin was evaluated effects in dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy in C2C12 myotubes using a real-time PCR, western blots analysis, and immunofluorescence staining of myosin heavy chain.

Result : Glucoraphanin had no cytotoxicity on both C2C12 myoblasts or myotubes. Dexamethasone markedly induced muscle atrophy by up-regulating muscle-specific ubiquitin E3 ligase markers, atrogin-1 and MuRF1, and down-regulating MyoD, a myogenic regulatory factor whereas co-treatment of glucoraphanin and dexamethasone dose-dependently inhibited it. Furthermore, decreased expressions of p-Akt, p-FOXO1, and p-FOXO3a induced by dexamethasone were reversed by co-treatment with glucoraphanin and dexamethasone. In addition, dexamethasone obviously reduced myotube diameters, while co-treatment of glucoraphanin and dexamethasone increased those to a similar level as control.

Conclusions : These results show that glucoraphanin suppresses dexamethasone-induced muscle atrophy in C2C12 myotubes through activation of Akt/FOXO signaling pathway.

© 2020 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Key words : Glucoraphanin, C2C12, dexamethasone, muscle atrophy, Akt, FOXO

I. 서론

근위축(skeletal muscle atrophy)은 호르몬 불균형, 심한 부상, 신경 손상, 중증질병, 패혈증, 암, 비만, 노화 및 장시간의 우주 비행 등의 여러 가지 이화 상태(catabolic condition)에서 발생하는 근육세포와 근조직의 크기 및 질량적 손실을 의미하는 것으로, 근육의 손실을 유발하여 근육을 약화시키고, 피로감을 유발하며, 합병증을 악화시키게 된다^{1,2)}. 근위축의 진단은 혈액검사인 크레아틴 키나아제(Creatine kinase) 측정, 분자생물학적 유전자검사, 근전도검사 및 근육생검 등을 통해 이루어지며, 치료법으로는 물리치료가 일반적이고, 합병증이나 기형 및 기능 장애를 예방하기 위한 작업치료, 호흡치료 및 지지요법 등이 병행되고 있으나^{3,4)}, 이러한 치료들은 대증요법(對症療法, symptomatic therapy)으로써 한계를 가지고 있기에 근위축에 대한 치료제, 예방을 위한 보조약물 치료제 및 건강보충제 등의 개발이 절실한 상황이다.

근위축의 병인 기전은 아직 명확히 규명되지 않았지만, 현재까지 근위축 발병의 주원인으로 보고된 것으로 산화물질 증가에 의한 근세포 손상, 스트레스 단백질 발현 감소로 인한 근단백질 생성 및 재생 감소, ubiquitin-proteasome 경로의 활성화에 따른 근단백질의 분해 촉진 및 autophagy 등이 알려져 있다^{5,6)}. Dexamethasone은 합성 glucocorticoid로, 염증, 알레르기 및 자가 면역질환, 암 등의 치료에 사용되지만, 장시간 투여에 의하여 근육량과 관련된 단백질의 분해가 촉진되어 근위축을 유발한다고 알려져 근위축 관련 연구에 많이 사용되고 있다⁷⁻⁸⁾. 근위축은 2개의 근육 특이적 E3 ubiquitin ligase인 MAFbx (muscle atrophy F-box)/atrogin-1 및 MuRF1 (Muscle RING Finger-1)과 관련이 있는데,

dexamethasone은 이들을 통해 근육 단백질을 분해하고, 근육분화에 관여하는 근육 특이적 인자들인 myogenin 및 MyoD (myogenic differentiation antigen)를 감소시킴으로써 근육량이 감소하게 된다⁷⁻⁸⁾. 따라서, 근위축 특히 dexamethasone으로 유도되는 근위축 모델을 이용하여 치료제의 개발이 진행되고 있으나, 현재까지 근위축에 대한 효과적인 치료제는 개발되지 않은 상황이며, 인구의 노령화, 만성질환의 증가, 우주개발 및 건강한 삶과 삶의 질을 추구하는 사회적 인식의 변화로 인하여, 근위축에 대한 치료제의 요구가 점차 증가할 것으로 예상되어 근육의 위축을 유도하는 다양한 상황에서도 근육을 유지하도록 도울 수 있는 안전하고 효능이 좋은 천연물 유래 소재를 발굴하고자 한다.

십자화과(十字花科, Brassicaceae 또는 Cruciferae)에 속한 양배추, 브로콜리, 콜라비(kohlrabi), 콜리플라워(cauliflower), 겨자 및 무 등의 식물들은 휘발성이 강하고 독특한 매운 향기를 내는 2차 대사산물을 다량 함유하며, 항산화, 항균 및 항암효과가 우수하다고 알려져있어 약리학적 이용 가치가 높다^{9,10)}. 특히 glucoraphanin (methionine-derived 4-methylsulfinylbutyl glucosinolate)은 이들 식물에서 발견되는 2차 대사산물 중 하나인 glucosinolate 화합물으로써 항암 및 항균 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으나^{11,12)}, 근육과 관련된 연구에 대해서는 아직 보고된 바가 없다.

이에 본 연구는 glucoraphanin을 이용하여 dexamethasone에 의해 근위축이 유도된 C2C12 세포에서 근위축 억제 효능을 평가하고, 그 기전을 연구함으로써 근위축의 예방, 개선 및 치료 후보제로서의 이용 가치를 확인하였기에 보고하는 바이다.

*Corresponding author : Sun Dong Park. College of Korean Medicine, Dongguk University, 32, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Gyeonggi-do, 10326, Republic of Korea.

Tel : +82-31-961-5825, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : sundong@dongguk.ac.kr

*Corresponding author : Ju-Hee Lee. College of Korean Medicine, Dongguk University, 32, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, 10326, Republic of Korea.

Tel : +82-31-961-5839, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : jh1548@dongguk.ac.kr

•Received : February 16, 2020 / Accepted : February 22, 2020



II. 재료 및 방법

1. 세포 배양 및 약물 처리

실험에 사용된 C2C12 근아세포(myoblast)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA; CRL-1772TM)에서 구입하였으며, 10% FBS (fetal bovine serum, WELGENE, Daegu, Korea) 및 1% 항생제(penicillin-streptomycin, WELGENE)가 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, WELGENE) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 근관세포(myotube)로의 분화를 유도하기 위하여, C2C12 근아세포가 80% 찻을 때, 2% FBS 및 1% 항생제를 포함하는 DMEM 배지로 4일 동안 매일 교체하였다. 그 후, 1, 5 또는 10 µM 농도의 glucoraphanin (Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA)으로 근관세포에 처리하였다. 한편, 근위축은 5 µM의 dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 유도하였으며, dexamethasone은 단독으로 또는 glucoraphanin과 동시에 처리되었다.

2. 세포 생존율 측정

96 well plate에 2×10⁵ cells/ml의 C2C12 근아세포를 100 µl씩 분주하고, 하루 배양한 후, glucoraphanin을 0.01, 0.1, 1, 5 및 10 µM로 각 well에 처리하고, 37°C의 5% CO₂의 조건에서 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. 근관세포는 96 well plate에 2×10⁵ cells/ml의 C2C12 근아세포를 100 µl씩 분주하고, 다음 날 분화 배지로 교체하여 4일간 분화시킨 후, glucoraphanin을 0.01, 0.1, 1, 5 및 10 µM의 농도로 처리하여 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. 약물 처리 시간 종료 후, 최종 농도가 0.2 mg/ml이 되도록 MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich) 시약을 각 well에 첨가한 다음, 배양기에서 4시간 동안 반응시키고, 배지를 제거한 후, dimethyl sulfoxide (DMSO, Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 100 µl를 넣어 교반하였다. Formazan crystals이 완전히 녹으면, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(%)은 glucoraphanin을 처리하지 않은 대조군의 흡광도값에 대한 백분율로 나타냈다.

3. Real-time PCR 분석

Glucoraphanin 또는 glucoraphanin과 dexamethasone을 동시에 처리한 C2C12 세포로부터 TRIzolTM 시약 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하고 정량한 다음, RNA 1 µg에 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific)를 적용한 후, Thermal Cycler PCR 기기(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 45°C로 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA와 atrogen-1, MuRF1, MyoD, myogenin, MHC Ib, MHC IIa, MHC IIb, MHC IIx 및 18sRNA에 해당하는 각각의 primer들, 그리고 FASTStart Essential DNA Green Master (Roche, Basel, Switzerland)를 혼합한 후, LightCycler 96 real-time PCR 기기 (Roche)에서 반응시킨 후, mRNA 발현 양상을 분석하였다. 본 연구에 사용한 primer sequences는 다음과 같다.

Atrogen-1 (Forward 5'-CTCTGTACCATGCCGTTCT-3', Reverse 5'-GGCTGCTGAACAGATTCTCC-3'), MuRF1 (Forward 5'-TGTCTGGAGTCGTTTCCG-3', Reverse 5'-TGCCGGTCCATGATCACTT-3'), MyoD (Forward 5'-ACTACAGTGGCGACTCAGATGC-3', Reverse 5'-CCGCTGTAATCCATCATGCCATC-3'), Myogenin (Forward 5'-TCCCAACCCAGGAGATCATTTC-3', Reverse 5'-ACGTAAGGGAGTGCAGATTGTGG-3'), MHC 1b (Forward 5'-GAGGAAGAGTGAGCGCG-3', Reverse 5'-GCCGAGTAGGTTCTTCTCTGT-3'), MHC IIa (Forward 5'-TACAACCTCAAAGAGCGTTATGCA-3', Reverse 5'-AAGGGTTGACGGTGACACAGA-3'), MHC IIb (Forward 5'-GAGATCGATGATCTCGCTAGTAACAT-3', Reverse 5'-GGGTGCGGCACATCTTC-3'), MHC IIx (Forward 5'-ACAGATCGGGAGAACCAGTCTATT-3', Reverse 5'-CGTTTCGTGTTTCACAGTCTTCC-3'), 18sRNA (Forward 5'-CGATGCTCTTAGCTGAGTGT-3', Reverse 5'-GGTCCAAGAATTTACCTCT-3')

4. Western blot

근관세포를 PBS로 세척한 후, protease inhibitor cocktail (GenDEPOT, Barker, TX, USA)과 phosphatase inhibitor cocktail (GenDEPOT)을 함유한 RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)에 용해하였다. 원심분리 후 상층액만 취한 단백질은

bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 단백질을 정량하고, 4× laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 혼합하여 끓인 다음, 동량의 단백질 샘플을 SDS-PAGE gel에 로딩하여 전기영동을 실시하였다. 분리된 단백질을 PVDF 멤브레인(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 옮기고, 5% skim milk (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)로 1시간 이상 블로킹한 후, atrogin-1, MuRF1 (ECM Biosciences, Versailles, KY, USA), MyoD (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), p-Akt(S473), Akt, p-FOXO1, FOXO1, p-FOXO3a 및 FOXO3a (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) 및 α -tubulin (Thermo Fisher Scientific)에 대한 일차 항체와 4°C에서 밤새 반응시켰다. PBST로 3회 세척 후, 실온에서 1시간 동안 goat-anti-rabbit 2차 항체(Thermo Fisher Scientific)와 반응시켰다. PBST로 3회 세척 후, Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA)를 적용하여 Fusion Solo-2 화상이미지 분석기(Vilber Lourmat, Paris, France)에서 관찰하고 이미지를 획득하였다.

5. 면역 형광 염색 (Immunofluorescence staining)

6 well plate에 근관세포를 키운 후, glucoraphanin 또는 glucoraphanin과 dexamethasone을 동시 처리하고, 24시간 후 PBS로 세척하고, 4% paraformaldehyde PBS 용액(FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)으로 15분 동안 고정하였다. 고정 후, Triton-X100 (Sigma-Aldrich)이 0.2% 함유된 PBS로 5분씩 3번 세척하고, 5% BSA로 37°C에서 30분간 blocking한 다음, MHC 항체(MF20, Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, USA)를 2% BSA에 1:100으로 희석하여 4°C에서 12시간 반응시킨 후, Triton-X100이 0.2% 함유된 PBS로 5분씩 3번 세척하고 goat-anti-mouse IgG-FITC 2차 항체(Thermo Fisher

Scientific)를 2% BSA에 1:200으로 희석하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. DAPI가 포함된 형광용 마운트 용액(Fluoroshield™ with DAPI, Sigma-Aldrich)을 이용하여 mounting하고, 도립형광현미경(ECLIPSE Ts2-FL; Nikon, Tokyo, Japan) 하에서 관찰을 하고 이미지를 획득하였다.

6. 통계분석

결과는 평균 \pm 표준편차(SD)로 나타냈으며, GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 그래프로 변환하고, 일원분산분석(one way analysis of variance, ANOVA)을 실시한 후, Tukey's multiple comparison test를 실시하여 유의성을 검정하였다. 이때 $p < 0.05$ 미만인 것을 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결과

1. C2C12 근아세포 및 근관세포의 생존율에 미치는 glucoraphanin의 영향

Glucoraphanin의 효능을 연구하기 위해, 먼저 glucoraphanin의 적정 농도 범위를 알아보고자 C2C12 근아세포와 이를 분화시킨 근관세포에서 MTT 분석법으로 세포 생존율을 측정하였다. Glucoraphanin을 0.01~10 μ M 범위의 다양한 농도로 24시간 또는 48시간 동안 처리하였을 때, C2C12 근아세포의 생존율에는 영향을 미치지 않았다(Figure 1A). C2C12 근관세포에도 같은 조건으로 glucoraphanin을 처리한 후, 세포 생존율을 측정한 결과, 24시간 처리는 실험한 모든 농도에서 근관세포의 생존율에 영향을 미치지 않았지만, 48시간 처리는 생존율이 약간 감소하는 경향을 보였다(Figure 1B). 그러나 모든 농도에서의 세포 생존율이 90% 이상을 나타내는 것으로 보아 세포독성은 거의 없는 것으로 판단되어 이후의 실험에서는 glucoraphanin을 최대 10 μ M까지 사용하였다.

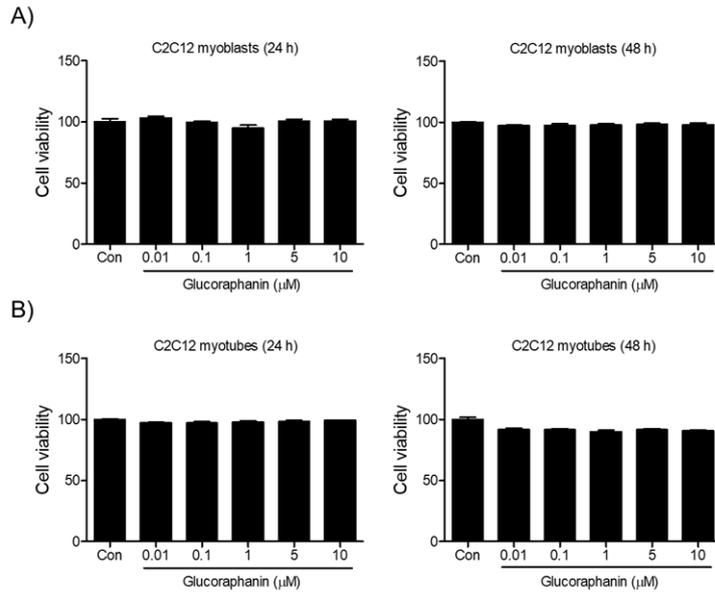


Figure 1. Effects of glucoraphanin on cell viability of C2C12 myoblasts or myotubes. C2C12 myoblasts or myotubes were treated with different concentrations of glucoraphanin (0.01, 0.1, 1, 5, or 10 μM) for 24 h or 48 h. Cell viabilities were determined using MTT reagent. Values were expressed as percentages of the vehicle-treated control.

2. Glucoraphanin이 근관세포의 미오신 중쇄(MHC)에 미치는 영향

4종의 주요 미오신 중쇄 MHC Ib, MHC IIa, MHC IIb 및 MHC IIx는 근육 유형 및 근육 신진대사를 나타낸다. 따라서, glucoraphanin 처리 후, 미오신 중쇄의 발현 변화를 확인하기 위하여, 4종의 주요 미오신 중쇄의 mRNA 수준을 분석하였다. 그 결과, glucoraphanin을 처리하지 않은 경우의 MHC Ib,

MHC IIa, MHC IIb 및 MHC IIx의 mRNA 수준과 비교하였을 때, glucoraphanin을 처리한 후에 측정된 MHC Ib, MHC IIa, MHC IIb 및 MHC IIx의 mRNA 수준에서 유의적인 차이는 나타나지 않음을 확인하였다(Figure 2). 즉, glucoraphanin은 정상 근관세포의 주요 미오신 중쇄의 발현에 영향을 주지 않았다.

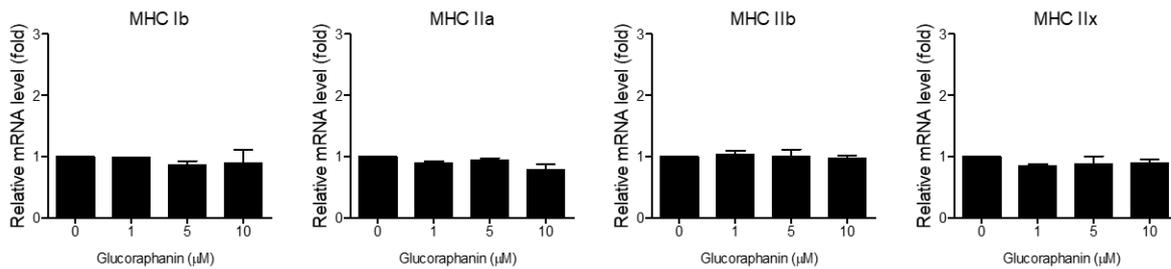


Figure 2. Effects of glucoraphanin on mRNA levels of myosin heavy chain (MHC) family (Ib, IIa, IIb, and IIx) in myotubes. The mRNA levels of myosin heavy chain (MHC) family (Ib, IIa, IIb, and IIx) in myotubes after treatment with glucoraphanin (1, 5, 10 μM) for 24 h were assayed by real-time qPCR.

3. Glucoraphanin이 근관세포의 근육 분화 및 근위축 관련 유전자에 미치는 영향

Glucoraphanin이 근위축 관련 유전자에 영향을 미치는지 알아보기 위해 C2C12 근관세포에 glucoraphanin을 24시간 동안 처리한 후, mRNA 수준을 분석하였다. MyoD 및 myogenin은 근육분화의 마커이고, atrogen-1 및 MuRF1은 근위축의 마커이다. 따라서, glucoraphanin 처리 후, 근육 분화 및 근위축 여부를 확인하기 위하여, 이들 마커에 대한 mRNA 수준

을 분석하였다. 그 결과, glucoraphanin을 처리하지 않은 정상 근관세포의 MyoD, myogenin, atrogen-1 및 MuRF1의 mRNA 수준과 비교하였을 때, glucoraphanin을 처리한 후에 측정된 MyoD, myogenin, atrogen-1 및 MuRF1의 mRNA 수준에서 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Figure 3). 즉, glucoraphanin은 정상 근관세포의 근육분화 및 근위축에 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였다.

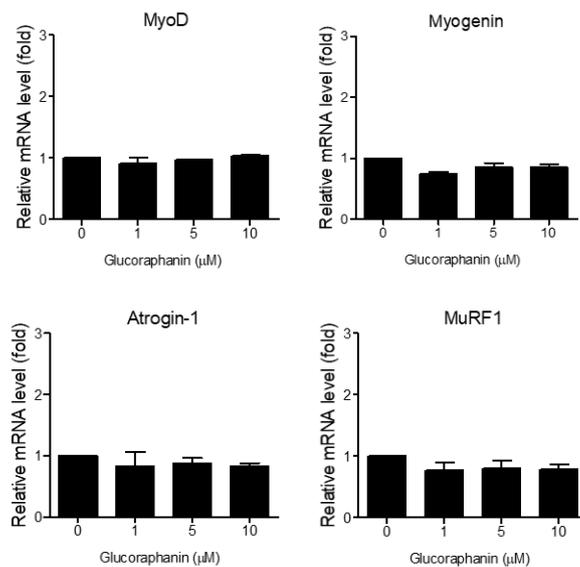


Figure 3. Effect of glucoraphanin on on mRNA levels of MyoD, myogenin, atrogen-1, and MuRF1 in C2C12 myotubes. Myotubes were treated with or without glucoraphanin (1, 5, or 10 μ M) for 24 h. MyoD, myogenin, atrogen-1, and MuRF1 mRNA levels in myotubes after glucoraphanin treatment were assayed by real-time qPCR.

4. Glucoraphanin이 dexamethasone으로 유도된 근위축에 미치는 영향

Glucoraphanin이 dexamethasone으로 인한 근위축에 영향을 미치는지 알아보기 위해 C2C12 근관세포에 glucoraphanin과 dexamethasone을 24시간 동안 동시 처리한 후, 근위축의 마커인 atrogen-1과 MuRF1 mRNA 수준을 분석하였다. 그 결과, 5 μ M의 dexamethasone 처리는 glucoraphanin을 처리하지 않은 control군에 비해 atrogen-1과 MuRF1 mRNA 수준이 현저하게 증가하여 각각 control의 약 3.27

배, 1.29배로 증가하였다 (atrogen-1, $p < 0.01$; MuRF1, $p < 0.05$). 반면, glucoraphanin과 dexamethasone의 동시 처리는 dexamethasone에 의해 증가된 atrogen-1과 MuRF1 mRNA를 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 보였으며, 구체적으로 atrogen-1의 경우 1 μ M에서 2.2배, 5 μ M에서 1.83배, 10 μ M에서 1.68배, MuRF1의 경우 1 μ M에서 1.14배, 5 μ M에서 0.96배, 10 μ M에서 0.97배를 나타냈고, 특히 5와 10 μ M ($p < 0.05$)에서는 dexamethasone과 비교하여 통계학적으로 유의성을 보였다(Figure 4).

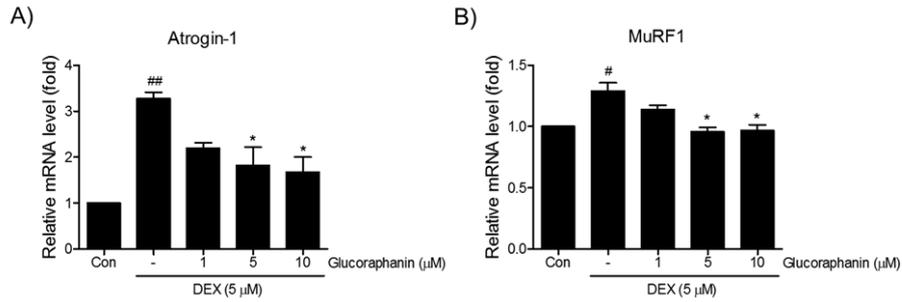


Figure 4. Effect of glucoraphanin on the dexamethasone-induced muscle atrophy in C2C12 myotubes. Myotubes were co-treated with or without glucoraphanin (1, 5, or 10 μM) and dexamethasone (5 μM, DEX) for 24 h. Atrogin-1 and MuRF1 mRNA levels were assayed by real-time qPCR. (Significant versus control, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; significant versus dexamethasone, * $p < 0.05$)

다음으로 동일한 조건으로 약물을 처리한 근관세포에서 atrogin-1, MuRF1 및 MyoD 단백질의 발현 정도를 western blot으로 분석하였다. 그 결과, 5 μM의 dexamethasone 처리는 glucoraphanin을 처리하지 않은 정상 근관세포에 비해 atrogin-1과 MuRF1 단백질의 발현이 현저하게 증가시켜 근위축을 유도하였고, glucoraphanin과 dexamethasone의 동시 처리는 dexamethasone에 의해 증가된 atrogin-1과 MuRF1 단백질의 발현량을 glucoraphanin 5 μM과 10 μM에서 현저히 감소되었다(Figure 5). 반면, dexamethasone 처리는 정상 근관세포와 비교하여 MyoD 단백질을 현저하게 감소시켰으며, glucoraphanin과 dexamethasone의 동시 처리는 dexamethasone에 의해 감소된 MyoD 단백질을 glucoraphanin 5 μM과 10 μM에서 증가시켰다(Figure 5). 이는 glucoraphanin이 dexamethasone로 인한 근위축으로부터 C2C12 근관세포를 보호한다는 것을 나타낸다.

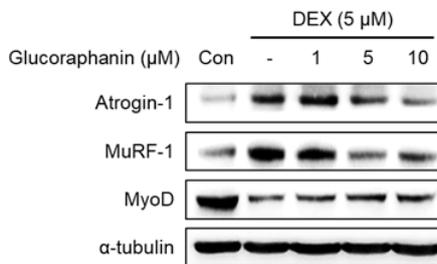


Figure 5. Effect of glucoraphanin on expression of muscle atrophy-related proteins in dexamethasone-treated C2C12 myotubes. The expression of

atrogin-1, MuRF1, and MyoD proteins was assayed by western blot in cells treated with glucoraphanin in the absence or presence of 5 μM dexamethasone for 24 h. An α-tubulin was used as a loading control.

5. Glucoraphanin이 근위축 억제 신호전달경로에 미치는 영향

감소된 Akt 신호 활성화는 대부분의 근위축 모델에서 관찰된다. Glucoraphanin의 근위축 억제 효과에 대한 작용 기전을 알아보기 위하여 C2C12 근관세포에 glucoraphanin과 dexamethasone을 24시간 동안 동시 처리한 후, 단백질 합성 및 분해와 관련된 신호전달경로의 인자인 Akt, FOXO1 및 FOXO3a 단백질을 western blot을 통하여 확인해 보았다. 예상된 바와 같이, dexamethasone 처리는 p-Akt의 수준을 유의하게 감소시켰으나, glucoraphanin과 dexamethasone을 동시에 처리한 경우, 실험에 사용된 모든 농도 범위의 glucoraphanin이 p-Akt를 증가시켜 정상대조군과 유사한 수준으로 회복되는 것이 확인되었다(Figure 6). 한편, dexamethasone을 처리할 경우, p-FOXO1과 p-FOXO3a의 발현이 현저히 감소되었으나, glucoraphanin과 dexamethasone의 동시 처리는 농도의존적으로 이들의 발현을 증가시켜 정상대조군보다 더 많이 증가하였다(Figure 6). 이러한 결과를 통하여, glucoraphanin이 Akt/FOXO 신호 전달을 활성화시킴으로써 근위축으로부터 보호 효과를 가진다는 것을 알 수 있었다.

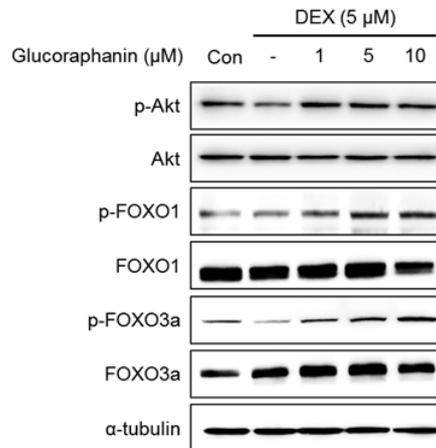


Figure 6. Effect of glucoraphanin on the Akt/FOXO signaling pathway in dexamethasone-treated C2C12 myotubes. The protein levels of Akt, FOXO1, FOXO3a and their phosphorylated forms were assessed by western blots in C2C12 myotubes co-treated with different concentration of glucoraphanin (1, 5, or 10 μ M) and dexamethasone (5 μ M) for 24 h. An α -tubulin was used as a loading control.

6. Glucoraphanin이 dexamethasone으로 유도된 근위축에서 근관세포 직경에 미치는 영향

Glucoraphanin이 dexamethasone으로 유도된 근위축에서 근관세포의 직경에 영향을 미치는지 알아보기 위해 MHC 항체를 이용하여 형광염색을 실시한 후, 형광현미경 하에서 근관세포의 직경을 관찰하였다. Figure 7에서 나타나는 바와 같이, dexamethasone 5 μ M은 근위축을 일으켜 정상대조군에 비하여 근관

세포의 직경이 현저하게 작아진 반면, glucoraphanin 10 μ M과 dexamethasone을 동시에 처리한 경우 dexamethasone 처리군과 비교하여 직경이 월등히 커 정상대조군과 비슷한 정도의 직경이 관찰되었다. 따라서, glucoraphanin이 dexamethasone에 의한 근관세포 직경의 감소, 즉 근위축으로부터 보호한다는 것을 육안으로 확인하였다.

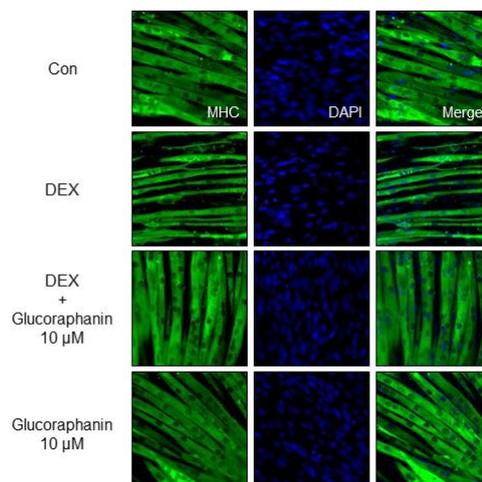


Figure 7. Effects of glucoraphanin on myotubes diameter. Myotubes were co-treated with or without glucoraphanin (10 μ M) and dexamethasone (5 μ M) for 24 h. Myotube diameters were observed under fluorescence microscope after MHC immunofluorescence staining.



IV. 고찰

비만과 만성 소모성 질환의 증가 및 고령화로 인하여 근육 건강의 관심이 점차 증가하고 있으며, 2019 바이오 미래유망 후보기술 중 하나로 ‘逆노화성 운동 모방 약물(Exercise-mimicking medicine for anti-aging)’ 즉, 실제 운동을 하지 않아도 운동 효과를 나타내어 근육노쇠 등 노인성질환을 예방할 수 있는 약물이 선정되면서 근육의 중요성에 대한 인식이 점차 높아지고 있다¹³⁾. 따라서 근육이 감소, 위축할 수 있는 다양한 환경에서도 근육을 유지하도록 도울 수 있는 소재 개발이 활발히 진행되고 있으며, 특히 안전하고, 약리 효능이 우수한 한의학 및 보완대체요법에 근거를 둔 한약재 또는 천연물로부터 새로운 소재를 발굴하고자 많은 연구가 수행되고 있다. 이러한 연구 동향에 따라 본 연구는 십자화과 식물에 많이 함유된 glucoraphanin의 근위축 억제 효능 및 그 기전을 규명한 연구로써, C2C12 근관세포에 dexamethasone으로 유발된 근위축을 glucoraphanin이 억제하는 효과를 보이며, 주로 Akt/FOXO 신호전달경로를 통하여 효능을 발휘한다는 사실을 처음으로 밝혔다.

근위축 관련 연구들은 주로 마우스 골격근 세포주인 C2C12 세포에 dexamethasone, hydrogen peroxide (H₂O₂), 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR, AMPK activator), tumor necrosis factor α (TNFα), 항암제의 일종인 cisplatin 등을 처리하여 근위축의 시험관 모델을 주로 이용하는데^{7,8,14-16)}, 본 연구는 C2C12 근아세포를 근관세포로 분화시킨 다음 dexamethasone 처리로 근위축을 유발하는 모델을 이용하였다.

먼저 근위축에 대한 효능을 알아보기 전에 glucoraphanin 자체가 근육세포 즉, 근아세포 및 근관세포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고, 적절한 약물 처리 농도를 결정하였다. 독성이 있는지 알아보기 위해, 일반적으로 단일성분의 세포 처리 농도 범위인 0.01~10 μM 범위로 처리한 후 세포생존율을 분석한 결과 근아세포 및 근관세포에 독성을 나타내지 않는다는 것을 확인하였다. 골격근에 가장 많이 존재하는 단백질인 미오신(myosin)을 구성하는 미오신 중쇄(myosin heavy chain, MHC)는 근육 수축 성상을 결정하는 중요한 요인으로 MHC Ib는 느린 수축에, MHC IIa, MHC IIb, MHC IIx는 빠른 수축에 관여하며, MHC IIb는

가장 빠른 수축에 관여한다고 알려졌다¹⁷⁾. 골격근의 위축시 미오신 중쇄가 영향을 받게 되므로, glucoraphanin 자체가 미오신 중쇄에 영향을 미치는지 4종의 MHC 아형의 mRNA 발현을 알아본 결과, 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

근육분화(myogenesis, myogenic differentiation)는 근육의 손상, 노화에 의한 골격근 질환, 운동 등에 의해 재생이 요구될 때 필요한 과정으로 근아세포가 여러 개 융합하여 관 형태의 다핵세포인 근관세포로 분화되는 것을 말하며, 이 과정은 myogenin, Myf5, MRF4, MRF 5, MyoD 등과 같은 myogenic regulatory factors (MRFs)에 의해 조절되고, MHC의 발현량이 증가되므로, MRFs 또는 MHC는 근육분화의 마커로 사용되어 왔다^{18,19)}. 한편 근위축을 유발하는 ubiquitin-proteasome 단백질 분해 경로상의 인자들에는 atrogen-1과 MURF1이 알려져 있다^{5,6)}. 따라서 glucoraphanin이 근육분화 또는 근위축에 영향을 미치는지 알아보기 위해 glucoraphanin을 처리한 C2C12 근관세포에서 근육분화 및 근위축의 대표 마커 MyoD, myogenin과 atrogen-1, MURF1의 mRNA 발현 양상을 분석해 본 결과, glucoraphanin을 처리하지 않은 것과 비교하여 유의한 차이가 없었다. 따라서 glucoraphanin이 근아세포 및 근관세포에 어떠한 부정적인 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였다.

Dexamethasone은 atrogen-1 및 MuRF1의 발현 증가를 통해 근육 단백질을 분해하고, 근육분화 인자 myogenin 및 MyoD를 감소시켜 근위축을 유발한다고 알려져 있다^{7,8)}. 따라서 dexamethasone 처리로 근위축을 유발한 C2C12 근관세포에 glucoraphanin이 미치는 영향을 알아보기 위해 dexamethasone과 glucoraphanin을 동시에 처리해 본 결과, dexamethasone 단독 처리와 비교하여 atrogen-1과 MuRF1의 mRNA와 단백질의 발현 모두 현저하게 억제되었고, MyoD 단백질의 발현은 증가시켰다.

근육 단백질 합성은 근육 형성과 재생에 관여하는 중요한 동화작용 체계인 insulin-like growth factor 1/PI3K/Akt 신호전달경로를 통하여 단백질 합성이 촉진되고, 근육 단백질 분해는 forkhead box O (FOXO)와 ubiquitin-proteasome 시스템으로 구성된 신호전달경로에 의해 조절된다⁵⁻⁷⁾. 골격근에서 FOXO는 세 종류의 아형 FOXO1, FOXO3a 및 FOXO

로 구성되어있고, 주로 핵에 위치하고 핵에서 활성화된다고 알려져 있다. 즉, Akt에 의해 이들이 인산화되면 불활성화되어 핵 밖의 세포질로 이동하게 되고, Akt의 활성화가 감소되면, FOXO가 핵에서 활성화되어 atrogen-1과 MuRF1의 발현을 증가시켜 단백질을 분해한다²⁰⁾. 이를 바탕으로 glucoraphanin의 근위축 억제 효과의 기전을 더 알아보기 위해, Akt와 FOXO 구성원들의 단백질 발현 양상을 분석한 결과, dexamethasone에 의해 p-Akt, p-FOXO1 및 p-FOXO3a의 단백질 발현이 감소된 것을 glucoraphanin에 의해 억제되었고, 정상대조군보다 더 증가되었다는 것이 관찰되어졌다. 이를 통해 glucoraphanin이 Akt/FOXO 신호전달경로를 통해 근위축을 억제한다는 것을 알 수 있었다. 게다가 glucoraphanin의 근위축 억제 효과를 MHC의 형광염색을 통해 형광현미경 하에서 관찰하였는데, dexamethasone에 의해 감소된 근관세포의 직경이 glucoraphanin의 처리로 억제되어 정상대조군의 거의 비슷한 정도의 직경을 유지한다는 것을 육안으로 뚜렷이 확인할 수 있었다.

십자화과 식물에 함유되어 있는 2차 대사산물 glucosinolate는 유기화합물의 일종으로 질소와 황을 함유하고 있으며, 그 자체 또는 분해 산물은 오래전부터 알려져 온 물질로 통풍, 설사, 두통에 사용되기도 하였다²¹⁾. Glucoraphanin은 glucosinolate의 일종으로 본 연구를 통하여 근위축, 근육감소를 억제, 예방할 수 있다는 것을 다양한 실험을 통하여 입증하였다. 이를 함유하고 있을 것으로 예상되는 십자화과 한약재로는 개자(芥子, 겨자 종자), 나복자(萊菔子, 무의 종자), 나복(蘿蔔, 무의 뿌리), 나복엽(蘿蔔葉, 무의 잎), 대청엽(大靑葉, 대청의 잎)과 판람근(板藍根, 대청엽 뿌리), 운대(芸薹, 유채 어린잎), 운대자(芸薹子, 유채 종자), 산규근(山葵根, 고추냉이 뿌리)과 신엽(辛葉, 고추냉이 잎), 정력자(桴麩子, 꽃다지 또는 다닥냉이의 종자) 등의 여러 종류가 있다²²⁾. 따라서, 향후 이들을 이용하여 근위축 억제, 예방 및 치료에 대한 연구가 진행되어 효능이 입증된다면, 비만, 암, 만성 소모성 질환, 노화 및 다양한 근육질환에 한의학적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 glucoraphanin이 근관세포에 독성이나

근육분화 및 근위축을 유발하지 않으면서 C2C12 근관세포에서 dexamethasone으로 유도된 근위축을 억제 및 예방하는 효능을 가지며, 이는 Akt/FOXO 신호전달경로의 활성을 통하여 단백질 분해에 관여하는 ubiquitin-proteasome 시스템을 억제함으로써 근위축으로부터 근관세포를 보호하는 효능을 가진다는 것을 입증하였다. 이를 바탕으로 추후 동물모델에서도 근위축 억제 효능과 기전이 추가적으로 밝혀진다면 근위축의 예방, 치료 또는 개선을 위한 치료제, 한약 처방, 보조약물 및 건강보충제 등의 개발에 주요 소재로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2015R1D1A1A01060340).

References

1. Choe MA. Steroid induced muscle atrophy. Perspectives in Nursing Science 2005;2(1):19-36.
2. Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012;3(3):163-79.
3. Hwang YS. Recent Advance in Diagnosis of Muscle Disease. J Korean Med Assoc 1995;38(6): 719-26.
4. Simmons Z. Management strategies for patients with amyotrophic lateral sclerosis from diagnosis through death. Neurologist 2005;11(5):257-70.
5. Jagoe, R. T. and Goldberg, A. L. 2001. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 4, 183-190.
6. Kandarian, S. C. and Jackman, R. W. 2006. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. Muscle Nerve 33, 155-165.
7. Menconi M, Gonnella P, Petkova V, Lecker S, Hasselgren PO. Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting

- responses in cultured L6 and C2C12 myotubes. *J Cell Biochem* 2008;105:353-64.
8. Park C, Jeong JW, Choi YH. Induction of muscle atrophy by dexamethasone and hydrogen peroxide in differentiated C2C12 myotubes. *J Life Sci* 2017;27(12):1479-85.
 9. Srinibas, D., K.T. Amrishi, and K. Harjit. 2000. Cancer modulation by glucosinolates: A review. *Current Science* 79:1665-1671.
 10. Im SB, Lee SH, Kim YY, Kim JS, Kim DS, Lim YP. Construction of a full-length cDNA library from *Cardamine manshurica* Nakai and characterization of EST dataset. *Korean J Agric Sci* 2016;43:33-9.
 11. Abdull Razis AF, Noor NM. Naturally-occurring glucosinolates, glucoraphanin and glucoerucin, are antagonists to aryl hydrocarbon receptor as their chemopreventive potency. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(14):5801-5.
 12. Melrose J. The Glucosinolates: A sulphur glucoside family of mustard anti-tumour and antimicrobial phytochemicals of potential therapeutic application. *Biomedicines* 2019;7(3):62.
 13. Hong JY, Nam YJ, Kim MO, Kim HY. Discover bio future promising technologies in 2019. *Biotech Policy Research Center*. 2019;271(34).
 14. Kang YS, Park C, Han MH, Hong SH, Hwang HJ, Kim BW et al. Ethanol Extract of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. Reduces AICAR-induced Muscle Atrophy in C2C12 Myotubes. *J Life Sci* 2015;25(3):293-8.
 15. Kim Y, Kim CS, Joe Y, Chung HT, Ha TY, Yu R. Quercetin Reduces Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Muscle Atrophy by Upregulation of Heme Oxygenase-1. *J Med Food* 2018;21(6):551-9.
 16. Sakai H, Kimura M, Tsukimura Y, Yabe S, Isa Y, Kai Y et al. Dexamethasone exacerbates cisplatin-induced muscle atrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2019;46(1):19-28.
 17. Baek SJ, Kim DH, Kim JS. Review of the muscle plasticity. *J Korean Soc Phys Ther* 2003;15(2):239-47.
 18. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(2). pii: a008342.
 19. Song MY. Effect of Root of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi on myogenesis in C2C12 cells. *J Korean Med Obes Res* 2015;15:38-44.
 20. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* 2013;280(17):4294-314.
 21. Choi AR, Lee GS, Chae HJ. Effects of ultrasonication on the analysis of sulforaphane content in vegetables. *J Korea Acad Industr Coop Soc* 2008;9(3):794-9.
 22. Shin MK. *Clinical Traditional Herbalogy*. Seoul:Yeong Lim's Publisher. 2000.