

방기 뿌리 (*Sinomenium acutum* rhizome) 추출물 및 그 알칼로이드 성분의 항근위축 효과

김 경 · *오 윤 신*

을지대학교 식품영양학과 연구원, *을지대학교 식품영양학과 교수

Protective Effects of *Sinomenium acutum* Rhizome and Its Alkaloids against Dexamethasone-induced Atrophy in C2C12 Myoblasts

Kyong Kim and *Yoon Sin Oh*

Researcher, Dept. of Food and Nutrition, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

*Professor, Dept. of Food and Nutrition, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

Abstract

Skeletal muscle is an organ that regulates biological metabolic energy. Its dysfunction causes decline of body functions and disability, thus deteriorating the overall quality of life. Various materials are being developed with an anti-sarcolytic effect. However, anti-sarcolytic effect of *Sinomenium acutum* rhizomes extract (SAE) remains unclear. Therefore, this study aimed to investigate anti-muscle atrophy effects of SAE and its alkaloids, including sinomenine (SIN), magnoflorine (MF), acutumine (ACU), and *N*-ferulyramine (NFT) isolated from SAE, on dexamethasone (Dex)-induced myotubules. C2C12 myogenic cells differentiated for 6 days were treated with 1 mM Dex for 24 hours. Induction of muscular atrophy was confirmed by a decrease in myogenin expression. We found that Dex increased expression levels of muscle-specific ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. However, mRNA and protein levels of these muscle-specific ubiquitin ligases were significantly reduced by cotreatment with SIN, MF, and NFT in myotubes. Glucose uptake reduced by Dex in myotubules were also restored by SIN, MF, and NFT treatments. These results suggest that SIN, MF, and NFT can reduce muscle wasting and enhance glucose uptake in Dex-treated myotubes, highlighting their potential as therapeutic agents to prevent muscle atrophy.

Key words: muscular atrophy, *Sinomenium acutum* rhizomes, C2C12, dexamethasone

서 론

포유동물에서 근육 단백질은 단식상태 또는 질병 중에 동원되어 간 포도당 생성과 에너지 생산을 위한 아미노산 공급원으로서 중요한 역할을 한다. 근육 위축(muscle atrophy)은 장기간의 부동, 노화, 기아, glucocorticoid계 약물, 근골격계, 신경계 기능 이상, 제2형 당뇨병과 같은 만성 질환을 포함한 다양한 질환자에게서 발생할 수 있다. 근육 위축은 수축성 단백질 합성 속도와 분해 속도 사이의 음의 균형으로 인해 발생하는데 근육 단백질의 전반적인 분해 속도가 증가하면

서 근육량과 단백질 함량이 급속히 손실되는 특징을 갖는다 (Hasselgren 등 2005). 또한 기초대사량을 감소시켜 비만과 함께 대사증후군을 촉진하는 악순환을 일으킨다. 무엇보다 근육 위축은 일상 생활 활동 수행 능력 상실 등으로 인해 삶의 질을 감소시키며 결과적으로 수명을 단축시킬 수 있다 (Rosenberg IH 1997; Faulkner 등 2007; Jeong 등 2017).

특히, 스트레스 호르몬으로 알려진 내인성 글루코코르티코이드(glucocorticoids, GCs) 자극에 의해 발생된 근육 위축은 유비퀴틴-프로테아좀 의존성 단백질 분해에 의해 발생하며 근육 섬유의 직경 감소와 함께 근육량이 감소하는 것으로

* Corresponding author: Yoon Sin Oh, Professor, Dept. of Food and Nutrition, Eulji University, Seongnam 13135, Korea. Tel: +82-31-740-7287, Fax: +82-31-740-7370, E-mail: ysoh@eulji.ac.kr

알려져 있다(Hasselgren PO 1999; Sartori 등 2021). 대표적으로 합성 GC 성분 중 하나인 덤사메타손(dexamethasone, Dex)은 일반적으로 염증성 질환 및 자가면역 질환자에게 처방되거나 과도한 또는 지속적인 덤사메타손 처리는 인슐린 저항성을 증가시켜 포도당 소비 및 이용을 억제하여 미토콘드리아 기능 장애 및 근육 위축을 유발하는 것으로 보고된다(Kuo 등 2013; Ochi 등 2015). 근육축 기작을 간단히 설명하면, 근육축 신호는 골격근 세포로 유비퀴틴(ubiquitin) 부착을 증가시켜 골격근 단백질 분해와 관련된 여러 신호단백질의 활성화를 유도한다(Bonaldo & Sandri 2013). 이 과정에서 근육축 핵전사인자로 알려진 muscle atrophy F-box(MAFbx/atrogen-1)와 muscle RING-finger protein-1(MuRF1)이 증가한다. MAFbx/atrogen-1은 골격근의 비대(hypertrophy)와 단백질 합성과 관련된 MyoD와 eIF3f와 같은 핵 내 전사인자의 분해를 촉진하여 근육축을 진행시키며, MuRF1은 골격근을 구성하는 troponin I, myosin heavy chain, myosin binding protein C 그리고 myosin light chain의 반감기를 감소시키는 것으로 알려져 있다(Clarke 등 2007; Cohen 등 2009; Csibi 등 2010). 따라서 MAFbx/atrogen-1과 MuRF-1은 근육축의 가장 중요한 마커로 인식되고 있으며 근감소증의 기전과 약물 효능평가 연구에 있어서 Dex 유도 근육축 동물 모델, 세포모델 등을 이용한 근육 위축의 개선은 임상 적용 확대에 큰 의미를 지닌다고 평가한다(Won HS 1991; Bodine 등 2001; Bodine & Baehr 2014).

방기(*Sinomenium acutum*)는 새모래 덩굴과(*Menispermaceae*)에 속하는 낙엽덩굴식물이며 줄기 및 뿌리를 약전에 사용되는 것으로 보고된다(Lee 등 2013). 방기는 민간요법으로 신경통, 광범위한 관절염(arthritis) 등의 증상으로 나타나는 부종(arthredema), 관절 수종(hydrarthrosis) 등을 치료하는데 사용되어 왔다(Yamasaki H 1976). 동의보감에서는 안면신경마비, 손발통증, 원활한 배변활동, 수종, 풍종, 각기를 낮게 한다고 기재되어 있다. 또한 최근 연구 결과에서는 항과민성 작용 및 항염증 작용(Liu 등 1996; Kim 등 2000) 과 혈당조절 및 고지혈증(Ghee & Lee 2005), 항암 및 면역기능(Kim 등 2004; Lee H 2004) 등의 효과가 보고되었다. 알려진 방기의 주요 성분으로는 sinomenine, magnoflorine, acutumine, sinacutine, N-ferulytyramine 등의 alkaloid와 lignan 성분인 syringaresinol 등이 알려져 있으며(Zhao 등 2005), 최근 방기 뿌리 50% 에탄올 추출물 및 그 단일 성분 7종의 항근육위축 효과가 보고되었으나(Jung 등 2023) 근관 직경만을 측정된 결과로 기전은 알려지지 않았다. 이처럼 방기는 다양한 약리작용을 가지는 기능성 물질이지만 그 단일 성분에 대한 근육 위축 관련 기전 및 포도당 소비 경로를 조절하여 근육 위축을 억제할 수 있는지 등에 대한 연구는 부족하다. 따라서 본 연구는 근육 위축 세포모델을 이용하여 방기 뿌리 추출물과 언급된 알칼로이드

성분 4종의 근육축 조절 활성을 검증하고 포도당 소비측정을 통해 근육 위축을 예방할 수 있는 치료제로서의 잠재력을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Dexamethasone는Sigma-aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Duchefa(Haarlem, Netherlands) 제품을 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS)는 Gibco(Paisley, UK)에서 구입하였고, Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM), horse serum(HS), Penicillin/streptomycin, Trypsin-EDTA와 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS)는 WELGENE(Daegu, Korea)으로부터 구입하였다. 항체로 사용된 anti-myogenin, anti- α -tubulin은 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서, anti-MAFbx (F-9)은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서, horseradish peroxidase(HRP)-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit, anti-mouse)는 PeproTech(Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2. 방기 추출물 및 그 단일 성분 4종 획득

본 실험에 사용된 방기 추출물(*Sinomenium acutum* rhizome, SAE) 및 이의 분획물로부터 획득한 알칼로이드 성분의 Sinomenine(SIN, $C_{19}H_{23}NO_4$), Magnoflorine(MF, $C_{20}H_{24}NO_4$), Acutumine(ACU, $C_{19}H_{24}ClNO_6$), N-trans-feruloyltyramine(NTF, $C_{18}H_{19}NO_4$)은 한양대학교 약학대학 김철영 교수님 실험실로부터 제공받았다. SAE 시료는 100 mg/mL의 농도로, SIN, MF, ACU, NTF는 1.0 mM 농도로 DMSO에 용해하였으며 시료 처리 시에는 DMSO의 최종 농도가 0.1%(v/v) 미만이 되도록 첨가하였다.

3. 근관세포(myotube)로의 분화와 근육 위축 유도

근육 C2C12 근아세포주(myoblasts)는 American Type Culture Collection(ATCC) (CRL-1772; Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며 10% FBS 및 1% penicillin streptomycin를 함유한 고농도 포도당 DMEM으로 구성된 성장배지(GM)에서 48시간 배양하였다. C2C12 근아세포(myotube) 분화 유도를 위해 2.0×10^5 cell의 농도로 6 well에 분주하고 GM 배지로 24시간 배양 후 2% 말 혈청(horse serum)을 함유하는 DMEM으로 구성된 분화배지(DM)로 24시간마다 배지를 교환하면서 분화 유도(myotube)를 시킨 후 실험에 이용하였다. 분화 과정에서 나타나는 형태 변화는 매일 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 통해 관찰하였으며 시간별 반응 후 세포내 단백질을 추출하

여 마이오젠으로 분화정도를 확인하였다. 6일간 C2C12 myotube로의 분화과정을 거친 후 근위축 유도를 위하여 Dex를 10 mM 농도로 DMSO에 용해시킨 후 무혈청배지(serum-free media)에 1 μ M의 농도가 되도록 희석하여 넣은 후 24시간 동안 처리하였다. 방기 시료에 대한 항근육 위축(anti-atrophy) 효과를 관찰하기 위하여 제시한 농도의 방기 시료를 1 mM Dex와 함께 동시 처리하였다.

4. 세포독성평가

C2C12 myoblast에 대한 시료의 독성 정도를 확인하기 위하여 96 well plate에 1.0×10^4 cells/well의 농도로 분주한 후 24시간 하였다. SAE은 30, 100, 300, 1,000 mg/mL를 처리하고 4종의 알칼로이드 단일 성분인 SIN, MF, ACU, NFT은 1, 10, 100, 1,000 nM의 농도로 성장배지에 희석한 후 처리하였다. 그리고 Dex의 C2C12 myoblast에서 유발하는 성장억제 정도를 확인하기 위하여 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 mM의 농도로 처리하였다. 24시간 반응 후 배지를 모두 제거하고 1.0 mg/mL MTT 시약을 각 well에 100 μ L씩 처리하여 2시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. MTT 제거한 후 well에 2-propanol을 100 μ L씩 처리하였으며 용출된 formazan을 용해시키기 위해 실온에서 10분간 교반시킨 후 microplate reader(Tecan, San Jose, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

5. 근위축 유전자 발현 분석

근위축이 유도된 C2C12 myotube 세포를 수거한 후 total RNA 추출을 위해 Trizol Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 분리하고 정량하였다. 추출된 동일한 양의 RNA는 Primescript™ 1'st strand cDNA synthesis kit(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)로 cDNA를 합성하였으며 SYBR Premix Ex Taq II, ROX plus(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)와 반응시켜 ABI real-time PCR system from applied biosystem Inc.(Forster City, CA)을 이용하여 MURF1, MAFbx 유전자의 발현 패턴을 분석하였다. Real time PCR 수행조건은 90°C에서 10분, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초로 총 40주기로 수행하였다. 각 유전자의 전사 수준은 내부 대조군으로 사용된 cyclophilin의 전사 수준으로 정량 표준화하였다. Oligonucleotide primer sequence는 다음과 같다. MURF1 은 5'-TGTCGGAGGTCGTTCCG-3'(forward)와 5'-GTGCCGTCCATGATCAC TT-3'(reverse); MAFbx는 5'-ATGCACACTGGTGCAGAGA-3'(forward)와 5'-TGTAAGC ACACAGGCAGGTC-3'(reverse); Cyclophilin은 5'-TGGAGAGC ACCAAGACAGACA-3'(forward)와 5'-TGCCGGAGTCGACAA TGAT-3'(reverse)이다.

6. 포도당 소비 측정

6일간 C2C12 myotube로의 분화과정을 거친 후 근위축 유도를 위하여 Dex를 10 mM 농도로 DMSO에 용해시킨 후 무혈청배지(serum-free media)에 1 μ M의 농도가 되도록 희석하여 넣은 후 24시간 동안 처리하였다. 방기 시료에 대한 항근육 위축(anti-atrophy) 효과는 1 mM Dex와 함께 동시 처리하였다. 근위축 유도된 세포에서 배지 내 소비된 포도당 정도를 확인하기 위해 반응 종료 후 배지를 수거한 후 포도당 분석kit(Asan Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 실험 시료와 포도당 표준용액을 20 mL씩 취하고 효소시약 3.0 mL와 함께 37°C에 5분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 포도당 표준곡선을 이용하여 정량하고 무세포 배지의 포도당 농도에서 처리된 시료의 포도당 농도를 감하여 소비량을 측정하였다.

7. 단백질 발현의 측정

세포를 차가운 DPBS로 3회 수세 후 수거된 세포는 protease inhibitor cocktail(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 phenyl methane sulfonyl fluoride(Sigma)가 첨가된 mammalian protein extraction buffer (Sigma)로 추출한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 추출된 단백질 함량은 Protein assay dye reagent concentrate(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하였으며 동량의 단백질을 SDS-PAGE에 전개하고 nitrocellulose membrane(Amersharm, GE Healthcare Life science, Germany)에 옮긴 후 항원/항체 반응을 실시한 후 ELC(Millipore, USA)로 화학발광을 유도하였으며 ATTO WSE-6200 LuminoGraph II(ATTO Corporation, Japan)으로 감지하고 Image 소프트웨어(C.S. analyzer 4, ATTO Corporation, Japan)를 이용하여 정량분석하였다.

8. 통계처리

상기의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복 실험하였으며 모든 실험값은 mean±standard deviation(SD)로 나타내었다. 통계 분석은 SPSS 20.0 소프트웨어(IBM SPSS ver. 20.0.0 for Windows; IBM Co., Armonk, NY, USA)를 사용하였다. 그룹 간 차이의 유의성은 LSD comparisons tests로 분석되었으며 통계학적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

결과 및 고찰

1. 근관세포로의 분화 조건 확립 및 텍사메타손(Dex) 처리에 의한 세포 생존율 변화

근육세포는 근아세포(myoblast)에서 근관세포(myotube)로

myogenesis 과정을 통해 분화한다. 근육세포는 MyoD, myogenic regulatory factors(MRFs), MHC 등과 같은 조절인자의 발현량이 증가에 의해 분화되며, 분화 초기에 증가하는 MyoD는 세포 주기 조절하고 세포 증식을 억제하면서 분화를 촉진하고, 분화 후기에 myogenin(Myog)은 근관의 형성을 유도하고 세포 증기를 중지시키며, 미오신 구성 단백질 중 하나인 MHC와 같은 유도 인자들과 함께 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다(Hasty 등 1993; Ferri 등 2009; Jeong 등 2011; Bentzinger 등 2012). 근위축 세포모델의 구축을 위하여 C2C12 세포를 대상으로 근아세포에서 근관세포로의 최적의 분화조건을 MyoD 전사 인자 계열의 구성원인 MyoG으로 확인하였다. C2C12 근아세포를 대상으로 성장배지(GM)를 이용하여 80~90% confluent한 상태로 배양한 다음 새로운 분화 배지(DM)로 매일 교환한 결과, 분화 유도 1일째부터 MyoG의 유의미한 발현의 증가($p<0.05$)가 나타났으며, 분화 3일째부터 MyoG의 변화는 4.7배 이상($p<0.001$)의 증가를 보였고 분화 8일째까지 MyoG의 발현은 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 근관세포로 분화하는 과정에서 증가하는 MyoG의 발현과 분화조건에 관련된 기존 연구결과 등을 참고하여 분화 6일이 최적의 실험조건임을 확인하였다(He 등 2023; Jung 등 2023). 근위축 유도를 위해 사용한 Dex이 C2C12 근관세포 독성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하여 성장 억제 정도를 확인하였다. Fig. 1B에 제시된 바와 같이 0.5, 1.0, 5.0, 10, 100 mM의 농도로 Dex를 24시간 처리하였을 경우 $>10 \mu\text{M}$ Dex 농도($p<0.001$)에서 생존율 및 성장 억제가 나타났다. 6일간 분화된 C2C12 근관세포(DM)에

독성이 없는 1 mM Dex로 처리(DM+Dex) 후 MyoG으로 확인한 결과 대조군에 비해 25.5%($p<0.001$ vs. DM)의 발현이 억제되었으며 이를 통해 정상적인 근분화 유도가 저해되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 1C). 근 위축 연구에 사용된 Dex같은 약물의 처리는 기본적으로 세포독성이 없는 조건에서 근위축을 유발해야 하는 것으로 보고된다(Park 등 2017). 따라서 우리는 6일간 분화된 세포에 생존율 및 성장에 큰 영향을 미치지 않는 농도인 1 mM Dex의 24시간 처리를 실험 조건으로 설정하여 실험을 진행하였다.

2. 근위축 유도 근관세포에서 방기추출물과 그 단일성분 처리에 의한 세포 생존율 변화

C2C12 myoblasts에 대한 SAE 및 단일 성분 4종 SIN, MF, ACU, NFT의 세포독성을 확인하기 위해 시료를 제시한 농도별로 24시간 동안 처리하고 MTT assay를 통해 세포독성을 평가하였다. Bac 등(1992)의 연구결과에 따르면 생쥐 백혈구 세포인 L1210에 방기 메탄을 추출물을 처리한 결과, 다른 40여개의 한약재 추출물과 비교하여 세포독성이 없거나 미약하다고 발표하였다. 본 실험에서는 SAE를 30, 100, 300, 1,000 mg/mL의 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 30, 100 mg/mL의 농도에서는 독성을 보이지 않았으나 300 mg/mL($p<0.001$), 1,000 mg/mL($p<0.001$)에서는 세포독성을 나타냈다. 단일 성분인 SIN($p<0.001$), MF($p<0.001$), ACU($p<0.001$), NFT($p<0.05$)는 1,000 nM 농도에서 모두 독성을 보이며 MF($p<0.001$)의 경우 100 nM에서도 독성을 보였다. 따라서 세포독성이 나타나지 않는 농도를 사용하여 Dex-유도 근위축 세포모델에서 방

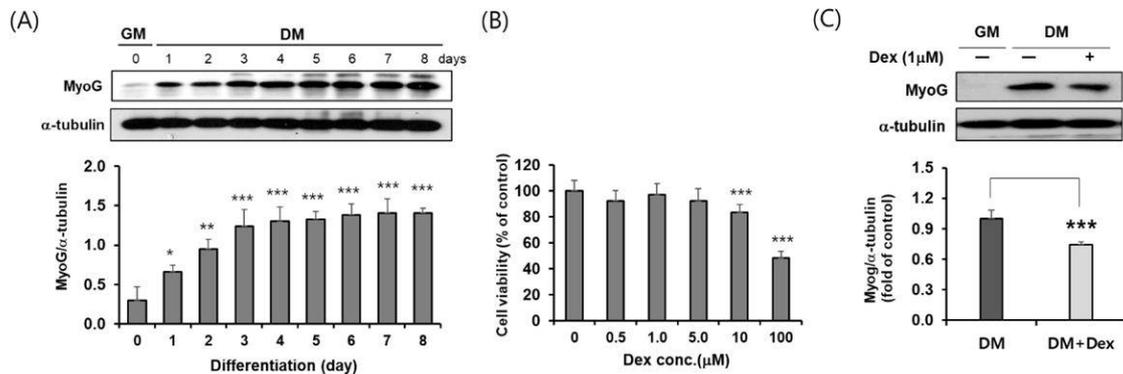


Fig. 1. Establishment of conditions for differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes and induction of muscle atrophy by treatment with dexamethasone. (A) Myogenin (MyoG) protein was compared over time to determine the timing of induction of differentiation. (B) Effects of dexamethasone (Dex) on the cell growth in C2C12 myotubes. (C) C2C12 myotubes were treated with 1 μM Dex for 24h, MyoG levels were examined by Western blot analysis. Alpha-tubulin was used as an internal standard. The results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$ vs. the corresponding control group.

기 시료 처리에 따른 C2C12 myotubes의 세포보호효과를 측정하였다(Fig. 2A). 1 mM Dex와 함께 SAE를 처리한 결과 30 mg/mL의 농도에서 미미하지만 8% ($p<0.05$)의 세포 증식효과를 보였으며 4개의 단일 성분 중에 MF는 1 nM과 10 nM의 농도에서 각각 15%($p<0.01$), 17% ($p<0.001$)로 세포생존율을 증가시켰고 NFT는 1 nM, 10 nM, 100 nM의 농도에서 각각 10%($p<0.05$), 20%($p<0.001$), 22% ($p<0.001$)로 Dex 처리된 C2C12 근관 세포의 세포 생존력을 유의하게 증가시켰다(Fig. 2B).

3. 근위축 유도 근관세포에서 방기추출물과 그 단일성분에 의한 근위축 관련 유전자 및 단백질 발현

Bodine 등(2001)은 부동화, 신경 제거, 뒷다리 부하 해제, 텍사메타손 치료 및 Interleukin-1 유도 cachexia 등의 다양한 위축 조건에서 유사하게 변형되는 유전자로 2가지 새로운

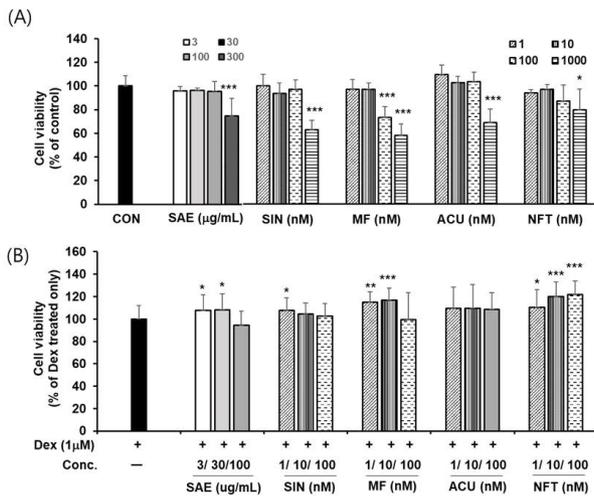


Fig. 2. Cytotoxicity evaluation of *Sinomenium acutum* extract (SAE) and its alkaloid components in C2C12 myoblasts and their cytoprotective effect in Dex-treated C2C12 myotubes. (A) C2C12 myoblasts were treated with 3, 30, 100, and 300 $\mu\text{g/mL}$ SAE and four alkaloid components at concentrations of 1, 10, 100, and 1,000 nM for 24h (B) C2C12 myotubes were co-treated with 1 μM Dex containing 3, 30, and 100 $\mu\text{g/mL}$ SAE or 1, 10, and 100 nM of four alkaloid components for 24h. Cell viability were determined by MTT assay. The results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$ vs. the control (CON) group or 1 mM Dex treated only group. SAE, *Sinomenium acutum* extract; SIN, Sinomenine; MF, Magnoflorine; ACU, Acutumine; NFT, N-trans-feruloyltyramine.

근육 특이적 E3 ubiquitin ligases MuRF1(Trim63)과 MAFbx (FBX032) 유전자를 주목했으며 두 유전자는 모두 휴식 골격근에서 비교적 낮은 수준으로 발현되어 있다가 근위축 유도 조건에서 증가하는 것으로 보고했다(Gomes 등 2001). MuRF1과 MAFbx에 대한 다양한 위축 조건에서 두 유전자의 mRNA 발현 리가제의 단백질 번역 또는 분해 속도에 대한 이해 및 다른 단백질과 교차 반응하지 않는 선택적 항체의 가용성 등에 대한 데이터 부족의 문제점을 가지고 있지만 두 유전자의 발현 조절이 근위축 관련 약물 개발의 표적이 될 수 있다는 가능성을 열어준 중요한 발견이라 할 수 있다(Bodine 등 2001). 따라서 우리는 Dex를 처리한 근관 세포의 근위축 유전자 발현에 방기추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 MURF1, MAFbx/atrogen-1의 유전자 및 MAFbx 단백질 발현수준을 측정하였다. Fig. 3에 제시된 바와 같이 Dex를 단독으로 처리한 세포는 대조군(CON) 세포에 비해 MuRF1의 mRNA 발현은 2.7배($p<0.001$), MAFbx/atrogen-1의 발현은 3.0배($p<0.001$)로 유의하게 증가함을 확인하였다. 그리고 Dex 처리로 증가한 MuRF1의 mRNA 수준은 30 $\mu\text{g/mL}$ SAE 처리에 의해 41.2%($p<0.01$), 알칼로이드 성분인 SIN, MF, NFT의 10 nM 처리에 의해서는 각각 47.1%($p<0.001$), 41.2%($p<0.01$), 52.9% ($p<0.001$) 감소됨을 알 수 있었다. 또한 MAFbx/ atrogen-1 mRNA의 발현은 SAE 처리에 의해서 40.0%($p<0.01$), SIN과 MF는 50.0%($p<0.001$), NFT는 35.0%($p<0.01$)로 유의미한 감소를 보였다. ACU를 처리시 두 유전자 발현이 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 또한, MAFbx의 단백질 발현 변화를 관찰한 결과(Fig. 4), MAFbx/atrogen-1 mRNA 결과와 동일하게 SAE 처리 군에서 MAFbx의 단백질 발현량은 Dex 처리군과 비교하여 감소($p<0.05$)하였고, SIN($p<0.01$), MF($p<0.01$), NFT($p<0.01$)의 처리군에서도 MAFbx의 단백질 발현은 감소하였다. 이상의 결과를 살펴볼 때 방기 추출물과 그 알칼로이드 성분인 SIN, MF, NFT가 Dex 처리에 의하여 유발된 근위축을 억제한다는 것을 알 수 있으며 유비퀴틴-프로테아좀(ubiquitin-proteasome) 경로의 차단에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

4. 근위축 유도 근관세포에서 방기추출물과 그 단일성분 처리에 의한 포도당 흡수능 변화

Glucocorticoids(GCs) 성분의 약물처리는 다양한 조직과 세포에서 포도당 소비에 매우 복잡한 영향을 미치며 근세포 위축유발과 함께 포도당 소비를 억제하는 것으로 보고된다(Gwag 등 2013; Kuo 등 2013; Jiang 등 2019). 따라서 Dex 처리가 근육 내 포도당 소비를 감소시키는지 확인한 결과, C2C12 근관세포에서 1 mM Dex 처리는 대조군에 비해 포도당 소비를 약 33%($p<0.001$) 감소시켰다. 반면 Dex 처리군과

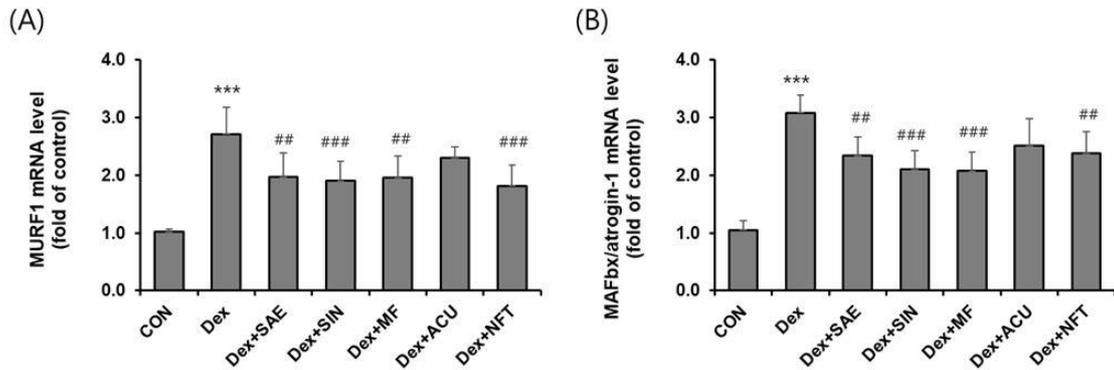


Fig. 3. Effects of SAE and its alkaloids on the expression of atrophy-associated genes in Dex-induced C2C12 myotube. The gene expression of ubiquitin E3 ligases (A) MuRF1 and (B) MAFbx/atrogin-1 were detected using qRT-PCR following co-treatment with 1 μ M Dex and experimental samples. The relative expression of genes was quantified by cyclophilin. The respective concentrations of the samples are as follows. SAE was used at 30 mg/mL, and each of the four alkaloid components was used at 10 nM. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3); ** p <0.01 and *** p <0.001 compared to the CON; # p <0.01 and ### p <0.001 compared to the Dex treated only. CON, control; Dex, dexamethasone; MAFbx, muscle atrophy F-box; MuRF1, muscle Ring finger 1.

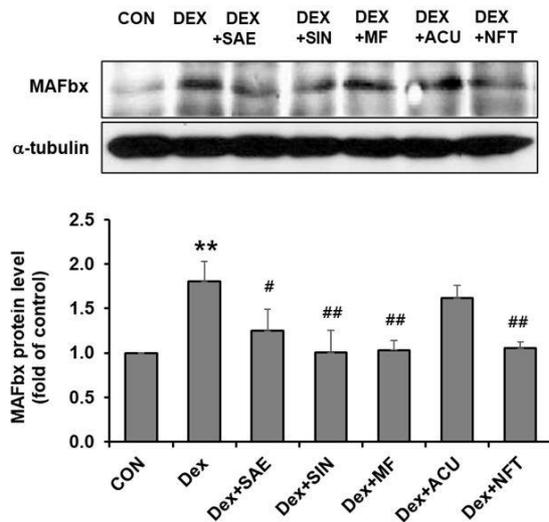


Fig. 4. Effects of SAE and its alkaloids on MAFbx protein expression in Dex-induced C2C12 myotube. The MAFbx protein level in Dex-induced C2C12 myotubes was estimated by western blot analysis using antibodies against MAFbx. α -Tubulin was used as a control for protein loading. The respective concentrations of the samples are as follows. SAE was used at 30 mg/mL, and each of the four alkaloid components was used at 10 nM. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3); ** p <0.01 compared to the CON; # p <0.05 and ### p <0.01 compared to the Dex treated only. CON, control; Dex, dexamethasone; MAFbx, muscle atrophy F-box.

비교시, 30 μ g/mL SAE의 처리는 포도당 소비를 54.5% 증가시켰고 10 nM 농도의 SIN, MF, ACU, NFT 처리 시, 포도당 소비를 유의적으로 증가시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 골격근은 체질량의 40% 이상을 차지하며 대사 항상성에 중추적인 역할을 한다(Defronzo RA 2009). 특히, 근육은 체내 포도당을 80% 소비하는 대표적 기관으로 부동성, 노화, 약물을 포함한 수많은 요인에 의해 근육이 감소하면 몸속 포도당이 온전히 소비되지 않고 남아돌아 당뇨발생 위험을 높이게 된다(Mokdad 등 2001; Fielding 등 2011). 근육 내 포도당 수송은 5'-모노포스페이트 활성화 단백질 키나제(AMPK)에 의해 매개되며 AMP의 활성화는 글로코오스 수송체(GLUT4)의 세포질로부터 세포막으로의 이동을 증가시킴으로써 세포 내 포도당 소비를 조절한다. 그리고 인슐린 수용체 매개 PI3K/Akt 경로도 GLUT4 발현 조절에 참여하는 것으로 보고된다(Kurth-Kraczek 등 1999; Richter & Hargreaves 2013). SIN은 EGF/Nrf2/HO-1 축을 활성화하여 세포사멸을 억제하고 췌장 베타 세포의 염증 상태와 산화 스트레스를 개선하여 제2형 당뇨를 치료할 수 있다고 보고되었으며(Chen 등 2023) 관절염 및 골다공증에 대한 예방 효과가 보고되어 있다(Xu 등 2018; Zhang 등 2019). 근위축 관련 연구에 있어서는 SIN, MF, ACU이 Dex로 유도된 조건에서 근관직경을 각각 9.3%, 13.8%, 11.3% 개선한다는 연구 결과가 있다(Jung 등 2023). 특히 제2형 당뇨 마우스 모델을 이용하여 당뇨병성 근위축에 대한 효과를 연구한 결과, MF가 공복혈당 수치 감소와 함께 근위축과 관련된 요소들인 골격근량, 근관 직경, 혈청 크레아틴 키나아제(CK) 수치, 유비퀴틴-프로테아좀 E3-리가제

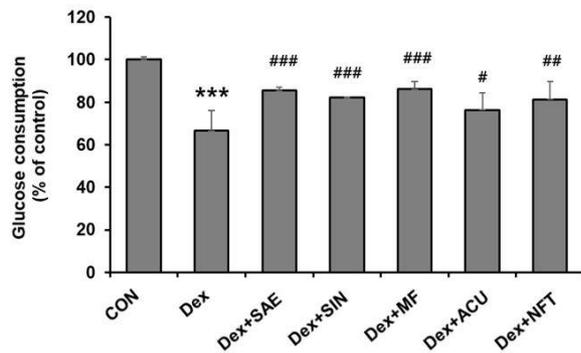


Fig. 5. Effect of SAE and its alkaloids on glucose consumption in Dex-induced C2C12 myotube atrophy. To estimate the glucose content consumed, the medium was measured with a glucose assay kit after the end of the reaction. The respective concentrations of the samples are as follows. SAE was used at 30 mg/mL, and each of the four alkaloid components was used at 10 nM. Data are expressed as the mean±S.D. (n=3); *** p <0.001 compared to the CON; # p <0.05, ## p <0.01, and ### p <0.001 compared to the Dex treated only.

관련 유전자의 발현 등을 조절했으며 무엇보다 양성대조군으로 사용된 메트포르민보다 Akt의 인산화를 더 효율적으로 증가시키는 결과를 보였다(Yadav 등 2021). 이처럼 근위축증과 관련하여 방기의 단일 성분에 대한 구체적 연구는 MF외에는 부족한 상태이다. 본 연구에서는 근단백질 분해에 관여하는 ubiquitin- proteasome pathway와 관련된 대표지표인 MuRF1, MAFbx/ atrogen-1의 유전자 및 단백질 발현량이 Dex를 처리시 증가하였음을 확인하였고 SAE 및 그 알칼로이드 성분인 SIN, MF, NFT 처리에 의해 하향 조절됨으로써 근위축 신호전달체계에 관여하고 있음을 예상할 수 있다. 따라서 근육단백질 분해에 관여하는 ubiquitin E3 ligases 신호전달 경로의 상위 유전자인 *SMAD2/3*, *FOXO1* 유전자에 대한 발현분석이 추가적으로 필요할 것으로 사료된다. 또한 Fig. 3B의 배지 내 포도당 소비 결과를 통해 방기 성분의 항근위축 효과가 포도당 대사 메커니즘과 관련된 AMPK와PI3K/Akt 활성화의 연관성 또한 확인할 필요가 있다. 본 연구를 통해 논문에서 보고된 MF의 당뇨병성 근위축 억제효과처럼 SIN, NFT 성분도 근위축증 억제효과의 선행연구로서 잠재적 가치가 있음을 시사하는 바이다.

요약 및 결론

우리나라의 경우 65세 이상의 인구가 20% 이상인 초고령

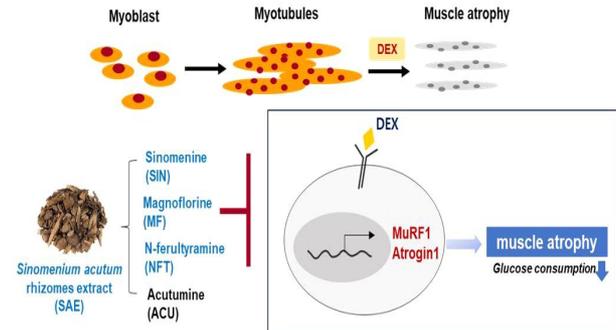


Fig. 6. Scheme of the anti-muscle atrophy effects of SAE and its alkaloids components; sinomenine (SIN), magnoflorine (MF), acutumine (ACU), and N-ferulytyramine (NFT) isolated from SAE on dexamethasone (DEX)-induced myotubules. Red lines indicates that SAE, SIN, MF, and NFT inhibits the pathways induced by DEX.

사회(super-aged society)를 눈앞에 두고 있어 대사성 질환과 함께 근위축에 대해 많은 관심을 기울이고 있다. 골격근 위축증은 복잡한 분자 신호 전달 체계를 가지며 가장 대표적인 신호전달물질로는 E3 ubiquitin ligases인 MuRF1과 MAFbx/atrogen-1이 있다. 따라서 이러한 단백질 분해 경로를 조절하는 효소들의 활성을 억제하는 소재의 발굴은 매우 중요하다. 본 실험은 Dex로 유도된 근위축에 대한 SAE 및 그 알칼로이드 성분인 SIN, MF, ACU, NFT의 항근위축 효과를 확인하고자 하였다. 그 결과 SAE를 포함하여 SIN, MF, NFT는 Dex 처리에 의해 증가된 세포 내 MuRF1과 MAFbx/atrogen-1 유전자 및 단백질 발현의 하향 조절에 기여했으며 근위축으로 감소된 근육 내의 포도당 흡수를 회복시킴으로써 당뇨병성 근위축의 예방 및 치료에 효과적일수 있음을 알 수 있었다(Fig. 6). SAE 및 그 단일 성분인 SIN, MF, NFT의 항위축 관련 메커니즘과 함께 *in vivo*의 검증 등 추가적인 연구를 통해 새로운 기능성 식품 소재로써 검증이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2024년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(NO. RS-2024-00336513)을 받아 수행된 결과의 일부로, 이에 깊은 감사를 드립니다.

References

- Bae KH, Min BS, Do DS, Kim NS, Yang GJ, Ahn BZ. 1992. Screening on cytotoxicity of medicinal plants against L1210

- cell. *Yakhak Hoeji* 36:491-495
- Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. 2012. Building muscle: Molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a008342
- Bodine SC, Baehr LM. 2014. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 307:E469-E484
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VKM, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294:1704-1708
- Bonaldo P, Sandri M. 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech* 6:25-39
- Chen J, Guo P, Han M, Chen K, Qin J, Yang F. 2023. Cognitive protection of sinomenine in type 2 diabetes mellitus through regulating the EGF/Nrf2/HO-1 signaling, the microbiota-gut-brain axis, and hippocampal neuron ferroptosis. *Phytother Res* 37:3323-3341
- Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E, Glass DJ. 2007. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* 6:376-385
- Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL. 2009. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol* 185:1083-1095
- Csibi A, Cornille K, Leibovitch MP, Poupon A, Tintignac LA, Sanchez AMJ, Leibovitch SA. 2010. The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. *PLOS ONE* 5:e8994
- DeFronzo RA. 2009. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 58:773-795
- Faulkner JA, Larkin LM, Claflin DR, Brooks SV. 2007. Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:1091-1096
- Ferri P, Barbieri E, Burattini S, Guescini M, D'Emilio A, Biagiotti L, Del Grande P, De Luca A, Stocchi V, Falcieri E. 2009. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *J Cell Biochem* 108:1302-1317
- Fielding RA, Vellas B, Evans WJ, Bhasin S, Morley JE, Newman AB, Abellan van Kan G, Andrieu S, Bauer J, Breuille D, Cederholm T, Chandler J, De Meynard C, Donini L, Harris T, Kannt A, Guibert FK, Onder G, Papanicolaou D, Rolland Y, Rooks D, Sieber C, Souhami E, Verlaan S, Zamboni M. 2011. Sarcopenia: An undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: Prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc* 12:249-256
- Ghee SS, Lee YJ. 2005. The therapeutic effects of *bangkeehwangkee-tang* and *bangkeebokryeong-tang* on the hyperlipidemia in rats. *Korean J Herbology* 20:149-157
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. 2001. Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14440-14445
- Gwag T, Park K, Kim E, Son C, Park J, Nikawa T, Choi I. 2013. Inhibition of C2C12 myotube atrophy by a novel HSP70 inducer, celastrol, via activation of Akt1 and ERK1/2 pathways. *Arch Biochem Biophys* 537:21-30
- Hasselgren PO. 1999. Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2:201-205
- Hasselgren PO, Menconi MJ, Fareed MU, Yang H, Wei W, Evenson A. 2005. Novel aspects on the regulation of muscle wasting in sepsis. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2156-2168
- Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364:501-506
- He Y, Yang P, Yuan T, Zhang L, Yang G, Jin J, Yu T. 2023. miR-103-3p regulates the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts by targeting BTG2. *Int J Mol Sci* 24:15318
- Jeong H, Lee JY, Jang EJ, Lee EH, Bae MA, Hong JH, Hwang ES. 2011. Hesperedin promotes MyoD-induced myogenic differentiation *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol* 163:598-608
- Jeong JS, Park CH, Kim IB, Kim JB. 2017. Activation of signaling pathways for protein synthesis by Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract in a mouse model of muscle atrophy. *Korean J Food Nutr* 30:371-377
- Jiang R, Wang M, Shi L, Zhou J, Ma R, Feng K, Chen X, Xu

- X, Li X, Li T, Sun L. 2019. Panax ginseng total protein facilitates recovery from dexamethasone-induced muscle atrophy through the activation of glucose consumption in C2C12 myotubes. *BioMed Res Int* 2019:3719643
- Jung EJ, Kim JH, Kim HM, Guo S, Lee DH, Lim GM, Syed ASH, Kim W, Kim CY. 2023. Isolation of alkaloids from *Sinomenium acutum* by centrifugal partition chromatography and their ameliorating effects on dexamethasone-induced atrophy in C2C12 myotubes. *Separations* 10:470
- Kim HM, Moon PD, Chae HJ, Kim HR, Chung JG, Kim JJ, Lee EJ. 2000. The stem of *Sinomenium acutum* inhibits mast cell-mediated anaphylactic reactions and tumor necrosis factor- α production from rat peritoneal mast cells. *J Ethnopharmacol* 70:135-141
- Kim TH, Kim YI, Hong KE, Yim YK, Lee H, Lee BR. 2004. Influence on the anti-cancer and immune response improvement of herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* infusion solution into *joksamni* (ST36). *Korean J Meridian Acupoint* 21:79-93
- Kuo T, Harris CA, Wang JC. 2013. Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol* 380:79-88
- Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. 1999. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 48:1667-1671
- Lee H. 2004. Influence on the Anti-cancer and immune response improvement of Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* infusion solution into *chung-wan* (CV12). *J Acupunct Res* 21:85-102
- Lee J, Weon JB, Yun BR, Eom MR, Ma CJ. 2013. Quantitative analysis for the quality evaluation of sinomenine, magnoflorine and syringaresinol in *Sinomenium acutum*. *Yakhak Hoeji* 57:161-166
- Liu L, Buchner E, Beitz D, Schmidt-Weber CB, Kaever V, Emmrich F, Kinne RW. 1996. Amelioration of rat experimental arthritides by treatment with the alkaloid sinomenine. *Int J Immunopharmacol* 18:529-543
- Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. 2001. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* 286:1195-1200
- Ochi A, Abe T, Nakao R, Yamamoto Y, Kitahata K, Takagi M, Hirasaka K, Ohno A, Teshima-Kondo S, Gwag T, Choi I, Kawamura T, Nemoto H, Mukai R, Terao J, Nikawa T. 2015. N-myristoylated ubiquitin ligase Cbl-b inhibitor prevents on glucocorticoid-induced atrophy in mouse skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 570:23-31
- Park HC, Jeong JW, Choi YH. 2017. Induction of muscle atrophy by dexamethasone and hydrogen peroxide in differentiated C2C12 myotubes. *J Life Sci* 27:1479-1485
- Richter EA, Hargreaves M. 2013. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev* 93:993-1017
- Rosenberg IH. 1997. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr* 127:990S-991S
- Sartori R, Romanello V, Sandri M. 2021. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: Implications in health and disease. *Nat Commun* 12:330
- Won HS. 1991. Age-related changes in body growth, muscle protein content and cellular-mediated immunity and rats fed stock diets. *Korean J Food and Nutr* 4:133-139
- Xu M, Liu S, Wan R, Chen Y. 2018. Combined treatment with sinomenine and acupuncture on collagen induced arthritis through the NF κ B and MAPK signaling pathway. *Oncol Lett* 15:8770-8776
- Yadav A, Singh A, Phogat J, Dahuja A, Dabur R. 2021. Magnoflorine prevent the skeletal muscle atrophy via Akt/mTOR/FoxO signal pathway and increase slow-MyHC production in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 267:113510
- Yamasaki H. 1976. Pharmacology of sinomenine, an anti-rheumatic alkaloid from *Sinomenium acutum*. *Acta Med Okayama* 30:1-20
- Zhang B, Zhang H, Luo H, Yang C, Yuan Y. 2019. Sinomenine can promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by regulating the Akt/Runx2 signaling pathway in MC3T3-E1 cells. *Pharmazie* 74:747-750
- Zhao ZZ, Liang ZT, Zhou H, Jiang ZH, Liu ZQ, Wong YF, Xu HX, Liu L. 2005. Quantification of sinomenine in *Caulis sinomenii* collected from different growing regions and wholesale herbal markets by a modified HPLC method. *Biol Pharm Bull* 28:105-109

Received 30 August, 2024
 Revised 10 October, 2024
 Accepted 16 October, 2024