

Research Note



Isorhamnetin의 근육세포 미토콘드리아 기능조절에 미치는 효과

이막순 ¹, 김양하 ^{1,2}

¹이화여자대학교 식품영양학과

²이화여자대학교 시스템헬스융합전공

Effects of isorhamnetin on the regulation of mitochondrial function in C2C12 muscle cells

Mak-Soon Lee ¹ and Yangha Kim ^{1,2}

¹Department of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, Seoul 03670, Korea

²Graduate Program in System Health Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 03670, Korea

OPEN ACCESS

Received: Jul 14, 2021

Revised: Aug 12, 2021

Accepted: Aug 13, 2021

Correspondence to

Yangha Kim

Department of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, 52 Ewhayeodae-gil, Seodaemun-gu, Seoul 03670, Korea.

Tel: +82-2-3277-3101

E-mail: yhmoon@ewha.ac.kr

© 2021 The Korean Nutrition Society

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.

ORCID iDs

Mak-Soon Lee

<https://orcid.org/0000-0002-7010-4185>

Yangha Kim

<https://orcid.org/0000-0002-7280-7597>

Funding

This study was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korean Government (MSIT) (No. 2019R1A2C1002861).

Conflict of Interest

There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest.

<https://e-jnh.org>

ABSTRACT

Purpose: Muscle mitochondria play a key role in regulating fatty acid and glucose metabolism. Dysfunction of muscle mitochondria is associated with metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes. Isorhamnetin (ISOR), also known as 3-O-methylquercetin, a quercetin metabolite, is a naturally occurring flavonoid in many plants. This study evaluated the effects of ISOR on the regulation of the mitochondrial function of C2C12 muscle cells.

Methods: C2C12 muscle cells were differentiated for 5 days, and then treated in various concentrations of ISOR. Cytotoxicity was determined by assessing cell viability using the water-soluble tetrazolium salt-8 assay principle at different concentrations of ISOR and time points. Levels of the mitochondrial DNA (mtDNA) content and gene expression were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. The citrate synthase (CS) activity was quantified by the enzymatic method.

Results: ISOR at a concentration of 10 μ M did not show any cytotoxic effects. ISOR increased the mtDNA copy number in a time- or dose-dependent manner. The messenger RNA levels of genes involved in mitochondrial function, such as peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , and uncoupling protein 3 were significantly stimulated by the ISOR treatment. The CS activity was also significantly increased in a time- or dose-dependent manner.

Conclusion: These results suggest that ISOR enhances the regulation of mitochondrial function, which was at least partially mediated via the stimulation of the mtDNA replication, mitochondrial gene expression, and CS activity in C2C12 muscle cells. Therefore, ISOR may be useful as a potential food ingredient to prevent metabolic diseases-associated muscle mitochondrial dysfunction.

Keywords: isorhamnetin, mitochondrial DNA, muscle mitochondria, citrate synthase

서론

인체의 에너지 대사 조절에서 밀접하게 연관되어 있는 대표적인 표적장기는 근육, 간, 및 지방 조직이며, 그 중에서도 인체의 약 40-50%를 차지하고 있는 근육은 생체 에너지 항상성 유지에 있어 중요한 역할을 한다. 특히, 골격근은 미토콘드리아 밀도가 높은 조직으로 지방산 및 당 대사를 조절하는 핵심적인 기관으로 골격근의 미토콘드리아의 기능 이상은 비만 및 제 2형 당뇨병과 같은 대사성 질환 유발과 관련이 있다 [1]. 최근에는 노령화가 진행되면서 골격근 감소에 따른 근육 손실과 근기능 저하로 인한 근력이 감소되는 근감소증 (sarcopenia) 예방 및 치료에 대한 관심이 높아지고 있다 [2]. 노화로 인한 근감소증은 근육 내 미토콘드리아의 기능 이상이 주요 원인으로 알려져 있다 [3]. 미토콘드리아는 에너지를 생산하는 세포 내 기관으로 미토콘드리아 내에 있는 미토콘드리아 유전체 (mitochondrial DNA, mtDNA)의 복제 및 전사 조절은 peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator (PGC)-1 α 에 의해 조절된다 [4]. PGC-1 α 는 골격근에서 지방산 대사와 미토콘드리아 산화 환원 조절에 필수적인 역할을 하는 uncoupling protein 3 (UCP3) 발현을 유도하는 것으로 보고되었다 [5].

Isorhamnetin (ISOR)은 quercetin의 대사산물인 3-O-methylquercetin으로 알려져 있으며 많은 채소와 과일 등의 식물에서 발견되는 flavonoid이다 [6]. 특히, ISOR은 비타민 나무 (*Hippophaë rhamnoides* L.)의 열매와 은행 (*Ginkgo biloba*) 잎의 주요 성분으로 심혈관 보호, 항염, 항 종양, 항산화, 항 박테리아, 및 항 바이러스 등 다양한 생리활성 효과를 나타냈다 [7]. 최근 우리는 ISOR이 지방세포에서 AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성화와 미토콘드리아 생합성 조절을 통한 지질 축적 억제 효과가 있음을 보고하였다 [8]. 현재까지 ISOR의 여러 가지 생리활성 효과와 작용 기전에 대한 연구결과들이 보고되었으나 근육세포에서 미토콘드리아 기능조절에 대한 연구는 아직 알려져 있지 않다.

미토콘드리아의 특징은 자신의 자체 유전체인 mtDNA를 보유하는 것으로 미토콘드리아 기능에 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아 크렘스 회로 (krebs cycle)의 산화 관련 효소인 시트르산 합성효소 (citrate synthase, CS)는 미토콘드리아 양의 일반적인 마커로 사용된다 [9]. 미토콘드리아 생합성은 PGC-1 α , nuclear respiratory factor 1, 및 mitochondrial transcription factor A에 의해 조절되며 UCP3는 골격근 에너지 대사에 관여한다. 본 연구노트에서는 ISOR이 C2C12 근육세포에서 미토콘드리아 기능을 조절하는 유전자 발현, mtDNA 복제, 및 CS 활성화에 미치는 영향을 중점적으로 보고하고자 한다.

연구방법

C2C12 근육아 세포배양 및 분화

C2C12 근육아 세포 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% glutamine, 50 IU penicillin 50 μ g/mL streptomycin (Invitrogen)을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen) 배양액에서 배양하였다. C2C12 근육아 세포의 분화를 유도하기 위해 C2C12 근육아 세포가 약 80-90%의 confluency를 나타낼 때 2% horse serum (Invitrogen)이 첨가된 DMEM 배양액으로 5일간 배양하였다.

세포 독성 평가

세포 독성 평가는 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)를 사용하여 water-soluble tetrazolium salt-8 assay 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. ISOR (Santa Cruz, CA, USA)은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 일정한 농도로 제조하여 사용하였으며, DMSO의 최종농도는 0.1%를 초과하지 않았다. 분화된 C2C12 근육 세포에 0 (대조군), 1, 5, 10 또는 50 μM 농도의 ISOR을 처리하고 4, 24, 또는 48시간 동안 배양하였다. 흡광도는 micro-plate reader (Varioskan Flash; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율 (%)로 나타내었다.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)을 분석하기 위해 근육세포의 총 RNA는 TRIzol 시약 (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)을 사용하여 추출하고, complementary DNA (cDNA)는 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 추출한 RNA로부터 합성하였다. 각각의 cDNA는 2X SYBR Green PCR Master Mix (Bioneer)와 혼합한 후, Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research, Sydney, Australia)에서 qPCR을 수행하였다. 사용된 primers의 염기서열은 다음과 같다; PGC-1 α forward 5'-GGGCCAAACAGAGAGAGAGG-3' reverse 5'-GTTTCGTTTCGACCTGCGTAA-3', UCP3 forward 5'-GAATCTCCGTTTTGAACAAG-3' reverse 5'-ACGGAGGACTAAAACCTCTCC-3', β -actin forward 5'-GTTGCCAATAGTGATGACCT-3' reverse 5'-GGACCTGACAGACTACCTCA-3'. 정량분석을 위한 형광 측정은 매 PCR cycle 마다 측정되었으며 유전자 발현에 대한 상대적인 정량은 delta-delta Ct 방법을 이용하여 측정하였다.

미토콘드리아 유전체 함량 분석

미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 함량을 분석하기 위해 genomic DNA (gDNA)는 Puregene DNA isolation kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 근육세포의 gDNA를 추출하였다. mtDNA 함량은 미토콘드리아 유전자 (cytochrome oxidase subunit I)와 핵 유전자 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 비율을 qRT-PCR로 측정하여 분석하였다.

미토콘드리아 CS 활성

미토콘드리아 단백질은 상업용 Mitochondrial Isolation Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 제조업체의 지침에 따라 추출하였다. 미토콘드리아 CS 활성은 추출된 미토콘드리아에서 Citrate Synthase Assay Kit (Sciencell, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. CS 활성은 412 nm 흡광도에서 측정하였으며 단백질 함량으로 세포의 양을 표준화하였다. 단백질 농도는 Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA)를 사용하여 정량하였다. CS 활성 값은 대조군에 대한 배수 변화 (fold change)로 표시하였다.

통계분석

모든 실험결과는 SPSS 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계 분석하였다. 분석 수치는 실험군당 평균과 표준오차로 나타내고, 독립표본 t-검정과 일원배치 분산분석 (1-way analysis of variance)을 한 후 Tukey's multiple range test에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

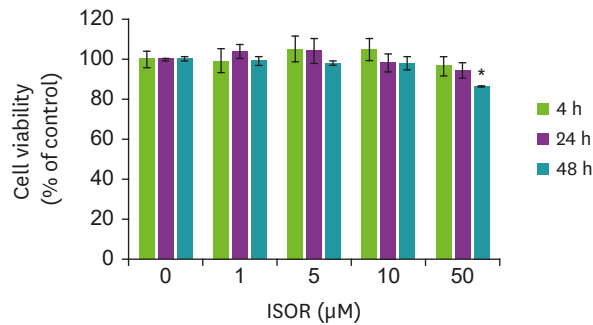


Fig. 1. Effects of ISOR on cell viability in muscle cells. C2C12 muscle cells were treated with 0 (control), 1, 5, 10, or 50 μM of ISOR, and incubated for 4, 24, or 48 hours. Cell viability was determined using a water-soluble tetrazolium-8 assay.

ISOR, isorhamnetin.

* $p < 0.05$ vs. untreated control.

결과 및 고찰

근육 세포독성 평가

C2C12 근육세포에서 ISOR의 세포독성을 조사하기 위해서 다양한 농도와 시간 별로 처리하여 세포 생존율 측정하였다. ISOR은 0, 1, 5, 10, 및 50 μM 농도를 첨가하여 37°C, 5% CO_2 조건 하에서 4, 24, 및 48시간 동안 배양하였다. 세포독성 변화는 ISOR 처리군과 대조군에 비해 세포 증식의 변화 정도를 백분율로 나타내었다 (Fig. 1). ISOR의 세포 생존율은 10 μM 농도에서 48시간 동안 유의적인 변화가 없었으나, 고농도인 50 μM 농도에서는 48시간 처리시 대조군에 비해 세포 생존율이 유의적으로 감소하여 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 사용될 농도 범위는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 $\leq 10 \mu\text{M}$ 농도 내의 ISOR를 사용하기로 하였다.

미토콘드리아 유전체 (mtDNA) 수준에 미치는 영향

mtDNA copy number은 C2C12 근육세포에서 시간별, 농도별로 ISOR를 처리하여 mtDNA 대 핵 DNA (nuclear DNA)의 비율을 real-time PCR을 이용하여 결정하였다. 세포는 0 (대조군), 1, 5, 및 10 μM 의 ISOR 농도를 첨가하여 37°C, 5% CO_2 조건 하에서 4 및 24시간 동안 배양하였다. mtDNA 수준은 5 및 10 μM 의 ISOR이 있는 조건에서 대조군에 비해 각각 1.71 및 1.96배 유의적으로 증가하였다 (Fig. 2). mtDNA는 세포 에너지 항상성을 유지하는 데 필수적이며 mtDNA copy number 감소나 돌연변이로 인해 ATP의 효율적인 생산 감소와 reactive oxygen species (ROS)의 과잉 생산이 발생한다 [10]. 과도한 ROS는 근육의 단백질 분해 및 세포사멸 경로의 활성화와 관련이 있다 [10]. 이는 mtDNA 수준이 골격근 기능을 유지하는데 중요한 구성 요소가 될 수 있다. 이전 연구에서 ISOR이 3T3-L1 지방세포의 mtDNA copy number를 증가시키는 것으로 나타났으며 [8], 이와 비슷하게 본 연구결과에서도 ISOR에 의해 C2C12 근육세포의 mtDNA copy number가 증가한다는 것을 보여주고 있다. 이와 같은 결과는 ISOR이 근육세포의 mtDNA 복제에 직접적인 영향을 미친다는 것을 시사하고 있다.

미토콘드리아 대사에 관여하는 유전자 발현 및 CS 활성에 미치는 영향

근육세포 미토콘드리아 기능조절 메커니즘을 알아보기 위해 미토콘드리아 대사에 관여하는 유전자 발현 및 CS 활성 조절에서 ISOR의 효과를 조사하였다. mRNA 수준은 C2C12 근육

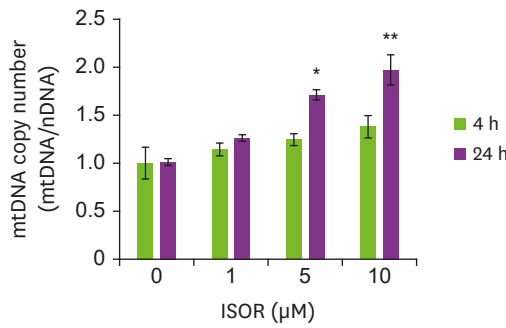


Fig. 2. Effects of ISOR on mtDNA copy number in muscle cells. C2C12 muscle cells were treated with 0 (control), 1, 5, and 10 μM of ISOR, and incubated for 4 or 24 hours. The mtDNA copy number was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. mtDNA, mitochondrial DNA; nDNA, nuclear DNA; ISOR, isorhamnetin. *p < 0.05, **p < 0.01 vs. untreated control.

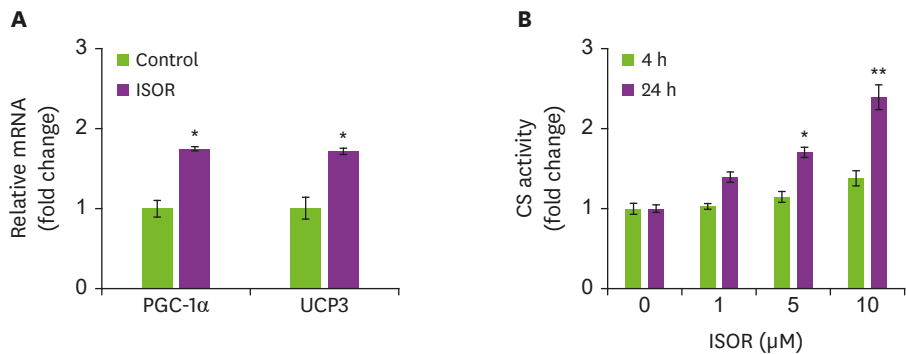


Fig. 3. Effects of ISOR on mitochondrial genes expression and CS activity in muscle cells. The mRNA levels were treated with 0 (control) or 10 μM of ISOR for 24 hours, and measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. CS activity was treated with 0 (control), 1, 5, or 10 μM of ISOR for 4 or 24 hours, and quantitated by enzymatic method. mRNA, messenger RNA; CS, citrate synthase; ISOR, isorhamnetin, PGC-1α, peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α; UCP3, uncoupling protein 3. *p < 0.05, **p < 0.01 vs. untreated control.

세포에서 0 (대조군) 혹은 10 μM의 ISOR을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 24시간 동안 배양한 후 qRT-PCR을 이용하여 정량하였다. PGC-1α과 UCP3의 유전자 발현은 대조군보다 ISOR 처리 세포에서 각각 1.75와 1.7배 유의하게 높았다 (Fig. 3A). CS 활성은 C2C12 근육세포에서 0 (대조군), 1, 5, 및 10 μM의 ISOR 농도를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 4 및 24시간 동안 배양하였다. CS 활성은 5 및 10 μM의 ISOR이 있는 조건에서 대조군에 비해 각각 1.70 및 2.39 배 유의적으로 증가하였다 (Fig. 3B). 최근 우리는 ISOR에 의한 지방세포 지질 축적억제 효과가 PGC-1α 유전자 발현과 mtDNA 복제 자극을 통한 미토콘드리아 생합성 조절작용과 관련이 있음을 보고하였다 [8]. Dong 등 [11]의 연구에서는 HepG2 간세포에서 ISOR이 AMPK 경로를 활성화시키고 미토콘드리아 막 전위 유지를 통한 미토콘드리아 기능 장애에 대한 보호 효과를 나타내었다. ISOR, kaempferol 및 quercetin 등의 폴리페놀을 풍부하게 포함하고 있는 비타민 나무 열매 추출물은 쥐의 흉선 세포에서 방사선 유발 손상으로부터 미토콘드리아 및 게놈 DNA를 보호한다는 것이 확인되었다 [12]. Kaempferol은 인간 골격근 myoblasts에서 PGC-1α 및 UCP-3 유전자 상향조절과 함께 에너지 소비를 증가시키고 [13] quercetin은 3T3-L1 세포와 식이 유발 비만 마우스의 지방조직에서 미토콘드리아 기능과 mtDNA 복제를 조절하는 것으

로 나타났다 [14]. 또 다른 연구에서 quercetin 처리한 쥐의 뇌 영역에서 미토콘드리아 DNA copy number 증가와 PGC-1 α 경조 조절을 통한 미토콘드리아 생합성이 촉진되었다 [15]. 본 연구에서 ISOR은 C2C12 근육세포의 PGC-1 α 과 UCP-3 유전자 발현을 상향 조절하고 미토콘드리아 효소인 CS 활성화를 증가시켰다. 결론적으로 본 연구 결과를 종합하면 ISOR의 미토콘드리아 기능조절 효과는 미토콘드리아 DNA 복제, PGC-1 α 과 UCP-3 유전자 발현, 및 CS 활성화와 부분적으로 관련되어 있음을 시사하고 있다. 따라서, ISOR이 근육 특이적 미토콘드리아 기능이상으로 인한 근감소증 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 2005; 115(12): 3587-3593.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
2. Coll PP, Phu S, Hajjar SH, Kirk B, Duque G, Taxel P. The prevention of osteoporosis and sarcopenia in older adults. *J Am Geriatr Soc* 2021; 69(5): 1388-1398.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
3. Marzetti E, Calvani R, Cesari M, Buford TW, Lorenzi M, Behnke BJ, et al. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(10): 2288-2301.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
4. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999; 98(1): 115-124.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
5. Lima TI, Guimarães D, Sponton CH, Bajgelman MC, Palameta S, Toscaro JM, et al. Essential role of the PGC-1 α /PPAR β axis in Ucp3 gene induction. *J Physiol* 2019; 597(16): 4277-4291.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
6. Saleh NA, Mansour RM, Markham KR. An acylated isorhamnetin glycoside from *Aerva javanica*. *Phytochemistry* 1990; 29(4): 1344-1345.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
7. Gong G, Guan YY, Zhang ZL, Rahman K, Wang SJ, Zhou S, et al. Isorhamnetin: a review of pharmacological effects. *Biomed Pharmacother* 2020; 128: 110301.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
8. Lee MS, Kim Y. Effects of isorhamnetin on adipocyte mitochondrial biogenesis and AMPK activation. *Molecules* 2018; 23(8): 1853.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
9. Kraft CS, LeMoine CM, Lyons CN, Michaud D, Mueller CR, Moyes CD. Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(4): C1119-C1127.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
10. Theilen NT, Kunkel GH, Tyagi SC. The role of exercise and TFAM in preventing skeletal muscle atrophy. *J Cell Physiol* 2017; 232(9): 2348-2358.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
11. Dong GZ, Lee JH, Ki SH, Yang JH, Cho IJ, Kang SH, et al. AMPK activation by isorhamnetin protects hepatocytes against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Eur J Pharmacol* 2014; 740: 634-640.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
12. Shukla SK, Chaudhary P, Kumar IP, Samanta N, Afrin F, Gupta ML, et al. Protection from radiation-induced mitochondrial and genomic DNA damage by an extract of *Hippophae rhamnoides*. *Environ Mol Mutagen* 2006; 47(9): 647-656.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
13. da-Silva WS, Harney JW, Kim BW, Li J, Bianco SD, Crescenzi A, et al. The small polyphenolic molecule kaempferol increases cellular energy expenditure and thyroid hormone activation. *Diabetes* 2007; 56(3): 767-776.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

14. Nisha VM, Anusree SS, Priyanka A, Raghu KG. Apigenin and quercetin ameliorate mitochondrial alterations by tunicamycin-induced ER stress in 3T3-L1 adipocytes. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 174(4): 1365-1375.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
15. Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Martínez-Castaño MG, Portillo MP. Quercetin protects against aluminium induced oxidative stress and promotes mitochondrial biogenesis via activation of the PGC-1 α signaling pathway. *Genes Nutr* 2014; 9(1): 361.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)