



Original Article / 원저

Dexamethasone으로 유도한 근위축 세포모델에서 흑효모 배양물 유래 polycan의 근위축 개선에 대한 효과

황수진¹, 임종민², 구분화², 천다미², 정유진³, 김영숙^{2*}, 오태우^{4**}

¹대구한의대학교 제약공학과, ²(주)글루칸, ³한국화학연구원
정밀화학융합기술연구센터, ⁴한국한의학연구원 한의기술응용센터

Effects of polysaccharide (polycan) derived from black yeast in dexamethasone-induced muscle atrophy cell model

Su-Jin Hwang¹, Jong-Min Lim², Bon-Hwa Ku², Da-Mi Cheon², Yu Jin, Jung³,
Young-Suk Kim^{2*} and Tae Woo Oh^{4**}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University

²Glucan Co. Ltd.

³Research Center for Advanced Specialty Chemicals, Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT)

⁴Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM)

ABSTRACT

Objectives : This study was conducted to evaluate the anti-atrophic effect of polycan in dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy in vitro model.

Methods : C2C12 myoblast were differentiated into myotube by 2% horse serum medium for 6 days, and then treated polycan extract at different concentrations for 24h. The effect of dexamethasone on the induction of muscle atrophy and expression of atrophy-related genes in differentiated C2C12 myotubes using a GSH, ROS, real-time PCR, western blots analysis.

Results : The results showed that Treatment with polycan (100 and 200 $\mu\text{g/ml}$) noncytotoxic levels on both myoblast and myotube. Polycan decreased the ROS level overproduced with dexamethasone and improved the depletion of GSH level. Dexamethasone showed a decrease in myotube diameter, which was associated with up-regulation muscle-specific ubiquitin ligases markers, such as atrogin-1, FoxO3, myostatin and muscle RING finger-1 (MuRF1), and down-regulation of myogenin, MEF2, Myogenic regulatory factor 5, 6 and MyoD. The results showed that polycan treatment significantly dose-dependently inhibited it. Furthermore, decreased expressions of PI3K/Akt signal pathway by dexamethasone were reversed by treatment with polycan.

Conclusions : Thus, polycan suppresses dexamethasone induced muscle atrophy in C2C12 myotube *in vitro* model through activation of PI3K/Akt pathway and protective effect of improve skeletal muscle function.

Key words : Polycan, β -glucan, C2C12 myotubes, dexamethasone, anti-atrophic effect.

I. 서론

최근 우리나라는 총 인구 중에 65세 이상의 고령자의 비율이 점점 증가하고 있으며, 많은 임상적 추적 연구를 통하여 노령화 진행에 따른 근육량과 골밀도의 감소는 대표적인 생리적 변화이며, 이에 대하여 경제적 사회적 문제가 대두되고 있는 상황이다¹⁾. 근감소증의 정이는 나이가 많아짐에 따라 근육의 양, 근력, 근 기능이 모두 감소하는 질환을 의미한다. 근 위축(muscle atrophy)은 노화, 영양부족 및 만성질환 등과 같은 여러 가지 원인에 의하여 유발되며, 단백질 합성 조절, protease 활성화, ubiquitin conjugation 및 autophagy 등과 같은 많은 세포 내 변화가 관여하는 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 이러한 근위축은 삶의 질 감소 및 병적 악화, 그로인한 사망률을 증가시키는 원인이 될 수 있기 때문에 이와 관련된 기전을 규명하기 위한 많은 연구가 진행되고 있으나, 명확한 기전은 알려진 바가 없다. 합성 glucocorticoid인 dexamethasone은 생체 내 또는 배양 세포에서 근육에서의 단백질 합성 속도를 감소시키고 단백질 분해 속도를 증가시키는 것으로 알려져 있으므로 생체 내 또는 배양세포에서 근육 단백질 분해를 유도하기 위하여 사용되고 있다^{4,5)}. 최근 연구에 따르면 스테로이드에 의한 근위축 기전으로 ubiquitin-proteasome의 활성화 및 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

의 생성억제와 근육성장 억제인자인 myostatin의 분비 증가가 알려져 있다. 특히, 근위축 모델에서 muscle-specific ubiquitin ligase에 해당되는 atrogin-1/muscle atrophy F-box (MAFbx)와 muscle RING finger-1 (MuRF1)의 발현이 10배 이상 증가함으로써 직접적으로 근육 단백질 분해에 관여하며, 이와 동시에 myogenic differentiation에 관여하는 muscle-specific transcription factor인 myogenin 및 MyoD와 같은 유전자들의 발현이 감소하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. Ubiquitin-proteasome 경로를 활성화하는 또 다른 경로는 산화 스트레스가 있는데, 이는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성함으로써 myosin 발현의 감소 및 근 단백질 파괴를 증가시키는 것으로 보고되고 있다^{7,8)}.

한의학에서는 노쇠에 대한 개념이 이미 형성되어 있으며, 이는 황제내경(黃帝內經)의 소문(素問)에 기재되어 있다⁹⁾. 즉, 한의학의 중요한 개념 중 오장(五臟)의 간심비폐신(肝心脾肺腎)이 있고, 그 중 하나인 신장은 선천지기(先天之氣)가 축적되어있는 장기로, 성장, 발육, 생식, 노쇠를 주관하며 노화현상은 신장의 기능 허약과 쇠약을 의미한다. 신허에 의해 발생되는 증상은 탈모, 백발, 난청, 이명, 요통, 골다공증, 배뇨장애, 실금, 하지 냉증 및 피로감이 있으며, 이에 대한 치료는 양방의학에서는 대체처방을 하지 않, 한의학에서는 한약의 다성분계로 신의 기능저하

*Corresponding author: Young-Suk Kim. Glucan Co. Ltd., 25-15, Worasan-ro, 950 beon-gil, Munsan-eup Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52840, Republic of Korea

Tel : +82-55-762-0275, Fax : +82-55-761-0285, E-mail : kys0725@glucan.co.kr

**Corresponding author: Tae Woo Oh. Korean Medicine Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 70, Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu, 41062, Republic of Korea.

Tel : +82-53-940-3833, Fax : +82-53-940-3899, E-mail : taewoo2080@kiom.re.kr

•Received : February 8, 2021 / Revised : February 20, 2021 / Accepted : February 21, 2021



에 따른 보신약(補腎藥)을 사용한다. 대표적인 보신약으로는 육미환(六味丸), 팔미지황환(八味地黃丸), 우차신기환(牛車腎氣丸)이 있다.

최근에는 천연물에 대한 인식 제고로 인하여 천연물 및 천연물로부터 분리된 성분 및 생리활성물질 등을 이용한 기능성 식품, 식품 소재와 대체의학의 개념으로 생리활성물질을 이용한 기능성 식품의 수요가 증가함에 따라 약용식물을 비롯한 천연물 소재의 식품 산업적 이용이 증가하고 있는 추세에 있으며, 이러한 요구에 부응하여 천연물을 대상으로 항염증, 항산화, 면역증진 효과 등 생리활성에 대하여 효과를 보이는 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 많은 연구가 이루어지고 있으며, 면역증강에 대하여 주목을 받고 있는 천연추출물 중 β -glucan은 내성이 없으며, 면역조절제와 더불어 항염증 및 항암에 대한 생리활성 효과가 입증되면서 바탕으로 다양한 생리활성 분야에서 활용되고 있다¹⁰⁻¹²). 특히 흑효모 *Aureobasidium pullulans* SM-2001에서 유래된 β -glucan의 일종인 polycan의 경우¹³), 골생성 촉진 및 골 소실에 대한 효능이 있으며, 이와 더불어 항염증 작용을 가지고 있으며^{14,15}), 염증성 사이토카인의 일종인 IL-1 β , IL-6와 TNF- α 를 감소시키며¹⁶), 비스테로이드 항염증제와 복합투여시 항염증활성을 증가시키는 효과가 있다고 보고되었다¹⁷). 이에 본 연구에서는 흑효모균 *Aureobasidium pullulans* 으로부터 분리한 polycan에 대하여 근감소증에 미치는 영향을 살펴보고자 C2C12 세포주에 dexamethasone으로 유도하여 근 감소 세포모델을 제작하였고, 그에 대한 개선 효과에 대하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) Polycan 제조

본 실험에 사용한 polycan은 흑효모 *Aureobasidium pullulans* SM-2001으로 발효된 β -glucan으로, 이전 연구에 따르면 β -1,3/1,6-glucan (β -1,3 linkage 68: β -1,6 linkage 32)이며, 평균 분자량은 2.6×10^5 Da이다¹⁸). 실험에 사용한 β -glucan은 ㈜글루칸에서 제공받아 실험에 사용하였다.

2) 세포배양 및 근 손실 유도

C2C12 cells은 ATCC[®]를 통하여 구입하였으며, myoblast로, 세포배양은 이미 보고된 선행연구의 방법⁴)에 따라 다음과 같이 시행되었다. C2C12 cell은 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 μ g/ml)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's) 배지로 배양되었다. C2C12 Cells은 75 cm² flask(Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 myotube로 분화를 유도하기 위하여 2% horse serum 및 1% penicillin이 첨가된 DMEM 배지로 6일 동안 배양 2 일 간격으로 교체하여 유도하였다. 한편 약물 처리는 근 위축 유도 하루 전에 처리하였으며, 근 위축 유도는 10 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 24시간 동안 처리하여 유도하였다.

2. 방법

1) 세포독성평가 (cell cytotoxicity assay)

약물에 의한 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay 방법을 이용하였다. 배양한 C2C12 cell를 96well plate에 1×10^5 cell/ml 농도로 200 μ l씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. C2C12 cell에 각각 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μ g/ml 농도의 polycan 시료를 처리한 후 24시간 반응시킨 후 5 mg/ml (DPBS)의 MTT 시약을 media에 5배 희석한 용액 100 μ l/well씩 분주 한 후 1시간 incubator에서 반응시켰다. 상층액을 제거 후 formazon을 DMSO 100 μ l씩 처리해 용해시킨 후, palatte를 마이크로 판독기(SpectraMax i3, Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Glutathione(GSH) 함량 측정

세포 내 GSH 함량을 측정하기 위하여 Glutathione assay kit를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. polycan 추출물을 각각 100, 200 (μ g/ml)의 농도로 처리하여 실험이 이루어졌으며 상층액의 GSH 함량은 glutathione assay kit(Cayman Co, USA)를 이용해 측정하였다. 상층액 50 μ L씩에 kit 내에 있는 assay cocktail을 150 μ L씩 넣어 암소 상태로 microplate shaker로 교반 후, microplate reader 를 이용해 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Reactive Oxygen Species(ROS) 함량 측정

C2C12 근육세포에서 세포 내 ROS 수준을 측정하기 위해, 24 well plate에 2×10^5 cells/mL로 분주하여 24시간 배양하였다. 세포가 90% 자랐을 때 2% HS 및 1% P/S를 함유한 DMEM으로 교체하여 분화를 유도하였으며, 배지는 2일마다 교체해주었다. 분화가 완료된 6일째에 polycan 추출물을 각각 100, 200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 처리하였으며, 24시간 뒤에 PBS로 씻어주고 10 μM dexamethasone을 처리하여 근 위축을 유도하였다. 그 후 PBS로 씻어주고 각 well에 10 μM DCF-DA 1 mL씩 분주하여 30분 동안 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. 30분 후 PBS로 씻어주고, 각 well에 PBS 1 mL씩 분주한 다음 microplate reader(SpectraMax i3, Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 excitation 485/20, emission 528/20에서 형광도를 측정하여 세포 내 ROS 수준을 측정하였다.

4) Quantitative RT-PCR

C2C12 cell를 3×10^5 cells/well로 6-well culture dish에 분주해 24시간 동안 배양하였고, 이후 6일 동안 분화를 유도하였으며, 근손실을 유도하기 24시간 전 polycan 추출물을 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하였다. 근 손실이 유도된 후 media를 제거한 뒤 PBS를 이용하여 세척하고 RNeasy® mini kit(Aiagen, Hilden, Gerbany)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 Spectrophotometer(Nanodrop)을 통하여 정량해, 1 μg RNA를 Maxima first strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR(Thermo scientific, Waltham, USA)를 이용하여 complementary DNA(cDNA)를 합성하였다. PCR bio syGreen blue Mix(PCR Biosystems, Pennsylvania, USA) 10 μl 와 primer 2 μl 가 포함된 혼합물 19 μl 와 cDNA 1 μl 를 polymerase chain reaction (PCR) 사이클을 40회 수행하였다. 증합 효소 반응에 쓰인 primer의 정보는 Table 1에서 나타내었다.

5) Western blot

C2C12 cell로부터 분화 및 근 손실 관련 단백질의 발현을 Western blot으로 측정하였다. 먼저, C2C12 cell에 독성이 없는 농도범위에서 polycan을 100,

200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 후 근 손실을 유도하기 위하여 dexamethasone을 24시간 처리 하였다. 각 세포를 1× PBS로 3회 세척 후 lysis buffer(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin) 0.1 ml로 lysis시켰다. 이를 12,000 rpm에서 20 분 원심 분리함으로써 단백질을 분리하였다. 분리된 각 단백질의 농도를 protein assay solution으로 정량한 다음, 30 μg 단백질을 5×sample buffer와 섞어 8-15% SDS-PAGE를 통해 분리하였다. 분리된 gel 상의 단백질을 NC membrane으로 transfer시키고 각 membrane은 5% BSA로 실온에서 1시간 blocking하였다. membrane에 분화 및 세포사멸, 근손실 관련 일차항체를 넣어 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 0.05% Tween이 들어간 TBS로 3회 세척하였다. Membrane에 다시 anti-IgG conjugated HRP 항체를 넣은 후 1시간 동안 실온에서 반응시키고 0.05% Tween이 포함된TBS(1×TTBS)로 3회 세척하여 ECL용액을 이용하여 ChemiDoc™ touch imaging system (BioRad, California, USA)를 이용하여 분석하였다.

Table 1. Specific primer sequences for PCR

Target	Primer Sequences	
MyoD	Forward	5'-GATGGCATGATGGATTACAG-3'
	Reverse	5'-CTCCACTATGCTGGACAGG-3'
Myogenin	Forward	5'-AGTACATTGAGCGCCTACAG-3'
	Reverse	5'-GACGTAAGGGAGTGCAGATT-3'
Atrogin-1	Forward	5'-CTGCCGTGTGTGCTTACAAC-3'
	Reverse	5'-TGCTCTCTTCTTGGGTAACA-3'
Myf5	Forward	5'-TGAGGGAACAGGTGGAGAAC-3'
	Reverse	5'-AGCTGGACACGGAGCTTTTA-3'
Myf6	Forward	5'-ATTCTTGCGGGTGCGGATTT-3'
	Reverse	5'-ACGTTTGCTCCTCCTTCCTT-3'
MEF2	Forward	5'-TCCATCAGCCATTTCAACAA-3'
	Reverse	5'-GTTACAGAGCCGAGGTGGAG-3'
FoxO3	Forward	5'-ACAAACGGCTCACTTTGTCC-3'
	Reverse	5'-GTGCCGATGGAGTTCTTC-3'
Myostatin	Forward	5'-CTGTAACCTTCCCAGGACCA-3'
	Reverse	5'-GCAGTCAAGCCAAAGTCTC-3'
MuRF1	Forward	5'-TGCCTACTTGCTCCTTGTGC-3'
	Reverse	5'-CACCAGCATGGAGATGCAGT-3'

6) 통계처리

모든 실험 결과는 GraphPadprism 5.0 통계 프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean±SD)로 계산하였으며 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA로 분석하였으며, 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 평가하였다.

III. 결과

1. 세포 독성 평가

polycan 추출물에 대한 세포 독성 및 적정 농도의

범위를 알아보기 위하여 C2C12 cell에 근아세포(myoblast) 및 이를 분화시킨 근관세포(myotube)에서 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 후 24시간 배양하여 MTT assay 방법으로 세포독성을 측정하였다. 그 결과, C2C12 근아세포의 생존율에는 영향을 미치지 않았으며 (Fig. 1A), C2C12 근관세포에도 같은 조건으로 polycan을 처리한 후, 세포 생존율을 측정한 결과, 실험 한 모든 농도에서 근관세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다 (Fig.1B). 모든 농도에서의 세포 생존율이 90% 이상을 나타내는 것으로 보아 세포독성은 거의 없는 것으로 판단되어 이후의 실험에서는 최대 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지 사용하였다.

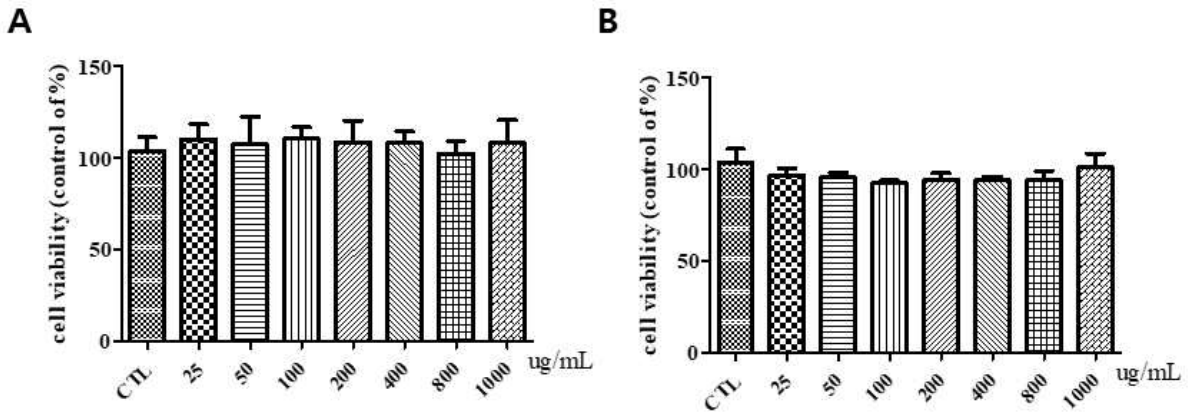


Fig. 1. Cell viability of C2C12 cells treated polycan extract. (A) Cytotoxic effects of polycan in C2C12 myoblast cell. (B) Cytotoxic effects of polycan in C2C12 myotube cell.

2. 덱사메타손으로 유도된 근관 세포에서 Glutathione 및 ROS 생성에 대한 효과

Polycan의 glutathion 및 ROS의 생성에 대한 효능을 평가하기 위하여 C2C12 세포를 myotube로 분화시킨 후 polycan을 24시간 처리하고, dexamethasone으로 근 위축을 유도하였다. dexamethasone을 단독으로 처리하였을 때, 대조세포와 비교하여 GSH는 10 μM 의 dexamethasone을 처리하였을 때, 대조군에 비해 세포 내 GSH 농도가 40% 감소하였다(Fig. 2A). 그

러나 세포에 polycan(100, 200 $\mu\text{g/mL}$)를 전 처리한 후 dexamethasone을 처리한 군에서는 GSH 농도가 대조군 대비 100 $\mu\text{g/mL}$ 군에서는 60.86 \pm 4.03%, 200 $\mu\text{g/mL}$ 군에서는 84.26 \pm 1.85%로 유의하게 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 또한 ROS의 생성량은 dexamethasone 처리군에서는 대조군 대비 160.50 \pm 1.03 증가하였으며, 약물 처리군에서는 60% 정도의 유의적인 억제 효능을 나타내었다 (Fig. 2B).

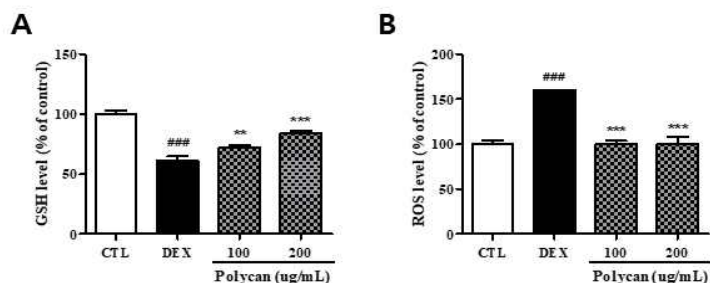


Fig. 2. The Effect of polycan on GSH(A) and ROS(B) levels in C2C12 myotubes. C2C12 cells were treated with dexamethasone (10 μ M) with various concentration of polycan (0, 100 and 200 μ g/ml) for 24h. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. ^{###} $p < 0.001$ vs. CTL ; ^{**} $p < 0.01$ and ^{***} $p < 0.001$ vs. Dex group.

3. 근육 생성 및 근육세포 단백질 분해에 관련된 mRNA 발현 변화에 대한 효과

C2C12 cell을 myotube로 분화시킨 후 dexamethasone 으로 근 위축을 유도한 모델에 polycan 추출물이 세포내 근육세포 생성 및 단백질 분해 인자에 영향을 미쳤는지 확인하기 위하여 근위축 유도 24시간 전 polycan을 처리하여 mRNA의 발현을 살펴보았다. Fig. 3는 근육세포 생성에 관여하는 전사인자 및 근육세포 단백질 분해인자에 대하여 mRNA 발현량 변화를 검토한 결과로, polycan 추출물을 처리시, 근육세포 생성에 관여하는 전사인자인 인 MyoD, Myogenin, MEF2, Myf5, Myf6의 mRNA 발현량 변

화를 검토한 결과, dexamethasone을 처리시 대조군 대비 약 40%로 감소하는 경향을 보였으며, polycan 처리군에서는 농도의존적으로 유의하게 증가함을 알 수 있었다. 또한 polycan 추출물과 근육세포 단백질 분해에 관여하는 MuRF1, Atrogin-1, FoxO3, Myostatin에 대하여 mRNA 발현량 변화를 검토한 결과, Fig. 3와 같이 dexamethasone 처리에 의해 MuRF1과 Atrogin-1의 경우 대조군 대비 약 4배정도 발현되었고, FoxO3a 및 Myostatin의 경우 2~3배 정도 증가함을 알 수 있었다. 한편 polycan 추출물에서 100, 200 μ g/ml 농도에서 mRNA 발현량이 농도 의존적으로 대폭 감소됨을 확인하였다.

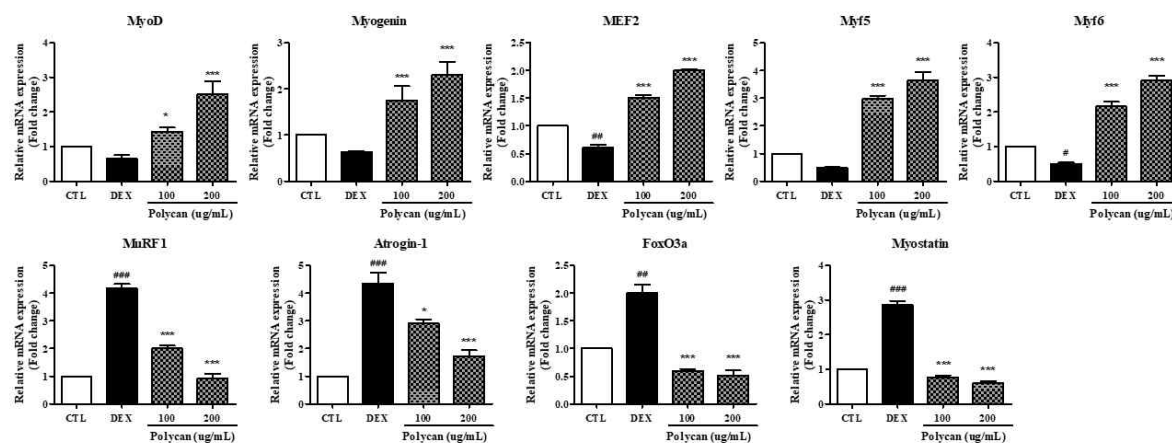


Fig. 3. Effect of polycan on the Dexamethasone induced muscle atrophy in C2C12 myotube. Total RNAs were extracted using Trizol reagent and mRNA was measured using qRT-PCR. The fold changes relative to the control were calculated using the $\Delta\Delta$ CT method for mRNA expression levels of muscle-specific transcription genes. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$ and ^{###} $p < 0.001$ vs. CTL ; ^{*} $p < 0.05$ and ^{***} $p < 0.001$ vs. Dex group.

4. 근위축 억제 신호전달 경로에 대한 단백질 발현 변화에 대한 효과

골격근 비대의 주요한 조절인자인 Akt 신호 활성화는 근위축 모델에서는 감소된 형태로 관찰된다. Polycan의 근위축 억제 효과에 대한 작용 기전을 알아보기 위하여 C2C12 근관세포에 polycan과 dexamethasone을 24시간 동안 처리한 후, 단백질 합성 및 분해와 관련된 신호전달경로의 인자인 FOXO3a, MuRF1, Akt 및 PI3k 단백질을 western blot을 통하여 확인해 보았다. 예상된 바와 같이, dexamethasone 처리는 FoxO3a 및 MuRF1의 수준을 유의하게 증가시켰

으며, polycan의 처리군에서는 농도의존적으로 회복되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 한편 p-Akt 및 PI3k의 경로에서는 dexamethasone의 처리군에서는 발현양이 유의하게 감소시켰으나, polycan을 처리한 경우, 실험에 사용된 모든 농도 범위의 polycan에서 p-Akt 및 p-PI3k를 증가시켜 정상대조군과 유사한 수준으로 회복되는 것이 확인되었다(Fig. 4). 이러한 결과를 통하여, polycan이 Akt/FOXO 신호전달을 활성화시킴으로써 근위축으로부터 보호 효과를 가진다는 것을 알 수 있었다.

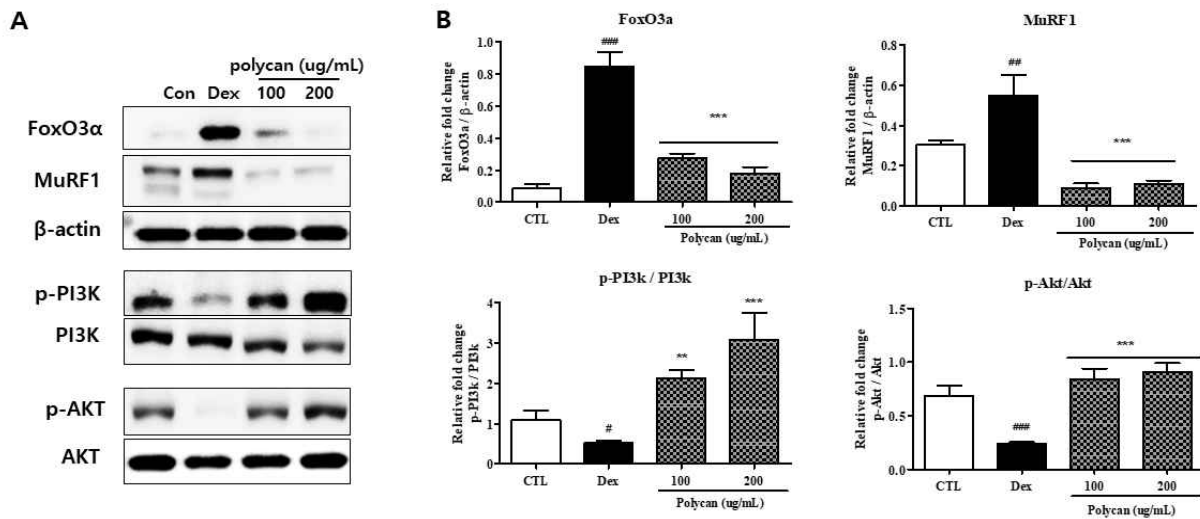


Fig. 4. atrophy-related proteins in dexamethasone treated C2C12 myotubes. The expression of FoxO3α, MuRF1 and PI3k/Akt proteins was assayed by western blot in cells treated with Polycan in the absence or presence of 10μM dexamethasone for 24 h. The intensity of the protein band was normalized against the internal control β-actin. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs. CTL ; **p<0.01 and ***p<0.001 vs. Dex group.

IV. 고찰

전 세계적으로 고령화가 지속되고 있는 추세에 건강 강한 삶과 길 높은 삶에 대한 욕구가 높아지고 있는 가운데, 많은 추적연구를 통하여 노인에게 발생하는 생리적 변화 및 질환에 대한 평가가 지속적으로 이루어지고 있다. 노령화에 따라 가장 보편적인 신체적 변화는 근골격계의 약화 및 지방량의 증가이며, 골격계 감소의 결과는 골다공증 및 골절의 위험율에 대한

증가로 나타난다¹⁹⁾. 특히 연령이 증가함에 따라 근육량의 감소는 신체장애, 삶의 질 저하, 사망의 위험율을 증가시킴으로써 단순한 근육량과 근력의 손실이 아니라 노령화(frailty)의 전조이자 만성질환에서의 사망률 증가의 예측변수를 나타낸다²⁰⁻²²⁾. 따라서 최근 근육건강에 대한 관심이 증가하면서, 건강기능식품 또는 건강 보조식품을 통하여 실제로 운동을 하지 않아도 운동효과를 나타낼 수 있으면서 근육노쇠와 같은 노인성 질환을 예방할 수 있는 소재 개발이 활

발히 이루어지고 있으며, 특히 안전하고, 약리적인 효능이 뛰어난 한의학 기반 본초, 방제 및 천연물로부터 새로운 소재를 발굴하고자 많은 연구가 수행되고 있다. 이러한 연구 동향에 따라 본 연구에서는 면역 기능을 활성화하고 항염증인 효과가 있는 β -glucan에 대하여 그 효능을 검증하고자 하였다. β -glucan은 포도당이 β -1,3에 결합을 중심으로 중합된 다당류를 통칭하며, 다당류의 일종으로 효모, 조류, 박테리아 등에 존재하는 생리활성 물질로서, β -1,3 결합의 기본구조에 β -1,4결합이 가지형태를 이루는 분자구조를 가지고 있다²³). 특히 *Aureobasidium pullulans* 균주에 의하여 생산된 β -glucan인 polycan은 β -1,3/1,6- 결합의 분자 구조를 가짐으로써 THP-1 cell을 자극하여 면역을 활성화시키는 인지 및 염증성 사이토카인을 감소시키는 생리활성 촉진 능력이 우수하다고 알려져 있다²⁴). 따라서 본 연구에서는 근아세포(myoblast)에서 근관세포(myotube)로의 분화과정을 구축하고, 분화가 유발된 myotube에서 dexamethasone을 이용하여 인위적인 근위축 유도한 모델에 polycan의 효능을 평가하였다.

먼저 근위축에 대한 효능을 알아보기 전에 polycan 약물에 대하여 근아세포 및 근관세포에 영향이 있는지 확인을 하기 위하여 polycan을 농도별로 처리하였다. 독성이 있는지 알아보기 위해, 일반적으로 단일성분의 세포 처리 농도 범위인 25 ~ 1000 μ g/ml 범위로 처리한 후 세포생존율을 분석한 결과 근아세포 및 근관세포에 독성을 나타내지 않는다는 것을 확인하였으며, 약물의 효능평가를 위하여 200 μ g/ml을 최대 용량으로 하여 실험을 진행하였다.

골격근 세포는 다핵성 조직을 이루고, 다핵의 근관 조직이 근육을 형성하게 되는데, 나이가 들어가면서 근육의 분화가 감소하고, 근력이 약화되는 근감소증에서는 근육세포에 활성산소가 생성되고 이로 인하여 산화스트레스가 유발되어 노화를 촉진하게 된다. 세포 내 활성산소에 대한 방어기전으로는 크게 비효소적 분자와 항산화 효소로 크게 2가지의 효소로 나눌 수가 있는데, 비효소적 분자인 세포 내 glutathione은 GPx가 기전에 대하여 항산화 대사 작용을 위해 필요한 전자를 내어주며, singlet oxygen과 함께 hydroxyl radical을 제거하는 역할을 한다²⁵). 또한, 지질 과산화(lipid peroxidation)의 환원에 관여함으로써, glutathione이 여러 활성증가물질과 결합

(conjugation)을 이루어 GST와 같은 효소의 작용으로 소변으로 배설되게 함으로써 체내의 독성물질을 제거하는 역할을 한다. 본 연구에서는 dexamethasone으로 유도한 근위축 세포모델에서 GSH의 함량을 측정 한 결과 dexamethasone으로 감소된 GSH 함량이 polycan 처리에 의하여 증가함을 확인하였다. 한편, ROS는 정상 세포의 기능 수행을 위한 중요한 신호전달분자로서 그 기능을 하지만, 비정상적으로 증가된 ROS는 근육세포의 기능장애 및 근세포의 손상을 일으킴으로써 세포 죽음을 야기하는 인자로 작용한다. 본 연구에서는 dexamethasone이 myotube 세포 내 ROS의 과다 증가를 유도하였으나 polycan의 전 처리로 인해 ROS 수준의 변화가 억제됨을 확인하였다. 근위축은 ubiquitin-proteasome 경로의 활성화를 통한 근육 단백질의 분해에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다^{1,5}). 근육 생성 전사인자(myogenic transcription factors) 중 일차 근육 생성 조절인자로 분류되는 MyoD와 Myf-5는 근육모세포로 유도하는 역할을 하며 이차 근육 생성 조절인자인 myogenin과 Myf-6, myocyte enhancer factor 2(MEF2)는 근육모세포를 근관세포로 분화시키는 역할을 한다^{26,27}). 또한 근육에 발현되는 Myostatin은 transforming growth factor- β (TGF- β) family로 Akt/mTOR/p70S6K signaling을 낮추어 골격근 비대를 억제시키는 근육 세포 특이적으로 발현되는 억제 물질이다. 또한 골격근에서 특이적으로 발현되는 F-box type E3 ligase인 MAFbx/atrogen-1 및 Ring Finger 유형의 E3 ligase인 MuRF1은 근위축을 유발하는 다양한 조건에서 증가하여 세포주기 억제 및 근육 특이적인 유전자 발현의 활성화를 통한 myogenic differentiation에 관여하는 myogenin과 MyoD의 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다^{1,3,8,27}). 따라서 본 연구에서는 dexamethasone에 의하여 유발된 근위축 현상에서 polycan의 효능이 근육세포 생성 및 분해에 관여하는 전사인자에 대하여 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 dexamethasone 처리에 의하여 근위축이 유발되는 조건에서 근육세포 생성에 관여하는 MyoD, myogenin, MEF2, Myf5, Myf6의 경우 대조군에 비하여 mRNA의 발현이 감소함을 확인 할 수 있었으며, polycan처리에 의하여 증가가 유발되었다. 또한 근육세포 단백질 분해에 관여하는 muscle-specific transcription factor들 중



Forkhead box O(FoxO)의 활성화는 자가포식작용 관련 단백질을 유도하여 자식작용 신호전달체계를 촉진하며, FoxO의 활성화는 세포 내 mTOR의 발현 억제제를 통해 세포 성장에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 노화된 골격근에서 억제된 자가포식작용이 단백질 전환의 손상으로 인해 변형된 단백질 축적으로 결국 항상성과 생존 유지에 요구되는 다양한 생물학적인 경로의 항상성을 저하시켜 근섬유의 변성과 약화의 원인이 되어 노화 촉진 작용에 관여함으로써 insulin-like growth factor1/PI3K/Akt 신호전달경로를 통하여 PI3K와 Akt signal을 활성화시켜서 mTOR를 조절함으로써 자가포식을 조절한다²⁸⁾. 한편, FoxO3의 경우에는 세포 순환 조절, 분화, 증식과 같은 세포 생존에 이르는 여러 세포 기능에 관여하며, 지속적인 FoxO3a의 활성화는 단백질 분해를 유도하여 근소모증 유발하는 것을 알려져 있다²⁹⁾. 본 연구에서는 polycan의 근위축 억제 효과의 기전을 확인 하기 위하여 dexamethasone으로 유도된 근손실모델에서 PI3K/Akt와 FoxO3의 단백질 발현 양상을 분석한 결과, dexamethasone에 의해 p-Akt 및 p-PI3k의 단백질 발현이 감소된 것을 polycan에 의해 향상됨을 확인하였고, MuRF1 및 FoxO3의 경우 dexamethasone에 의해 증가된 단백질의 발현이 약물에 의하여 감소함을 확인하였다. 이를 통해 polycan이 Akt/FOXO 신호전달경로를 통해 근위축을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과들로 dexamethasone에 의해 유도된 근손실에 대하여 polycan의 근감소 효능을 확인하였다. polycan은 근육세포 생성 전사인자들을 활성화하고, 근육세포 단백질 분해 인자들을 억제함으로써 dexamethasone에 의한 근손실 모델에서 근감소 효능을 확인 할 수 있었다.

V. 결론

본 연구에서는 dexamethasone을 처리한 근위축 모델에서 β -glucan인 polycan의 근 감소효과를 확인하였다. Polycan이 근육세포에 독성을 유발하지 않으면서 dexamethasone으로 유도된 근위축 세포모델에서 PI3K/Akt 신호전달경로를 통하여 단백질 생성 및 분해에 관여하는 ubiquitin-proteasome 시스템에 작용함으로써 근위축으로부터 근관세포를 보호하는

효능을 가진다는 것을 입증하였다. 이를 바탕으로 추후 동물모델에서도 근위축 억제 효능 및 예방, 치료 효과가 추가적으로 밝혀진다면 polyca이 노화와 연관된 근육 관련 제품화에 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Jagoe RT, Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001;4:183-190.
2. Ammar A, Turki M, Chtourou H, Hammouda O, Trabelsi K, Kallel C, Abdelkarim O, Hoekelmann A, Bouaziz M, Ayadi F, Driss T, Souissi N. Pomegranate Supplementation Accelerates Recovery of Muscle Damage and Soreness and Inflammatory Markers after a Weightlifting Training Session. *PLoS One*. 2016;11(10)
3. Kandarian, SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2006;33:155-165.
4. Jesinkey SR, Korrapati MC, Rasbach, KA, Beeson CC, Schnellmann RG. Atomoxetine prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;351:663-673.
5. Marinovic AC, Zheng B, Mitch WE, Price SR. Tissue-specific regulation of ubiquitin (UbC) transcription by glucocorticoids: in vivo and in vitro analyses. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292:F660-666.
6. Denison HJ, Cooper C, Sayer AA, Robinson SM. Prevention and optimal management of sarcopenia: a review of combined exercise and nutrition interventions to improve muscle outcomes in older people. *Clin Interv Aging*. 2015;10:859-69.
7. Li YP, Chen Y, Li AS, Reid MB. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285:C806-812.

8. Lawler JM, Song W, Demaree SR. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:9-16.
9. Habukuihakwon. youngchu-kyungkyosuk. Beijing: Inminwisheng publisher; 1982:161.24
10. Chan GCF, Chan WK, Sze DMY: The effect of β -glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol.* 2009;2:1-11.
11. Song HS, Moon KY: In vitro antioxidant activity profiles of β -glucan isolated from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. *Food Sci Biotechnol.* 2006;15:437-440.
12. Novak M, Vetvicka V: Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *J Immunotoxicol.* 2008;5:47-57.
13. Tecucianu JF: Double-blind clinical study of a titrated extract of an unsaponifiable fraction of *Zea mays* (L) on gingival inflammation. *Inf Dent.* 1975;57:21-32.
14. Shin HD, Yang KJ, Park BR, Son CW, Jang HJ, Ku SK: Antiosteoporotic effect of polycan, beta-glucan from *Aureobasidium*, in ovariectomized osteoporotic mice. *Nutrition.* 2007;23:853-860.
15. Song HB, Park DC, Do GM, et al.: Effect of exopolymers of *Aureobasidium pullulans* on improving osteoporosis induced in ovariectomized mice. *J Microbiol Biotechnol.* 2006;16: 37-45.
16. Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* 2009;2:doi: 10.1186/1756-8722-2-25.
17. Kim JH, Kim KR, Jin HJ, Im SU, Song KB, Choi YH. The Effect of Polycan-Calcium Gluconate Complex on Inflammatory Mediators from Periodontitis Patients. *J Dent Hyg Sci.* 2014;14(2):223-229.
18. Seo HP, Kim JM, Shin HD, Kim TK, Chang HJ, Park BR, Lee JW. Production of β -1,3/1,6-glucan by *Aureobasidium pullulans* SM-2001. *Kor J Biotechnol Bioeng.* 2002; 17:376-380.
19. Faulkner JA, Larkin LM, Claflin DR, Brooks SV. Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin. Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(11):1091-1096.
20. Cebon Lipovec N, Schols AMWJ, van den Borst B, Beijers RJHCG, Kosten T, Omersa D, Lainscak M. Sarcopenia in advanced COPD affects cardiometabolic risk reduction by short-term high-intensity pulmonary rehabilitation. *J Am Med Dir Assoc.* 2016;17(9):814-820.
21. Park SH, Park JH, Song PS, Kim DK, Kim KH, Seol SH, Kim HK, Jang HJ, Lee JG, Park HY, Park JS, Shin KJ, Kim DI, Moon YS. Sarcopenic obesity as an independent risk factor of hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2013;7(6):420-425.
22. Kim JK, Choi SR, Choi MJ, Kim SG, Lee YK, Noh JW, Kim HJ, Song YR. Prevalence of and factors associated with sarcopenia in elderly patients with end-stage renal disease. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 2014;33(1):64-68.
23. Kraus J, Blaschek W, Schutz M, Franz G. Antitumor activity of cell wall β -1,3/1,6-glucans from *Phytophthora* species. *Planta Medica.* 1992;58:39-42.
24. Keum BR, Hyeon JY, Choe SH, Jin JY, Jeong JW, Lim JM, Park DH, Cho KK, Choi EY, Choi IS. β -glucan Stimulates Release of TNF- α in Human Monocytic THP-1 Cells. *J Life Sci.* 2017;27(11):1256-1261.
25. Esther A, Joan AB, Josep R, Jose CF. Glutathione Depletion Impairs Myogenic Differentiation of Murine Skeletal Muscle C2C12 Cells through Sustained NF- κ B Activation. *Am J Pathol.* 2004;165(3):719-728.
26. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2). pii: a008342.

27. Song MY. Effect of Root of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi on myogenesis in C2C12 cells. *J Korean Med Obes Res.* 2015;15:38-44.
28. Kovacheva EL, Hikim AP, Shen R, Sinha I, Sinha-Hikim I. Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways. *Endocrinology* 2010;151:628-638.
29. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:14440-14445.