

모과추출물의 C2C12 근육세포에서 근분화 및 에너지대사조절인자 발현 증진 효과 연구

강석용^{1#}, 현선영², 권예담², 박용기^{1,3}, 정효원^{1,3*}

1 : 동국대학교 한방신약개발센터, 2 : 동국대학교 한의과대학, 3 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실

Effects of Chaenomelis Fructus Extract on the regulation of myoblasts differentiation and the expression of biogenetic factors in C2C12 myotubes

Seok Yong Kang^{1#}, Sun Young Hyun², Yedam Kwon²
Yong-Ki Park^{1,3}, Hyo Won Jung^{1,3*}

1 : Korean Medicine R&D Center, Dongguk University

2 : College of Korean Medicine, Dongguk University

3 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objective : The present study was conducted to investigate the effects of Chaenomelis Fructus (CF) on the regulation of biogenesis in C2C12 mouse skeletal muscle cells.

Methods : C2C12 myoblasts were differentiated into myotubes in 2% horse serum-containing medium for 5 days, and then treated with CF extract at different concentrations for 48 hr. The expression of muscle differentiation markers, myogenin and myosin heavy chain (MHC) and mitochondrial biogenesis-regulating factors, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha (PGC1 α), sirtuin1 (Sirt1), nuclear respiratory factor1 (NRF1) and transcription factor A, mitochondrial (TFAM), and the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and acetyl-CoA carboxylase (ACC) were determined in C2C12 myotubes by reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot, respectively. The cellular glucose levels and total ATP contents were measured by cellular glucose uptake and ATP assays, respectively.

Results : Treatment with CF extract (0.01, 0.02, and 0.05 mg/ml) significantly increased the expression of MHC protein in C2C12 myotubes compared with non-treated cells. CF extract significantly increased the expression of PGC1 α and TFAM in the myotubes. Also, CF extract significantly increased glucose uptake levels and ATP contents in the myotubes.

Conclusion : CF extract can stimulate C2C12 myoblasts differentiation into myotubes and increase energy production through upregulation of the expression of mitochondrial biogenetic factors in C2C12 mouse skeletal muscle cell. This suggests that CF can help to improve skeletal muscle function with stimulation of the energy metabolism.

Key words : Biogenetic factor, Chaenomelis Fructus, C2C12 cell, myoblast differentiation

*Corresponding author : Hyo Won Jung, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju, 38066, South Korea.

· Tel : +82-54-770-2367 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : tenzing2@hanmail.net

First author : Seok Yong Kang, Korean Medicine R&D Center, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju, 38066, South Korea.

· Tel : +82-54-770-2658 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : seokppo2@hanmail.net

· Received : 09 October 2019 · Revised : 15 November 2019 · Accepted : 30 November 2019

I. 서 론

골격근(skeletal muscle)은 우리 몸의 에너지 소비를 발생시키는 생체에너지 조절기관이며, 골격근의 노화와 근육 기능 상실은 각 종 신체 기능의 감소와 장애를 일으키고 사망의 위험도를 증가시키는 것으로 알려져 있다¹⁾. 골격근육량 감소의 결과로 나타나는 근감소증은 노화와 함께 나타나는 점진적인 근육량 감소 상태이며, 최근 한국 사회의 고령화 현상에 따른 각종 노인 장애 증가와 더불어 비만이나 당뇨병과 같은 만성 대사성 질환 발생과도 밀접하게 연관되는 것으로 알려지면서^{2,3)} 인슐린 저항성 조절과 생체 에너지대사 조절의 핵심 기관인 골격근에 대한 연구와 관심이 더욱 증가하고 있다⁴⁻⁶⁾. 근감소증 연구는 골감소증이나 골다공증 연구에 비해 훨씬 늦게 시작되었고 아직 근감소증의 정의나 표준화된 측정방법, 일차적인 진단기준 등이 확립되어 있지 않아서 향후 고령화에 따른 노인 문제 증가에 대비한 새로운 치료법 및 예방법 개발을 위한 연구가 절실히 필요한 실정이다⁷⁾.

한의학에서 筋肉은 肌肉과 筋의 개념으로 설명하는데, 肌肉은 근육 형태의 대부분을 차지하는 몸통 부위인 筋腹에 해당하고, 筋은 근육의 작용을 만드는 힘줄과 근막에 해당한다고 볼 수 있으며, 이는 서양의학에서의 연골, 힘줄, 인대 등을 통칭하는 연부조직과 연골, 신경, 림프, 관절 주변을 모두 포함한다고 할 수 있다⁸⁾. 또한 한의학에서 肝主筋 이론으로부터 肉은 脾胃에 속하므로⁹⁾, 간의 기능을 향상시키는 약물은 근육 기능 저하를 개선시킬 수 있으며, 脾主肌肉 이론으로부터 비의 기능이 기육을 주관하며, 비의 원활한 운행(脾主運化)을 통해 기육에 영양이 풍부해져 근육기능을 향상시킬 수 있다고 본다⁹⁾. 따라서 본 연구에서는 간과 비의 기능을 조절하는 한약을 이용하여 근육 기능 증진 효능을 검증하고자 하였다.

木瓜(*Chaenomeles Fructus*, CF)는 장미과(*Rosaceae*)에 속한 모과나무(*Chaenomeles sinensis* Koehne)와 명자 꽃(*C. lagenaria* (Loisel) Koidz, *C. speciosa* (Sweet) Nakai)의 성숙한 과실로 性味는 溫, 酸하고, 歸經은 肝, 脾로 氣血의 소통을 도와주어 근육의 경직을 풀어주는 舒筋活絡의 효능과 위장을 조화롭게 하여 습을 말리는 和胃化濕 효능이 있다^{9,10)}. 모과는 濕痺로 인해 팔다리 근육에 경련이 일어나는 濕痺拘攣, 허리와 무릎이 시리고 무거우며 통증이 있는 腰膝關節酸重疼痛, 구토와 설사가 같이 나타나면서 쥐가 나는 吐瀉轉筋, 오래된 濕이 열로 바뀌어 소변이 잘 통하지 않고 다리가 붓는 脚氣水腫 등의 증상을 치료하는 데에 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 또한 모과의 현대약리효능 연구로 고지방식이로 비만이 유도된 마우스에서의 항비만 효과와 지방세포 조절¹¹⁾, 항산화와 미백효과^{12,13)}, 항응혈 작용¹⁴⁾, 주름개선¹⁵⁾, 대식세포에서의 항염증 효과¹⁶⁾, 간세포에서 AMPK 활성화를 통한 당 대사조절¹⁷⁾ 및 carbachol 투여로 인해 항진된 흰쥐의 장운동 억제 효과¹⁸⁾ 외 모과추출물 구성성분에 대한 약리학적 문헌고찰¹⁹⁾ 등이 보고된 바 있다.

본 연구에서는 모과의 舒筋活絡의 효능 특성이 근육기능에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 마우스 골격근 세포에 모과추출물을 처리하여 근세포 분화 및 에너지대사 조절작용에 대한 효과를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 모과(*Chaenomeles Fructus*, CF)는 광명당제약(울산, 한국)으로부터 표준약재를 구입한 뒤 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선하여 추출물 제조에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약으로는 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), penicillin/streptomycin (Corning, NY, USA), Fetal bovin serum (FBS), horse serum (HS) (Merck Millipore, Temecula, CA, USA), ATP colorimetric assay kit (BioVision, Milpitas, CA, USA), Anti-Sirt1, TFAM, NRF1, AMPK, phospho-AMPK, ACC, phospho-ACC(Cell signaling, Danvers, MA, USA), Anti-MHC, GLUT4 (Santa Cruz, Dallas, MA, USA), Anti-PGC1 α , radioimmunoprecipitation assay (RIPA: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 등이 있으며, 광학현미경 (LEICA, Wetzlar, Germany), Microtiter plate reader (ASYS, Austria), 약재추출기(Daihan scientific, Korea), 회전식감압농축기(Eyela Co., Ltd, Japan), 동결건조기(Ilshin Lab Co., Ltd, Korea), 자동감광장치(ChemiDoc; Biorad, USA) 등의 기기를 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 모과추출물 제조

모과추출물(*Chaenomeles Fructus*, CF)은 모과 200 g에 정수된 물 2L를 넣고 95°C에서 3시간동안 1차 추출한 후 같은 비율로 2차 추출을 실시하였다. 추출물은 1호 와트만 거름종이(Whatman paper filter No.1)로 거르고, 회전식 감압농축기를 이용하여 농축한 후 동결건조기를 이용하여 건조시켰다. 이때 수율은 25.6%였다. 모과추출물은 냉장보관하면서 실험 직전 생리식염수에 적정 농도로 완전 용해시킨 후 세포실험을 위한 약물(CF-W extract)로 사용하였다.

2) 세포배양

실험에 사용된 세포는 마우스의 골격근세포주(mouse skeletal muscle cell line)로 미분화상태의 근아세포인 C2C12 세포를 ATCC사(CRL-1772™, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 10% FBS와 1% P/S이 함유된 DMEM을 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 약 85~95%의 세포가 성장하였을 때 2% HS와 1% P/S이 함유된 DMEM을 매일 1회씩 총 5일간 교체함으로써 미분화상태의 근아세포(myoblasts)를 근관세포(myotubes)로 분화시켜주었으며, 분화 4일과 5일차에 모과추출물(0.01, 0.02, 0.05 mg/ml) 또는 대조약물로서 항당뇨약인 메트포민(Metformin, 2.5 mM/ml)을 처리하였다.

3) 세포독성평가

C2C12 세포에서 모과추출물의 독성 농도를 평가하기 위해 WST-1 assay를 수행하였다. 즉, C2C12 myoblasts(2×10^4 cells/well)를 96-well culture plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 하루 동안 배양한 후 모과추출물을 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/ml의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 여기에 각 well 당 WST-1 용액을 10 µl 씩 넣어 2시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하였다. 이후 발색정도를 microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성정도는 세포만 배양한 대조군에서의 100% 생존도를 기준으로 상대적인 세포생존도(cell viability)를 계산하였다.

4) Revers Transcriptase(RT)-PCR

C2C12 세포에서 발현되는 에너지대사(PGC1 α , Sirt1, NRF1, TFAM)의 유전자에 대한 모과추출물의 조절 효과를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 즉, C2C12 세포를 60 mm culture dish에서 하룻밤 배양한 다음 약 85~95%의 세포가 성장하였을 때 2% HS와 1% P/S이 함유된 DMEM을 매일 1회씩 총 5일간 교체함으로써 미분화상태의 근아세포를 근관세포로 분화시켜주었으며 분화 4일과 5일차에 서로 다른

농도의 모과추출물(0.01, 0.02, 0.05 mg/ml) 및 대조약물인 Metformin(2.5 mM/ml)을 처리해주었다. 각 세포를 수거하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 TRIzol 용액을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA의 농도를 Nanodrop을 이용하여 정량한 후 total RNA(5 µg)에 5×RT buffer, oligo-(dT) primer, dNTP mixture, Promega™ M-MLV reverse transcriptase를 넣고 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분의 조건으로 반응시켜 cDNA를 합성하였다. PCR 수행을 위해 합성된 cDNA 1 µl에 각 타겟 유전자에 대한 primers(Table 1) 및 10x PCR buffer(10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 2 mM dNTP, 1U Taq polymerase를 혼합한 후 94°C에서 2분 조건에서 1 cycle, 94°C에서 30초, 55~63°C에서 30초, 72°C에서 60초 조건에서 30 cycles; 72°C에서 5분 조건에서 1 cycle을 수행하였다. 최종 PCR 반응물은 EtBr을 포함하는 1% agarose gel을 이용하여 100V, 30분간 전기 영동한 후 자동감광장치(Bio-Rad ChemiDoc)를 이용하여 확인하였다. 각 PCR 반응물의 밴드를 Image J program(NIH, USA)을 이용하여 GAPDH의 발현 정도와 비교한 발현 비율로 계산하여 histogram으로 나타내었다.

Table 1. Specific primers for PCR

Primer name		Acession No.	Sequences (5' → 3')
PGC1 α	Forward	XM 006503779.3	CAC CAA ACC CAC AGA AAA CAG
	Reverse	XM 006503779.3	GGG TCA GAG GAA GAG ATA AAG TTG
Sirt1	Forward	NM 001159589.2	GAT CCT TCA GTG TCA TGG TT
	Reverse	NM 001159589.2	GAA GAC AAT CTC TGG CTT CA
NRF1	Forward	XM 017321445.1	AGG GCG GTG AAA TGA CCA TC
	Reverse	XM 017321445.1	CGG CAG CTT CAC TGT TGA GG
TFAM	Forward	XM 017313918.1	GGG TAT GGA GAA GGA GGC CC
	Reverse	XM 017313918.1	TCC CTG AGC CGA ATC ATC CT
GAPDH	Forward	XM_017321385.1	CAG CCT CGT CCC GTA GAC A
	Reverse	XM_017321385.1	CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT

5) Western Blot

C2C12 세포에서 발현되는 근육분화(Myogenin, MHC), 에너지대사(PGC1 α , Sirt1, NRF1, TFAM), 에너지 항상성 유지(ACC, AMPK)의 단백질에 대한 모과추출물의 조절 효과를 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 즉, C2C12 세포를 60 mm culture dish에서 하룻밤 배양한 다음 약 85~95%의 세포가 성장하였을 때 2% HS와 1% P/S이 함유된 DMEM을 매일 1회씩 총 5일간 교체함으로써 미분화상태의 근아세포를 근관세포로 분화시켜주었으며 분화 4일과 5일차에 서로 다른 농도의 모과추출물(0.01, 0.02, 0.05 mg/ml) 및 대조약물인 Metformin(2.5 mM/ml)을 처리해주었다. 각 세포를 수거하여

3,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 RIPA buffer를 넣고 homogenizer를 이용하여 마쇄한 후 4°C, 14,000rpm에서 20분 동안 원심 분리하였다. 상청액을 수집하여 Bradford's assay 용액으로 단백질의 농도를 측정 후 30 µg 단백질을 SDS-PAGE 분리하였다. 이를 nitrocellulose membrane에 transfer한 후 5% skim milk에 담겨 상온에서 3시간 동안 blocking 하였다. 여기에 5% skim milk에 희석한 각 단백질의 1차 항체와 4°C에서 하룻밤 반응시켰으며, 1x TBST buffer (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20, pH 7.5)를 이용하여 15분씩 3회 세척한 후 HRP-conjugated 2차 항체와 실온에서 3시간 반응시켰다. 이를 다시 1x TBST로 3회 세척한 후 ECL

용액으로 염색하고 자동감광장치(Bio-Rad ChemiDoc)를 이용해서 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 각 단백질의 밴드를 Image J program(NIH, USA)을 이용하여 β -actin의 발현 정도와 비교한 발현 비율로 계산하여 histogram으로 나타내었다.

6) 면역세포화학염색(Immunocytochemistry, ICC)

C2C12 세포에서 근육분화에 대한 모과의 효과를 확인하기 위해 면역세포화학염색(ICC)을 수행하였다. 즉, C2C12 세포를 Thermanox plastic cover slips(Nunc™, Thermo Fisher Scientific)에 분주하여 5일간 근관세포로 분화하였다. 분화 4,5 일차에 모과추출물 및 Metformin을 각각 처리하여 배양하였다. 각 세포를 1×PBS로 세척한 후, 4% paraformaldehyde 용액을 넣어 10분 고정시켰다. 고정된 세포에 0.1% Triton X-100이 포함된 1×PBS(PBS-T)를 이용하여 20분간 반응시키고 5% BSA 용액에서 30분간 반응시켰다. 이를 다시 1×PBS로 3회 세척한 후 MHC antibody(Santa Cruz)와 함께 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. 반응이 끝난 세포는 1×PBS로 3회 세척한 후 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG와 함께 1시간 실온에서 반응시키고 DAPI 용액이 포함된 mounting 용액을 이용하여 봉입한 후 형광현미경(Leica DM2500)으로 관찰하였다.

7) Glucose Assay

C2C12 세포에서 소비된 glucose의 농도를 확인하기 위하여 glucose uptake cell-based assay kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에서 5일간 분화가 끝난 C2C12 세포에 100 g/ml의 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose (NBDG)가 포함되어있는 glucose-free medium에 4시간 반응시킨 후 cell-based assay buffer를 각각 200 μ l씩 분주하고 485/650 파장으로 측정하였다.

8) ATP Assay

C2C12 세포에서 생성된 ATP의 총량을 확인하기 위하여 ATP colorimetric assay kit (BioVision)을 이용하여 측정하였다. 5일간 분화가 끝난 C2C12 세포를 수거하여 100 μ l의 ATP assay buffer를 넣은 후 homogenizer를 이용하여 마쇄한 뒤 96 well plate에 각각 50 μ l씩 분주하였다. ATP Assay buffer, ATP Probe, ATP Converter, Developer를 혼합한 용액을 96 well plate 각각 50 μ l씩 분주하고 상온에서 호일에 싸고 빛을 차단시킨 후 30분간 반응시킨 후 570 nm의 파장으로 측정하였으며, ATP의 농도는 키트에 동봉된 ATP standard를 이용하여 uM의 농도로 계산하여 환산하였다.

9) 통계분석

실험결과는 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용해 histogram으로 나타내었고 유의성을 one-way ANOVA와 Tukey's test를 통해 검정하여 95% confidence interval 이상인 경우를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포독성에 대한 영향

C2C12 myoblasts에서 모과추출물에 의한 독성정도를 평가하기 위해 WST-1 assay를 수행하였다. 그 결과, 세포만 배양한 경우의 세포생존율(cell viability)을 100%로 하였을 때 모과추출물 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/ml 처리 농도에서 각각 $100.51 \pm 0.18\%$, $99.81 \pm 0.08\%$, $101.84 \pm 0.08\%$, $100.33 \pm 0.07\%$, $87.50 \pm 0.27\%$, $58.50 \pm 0.54\%$ 로 측정되었다. 따라서 이후 실험에서는 독성이 없는 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도 범위에서 실험을 수행하였다(Fig. 1).

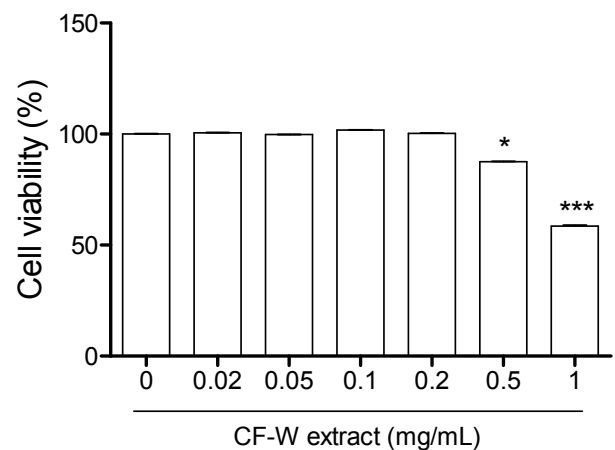


Fig. 1. Effect of CF-W extract on cell viability in C2C12 myoblasts. Cells were treated with CF-W extract at 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 1 mg/ml for 24 hr. Cell viability was measured by WST-1 assay. Data represents mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. non-treated cells.

2. 근육분화에 대한 효과

C2C12 myotubes에서 모과추출물(CF-W extract)의 근육분화에 대한 조절효과를 확인하기 위해 근육분화 마커인 Myogenin과 MHC 단백질 발현을 western blot 방법과 면역세포화학염색법을 이용하여 확인하였다.

먼저, myogenin의 발현은 모과추출물을 처리하지 않은 세포에 비해 모과추출물을 처리한 후 농도에 의존적으로 증가하였으며, 대조약물인 metformin 처리군에서도 유의적인($p < 0.001$) myogenin 발현 감소효과를 나타내었다(Fig. 2A). MHC의 발현에서는 모과추출물 처리에 의해 유의적인($p < 0.05$) 증가를 나타내었으며, metformin 처리군에서는 오히려 유의적인($p < 0.001$) 감소가 관찰되었다(Fig. 2B). 또한 면역세포화학염색을 통한 MHC 발현 관찰에서도 모과추출물을 0.02, 0.05 mg/ml 처리하였을 때 처리하지 않은 세포에 발현의 증가와 myotube의 길이와 굵기가 모두 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2C). 따라서 모과추출물은 근 분화단백질인 MHC의 발현을 유의적으로 증가시킴으로써 근 분화를 촉진할 수 있는 것으로 나타났다.

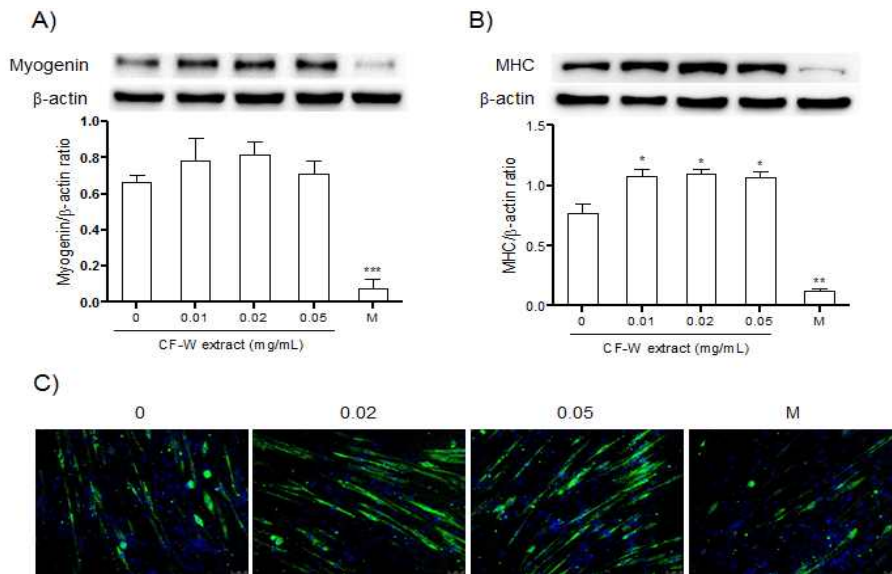


Fig. 2. Effects of CF-W extract on the expression of myogenin and MHC in C2C12 myotubes. Cells were treated with CF-W extract (0.01, 0.02 and 0.05 mg/mL) or metformin (2.5 mM/mL) for 48 hr. The expressions of Myogenin (A) and MHC (B) protein were detected by western blotting. All data were presented as the means±SD of three independent experiments. M, metformin-treated cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. non-treated cells. (C) the cells were stained with anti-MHC antibody and DAPI and then observed the expression of MHC by fluorescence microscopy (original magnification= $\times 200$). Green, MHC-positive cells; and blue, DAPI-positive nuclei.

3. 에너지 대사에 대한 효과

C2C12 세포에서 모과추출물(CF-W extract)의 에너지대사 조절효과를 확인해보기 위해 미토콘드리아-매개 에너지대사 조절인자들인 PGC1 α , Sirt1, NRF1, TFAM의 단백질 및 유전자 발현을 각각 RT-PCR 방법과 western blot 방법으로 확인하였다.

그 결과, PGC1 α 의 발현은 유전자와 단백질 발현 모두 정상군에 비해 모과추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 단백질 발현은 모과추출물 0.02, 0.05 mg/mL 농도에서 정상군에 비해 유의적인($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 대조약물인 metformin 처리군에서도 정상군에 비해 PGC1 α

단백질의 유의적인 발현 증가($p < 0.05$)를 관찰하였다(Fig. 3A,E). Sirt1(Fig. 3B,F)과 NRF1(Fig. 3C,G)의 발현은 유전자와 단백질 발현이 모두 모과추출물 처리에 의해 증가하였으며, metformin의 처리는 정상군과 비교하여 발현 변화가 관찰되지 않았다. 단백질 발현은 정상군에 비해 모과추출물 농도에 따라 모두 증가하였으나 유의적이지 않았다. 또한 TFAM의 발현은 정상군에 비해 모과추출물 투여에 의해 증가하였으며, 유전자와 단백질 발현 모두 모과추출물 0.05 mg/mL 농도에서 정상군에 비해 유의적인 증가($p < 0.05$)를 나타내었다. Metformin 처리군은 정상군과 비교하여 별 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 3D,H).

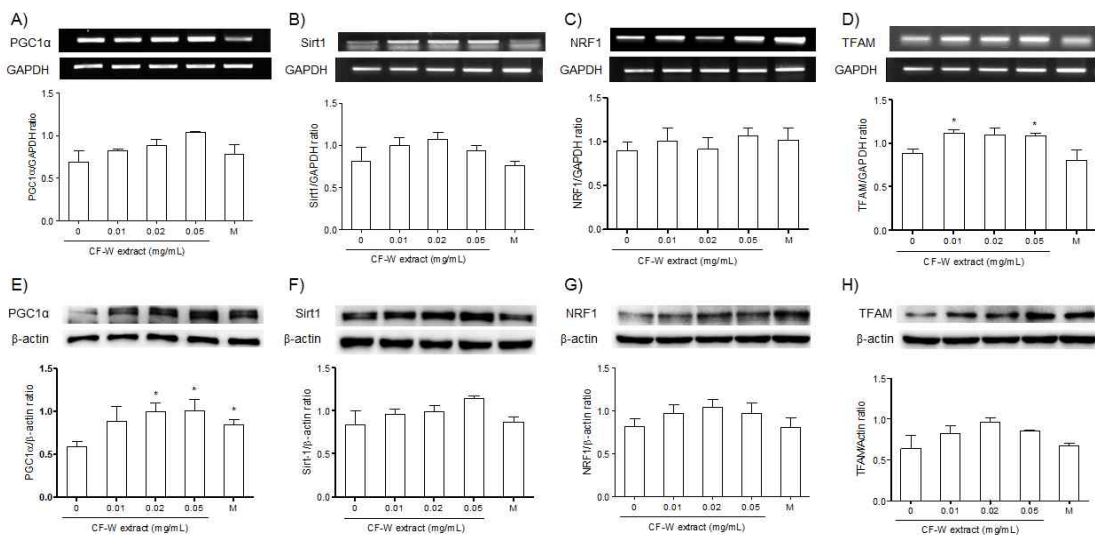


Fig. 3. Effects of CF-W extract on the expression of biogenesis-regulating factors in C2C12 myotubes. Cells were treated with CF-W (0.01, 0.02, and 0.05 mg/mL) or metformin (2.5 mM/mL) for 48 hr. The expression of PGC1 α (A,E), Sirt1 (B,F), NRF1 (C,G), and TFAM (D,H) mRNA (A-D) and protein (E-H) were analyzed by RT-PCR and western blotting, respectively. All data were presented as the means±SD of three independent experiments. M, metformin-treated cells. * $p < 0.05$ vs. non-treated cells.

4. AMPK/ACC signaling pathway에 대한 효과

C2C12 myotubes에서 모과추출물의 에너지대사 조절기전을 확인해보기 위해 에너지항상성 조절 효소인 AMPK와 ACC의 인산화 발현을 western blot 방법으로 측정하였다.

그 결과, ACC 인산화 단백질(p-ACC)의 발현은 정상군에

비해 모과추출물 처리농도에 의존적으로 증가하였으며, metformin 처리군에서도 정상군에 비해 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 또한 AMPK 인산화 단백질(p-AMPK)의 발현은 정상군에 비해 모과추출물 처리 농도에 의존적으로 증가하였으며, metformin 처리군에서는 유의적인 증가($p < 0.01$)를 나타내었다(Fig. 4B).

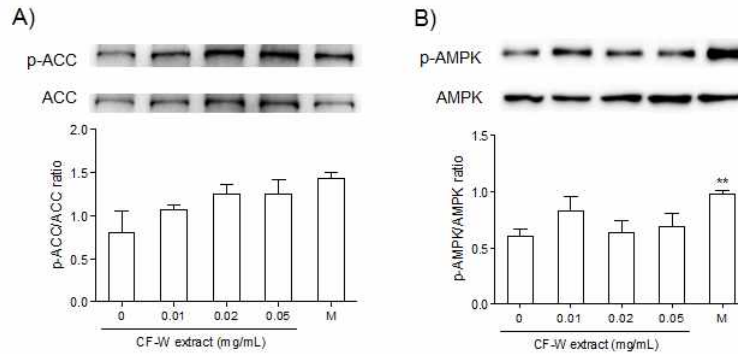


Fig. 4. Effects of CF-W extract on the phosphorylation of ACC and AMPK in C2C12 myotubes. Cells were treated with CF-W (0.01, 0.02, and 0.05 mg/mL) or metformin (2.5 mM/mL) for 48 hr. The expressions of ACC (A) and AMPK (B) were analyzed by western blotting. All data were presented as the means \pm SD of three independent experiments. M, metformin-treated cells. ** $p < 0.01$ vs. non-treated cells.

5. 에너지 생산에 대한 효과

C2C12 myotubes에서 모과추출물의 당소모 촉진 및 에너지합성 증가 효과를 확인하기 위해 세포 내 glucose의 농도와 ATP의 농도를 측정하였다.

그 결과, 세포 내 glucose의 농도는 모과추출물 0.01 mg/mL ($p < 0.01$), 0.02 mg/mL ($p < 0.001$), 0.05 mg/mL ($p < 0.01$)

처리 농도에서 정상군에 비해 모두 유의적으로 증가하였으며, metformin 처리군에서도 유의적으로 증가($p < 0.001$)를 나타내었다(Fig. 5A). ATP의 농도에서도 정상군에 비해 모과추출물 0.02 mg/mL ($p < 0.05$), 0.05 mg/mL ($p < 0.05$) 및 metformin ($p < 0.01$) 처리에 의해 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5B).

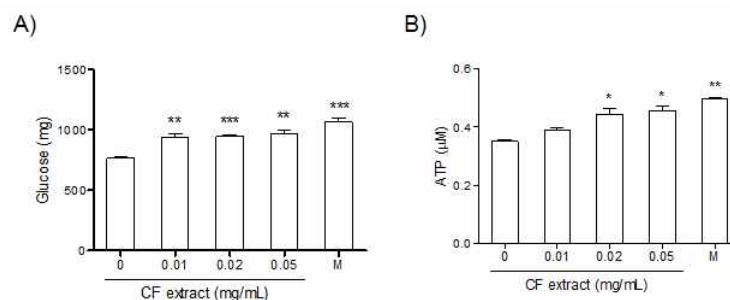


Fig. 5. Effects of CF-W extract on the levels of glucose and ATP in C2C12 myotubes. Cells were treated with CF-W (0.01, 0.02, and 0.05 mg/mL) or metformin (2.5 mM/mL) for 48 hr. (A) The cellular levels of glucose were measured by a glucose uptake assay. (B) The contents of ATP were measured by an ATP assay. All data were presented as the means \pm SD of three independent experiments. M, metformin-treated cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. non-treated cells.

IV. 고찰

모과는 溫, 酸한 性味를 가진 약재로 舒筋活絡, 和胃化濕하는 효능으로 濕痺拘攣, 腰膝關節酸重疼痛, 吐瀉轉筋, 脚氣水腫 등의 증상을 치료하는 데에 사용하는 것으로 알려져 있다¹⁰. 최근 모과추출물의 지방세포 분화 억제 및 고지방식이-유도 비만 마우스에서의 항비만 효과¹¹, 미백효과^{12,13}, 항응고 효과¹⁴, 항산화, 미백, 주름개선을 통한 피부기능 조절효과¹⁵, 대식세포에서 염증 사이토카인 분비 억제를 통한 항염증 효과¹⁶,

사람의 간세포에서의 AMPK 인산화 촉진을 통한 대사조절효과¹⁷, carbachol 투여로 인해 항진된 흰쥐의 장운동 억제 효과¹⁸ 및 모과추출물과 구성성분에 대한 약리학적 문헌고찰¹⁹ 등 다양한 보고가 이루어졌다. 그러나 모과추출물의 근육에 대한 조절효과는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 한의학의 간주근, 비주기육 이론과 모과의 舒筋活絡 효능 및 간과 비로 입하는 귀경 특성을 활용하여 골격근세포에서의 근 분화 조절 및 에너지대사 조절효과를 확인하였다.

골격근은 인체 기관 중 미토콘드리아를 가장 풍부하게 가

지고 있는 조직이며, 체내 에너지대사 항상성 조절 뿐 아니라 열 생산을 조절하는 핵심기관이다. 따라서 당과 지방 대사 조절을 통한 비만과 제2형 당뇨병 등 만성 대사성질환 치료의 중요한 표적기관이 되고 있다^{6,20-22}. 또한 근육 내 산화물질, 지방, 염증성 사이토카인 등이 축적되면 지방산 산화력 감소, 단백질의 이화, 동화작용 불균형, 염증 및 인슐린 저항성 유발 등을 통해 기능손상을 유발하게 되고, 이는 위성세포(satellite cell)나 근육아세포(myoblast)의 분화, 증식, 성장 과정에 영향을 미치게 되어 결국 근육량 감소로 인한 각종 장애를 초래하게 된다^{23,24}. 따라서 근세포의 분화, 증식, 성장을 유효하게 조절하는 것은 근 기능 감소를 예방하는데 좋은 방법이 될 수 있다.

근세포는 미분화 상태의 위성세포나 근육아세포에서 성숙한 근관세포(myotube)로 분화하게 되며^{25,26} 근 분화(myogenesis) 과정에서 MyoD, Myf5, myogenin, MRF4와 같은 근 분화 유도인자들(myogenic regulatory factors, MRFs)의 발현 변화와 미오신(myosin) 구성 단백질의 일종인 MHC의 발현 증가를 동반하게 된다²⁷⁻²⁹. 본 연구에서는 대표적인 근분화 유도 단백질인 myogenin과 MHC의 발현을 확인하였으며, 모과추출물의 처리는 농도에 의존적으로 이들의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 특히 MHC의 발현은 모과추출물에 의해 유의적으로 증가하고 면역조직화학염색을 통한 형태관찰에서도 모과추출물 처리 후 길고 굵은 근관의 형성이 잘 이루어지는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 모과추출물이 근세포 분화를 촉진하는데 도움을 줄 수 있음을 의미한다. 한편, 대조약물로 활용한 메트포민은 MHC 발현 변화에 영향을 주지 않았으며 이는 AMPK activator인 메트포민이 에너지대사 증진 효과는 있으나 근분화에는 효과가 없음을 의미한다.

PGC1 α 는 근육 내 에너지대사를 조절하는 중요한 인자로 지방산 산화를 조절하고 미토콘드리아의 생합성 증진을 통해 에너지양을 증가시키게 된다^{30,31}. 또한 PGC1 α 는 NRF1, TFAM, Sirt1 등과 같은 미토콘드리아의 증식과 에너지 항상성 조절 및 호흡작용에 영향을 주는 전사인자들을 활성화시키는 것으로 알려져 있다³²⁻³⁴. 본 연구에서는 근세포에서 모과추출물에 의한 에너지 증가작용을 확인하기 위해 PGC1 α , Sirt1, NRF1, TFAM의 유전자 및 단백질의 발현 변화를 확인하였으며 이들 조절인자들의 발현이 모과추출물 처리에 의해 증가되는 것을 확인하였다. 특히 PGC1 α 와 TFAM의 발현이 모과추출물 처리 농도에 의존적으로 증가하였으며 정상군 대비 유의적인 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 모과추출물이 근세포에서의 에너지대사 조절인자들의 발현 조절을 통해 미토콘드리아의 에너지합성 작용을 촉진할 수 있음을 의미한다.

AMPK는 세포 내 에너지의 항상성을 유지하는 센서 역할을 하는 중요한 신호전달효소로 인체는 AMPK와 ATP의 비율에 따라 세포 내 에너지 상태를 감지함으로써 당, 지질, 단백질 대사를 조절하게 된다. 또한 AMPK는 PGC1 α , Sirt1, NRF1, TFAM 등과 같은 에너지대사 조절인자들의 발현 증가를 유도하여 당 분해와 소모를 촉진시키고, 지방산 산화작용을 촉진함으로써 최종 세포 내 ATP의 합성을 증진시키게 된다. 따라서 주요 에너지 항상성 유지 기관인 골격근에서의 AMPK 활성화 전략은 지방산 산화와 당 흡수 촉진을 통한 인슐린 저항성 개선 및 혈당조절 효과를 통한 비만과 당뇨병의 치료 표

적이 되고 있다^{35,36}. 한편 ACC는 지방산 대사 조절효소로 AMPK 활성화에 의해 인산화되어 지질합성에 관여하게 된다^{37,38}. 본 연구에서 모과추출물은 C2C12 myotubes에서 AMPK와 ACC의 인산화를 증가시켰으며 이는 모과추출물이 근육 내 당과 지방산 대사를 증진시킴으로써 에너지 항상성 조절에 효과가 있음을 의미한다. 또한 본 연구에서는 근세포 내 생성되는 에너지의 양적 변화를 확인한 결과 모과추출물 처리 후 세포 내 glucose uptake 능력이 증가되고, ATP 생산량이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 모과추출물이 근세포에서 실질적 에너지생산 증가에 도움을 줄 수 있음을 의미한다.

결론적으로 모과추출물은 C2C12 근세포에서 근 분화를 촉진시키고, PGC1 α , Sirt1, NRF1, TFAM 등의 미토콘드리아-매개 에너지대사 조절인자들의 발현 증가와 AMPK/ACC signaling pathway 활성화를 통해 당 소모 촉진 및 에너지 생산에 도움을 줄 수 있는 것으로 나타났으며, 이는 비만이나 당뇨병과 같은 대사성 질환 발생에 따른 근육기능 저하나 근감소증 발생에 긍정적인 효과를 줄 수 있음을 의미한다. 향후 모과추출물의 근감소증 예방 및 치료용 소재로서의 유효성 확보를 위해서 근감소증 세포모델 및 동물모델에서의 효능 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 C2C12 골격근세포에서 모과추출물(CF-W extract)의 근분화 및 에너지대사 조절에 대한 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 모과추출물은 C2C12 myotubes에서 myogenin과 MHC의 단백질 발현을 증가시켰다.
2. 모과추출물은 C2C12 myotubes에서 미토콘드리아-매개 에너지합성 조절인자들인 PGC1 α , Sirt-1, NRF-1, TFAM의 유전자와 단백질 발현을 증가시켰다.
3. 모과추출물은 C2C12 myotubes에서 ACC와 AMPK의 인산화를 증가시켰다.
4. 모과추출물은 C2C12 myotubes에서 glucose의 소모와 ATP의 합성을 증가시켰다.

이상의 결과로부터 모과추출물은 골격근세포에서 근분화 및 에너지대사 조절인자들의 발현을 증진시킴으로써 당 소모 촉진과 에너지 생성 증가를 통해 근육 기능 증진에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대되었다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 교육부 이공분야기초연구지원사업 연구비 지원으로 수행되었습니다(No. 2016R1D1A1B04935601).

References

1. Park SW. Sarcopenia of the old age. *Endocrinol Metab.* 2007 ; 22(1) : 1–7.
2. Papa EV, Dong X, Hassan M. Skeletal Muscle Function Deficits in the Elderly: Current Perspectives on Resistance Training. *J Nat Sci.* 2017 ; 3(1) : e272.
3. Kalyani PR, Corriere M, Ferrucci L. Age-related and disease-related muscle loss: The effect of diabetes, obesity, and other diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 ; 10 : 819–29.
4. Wing RR, Goldstein MG, Acton KJ, Birch LL, Jakicic JM, Sallis JF Jr, Smith-West D, Jeffery RW, Surwit RS. Behavioral science research in diabetes: lifestyle changes related to obesity, eating behavior, and physical activity. *Diabetes Care.* 2001 ; 24 : 117–23.
5. DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009 ; 32(suppl 2) : S157–S63.
6. Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 ; 9(6) : 465–82.
7. Kwon SC, Lee SR. The Oriental Medical Study of Myofascial Pain Syndrome about Shoulder. *Korean J Acupunct.* 2003 ; 20(1) : 72–87.
8. Kim JN, Kim YI, Hong KE, Yim YK, Lee H. The study of muscular system about small intestine channel of hand taiyang muscle. *Daejeon Univ J Orient Med.* 2005 ; 14(1) : 67–80.
9. Heo J. Donguibogam. Seoul : Ryo-gang publisher, 1994 : 952–81.
10. The National College of Korean Medicine Herbology Classroom. *Herbology.* Seoul : Youngrimsa, 2006 : 318–9.
11. Kim DH, Kwon BR, Kim SJ, Kim HJ, Jeong SI, Yu KY, Kim SY. Anti-obese Effects and Signaling Mechanisms of *Chaenomeles sinensis* extracts in 3T3-L1 Preadipocytes and Obese Mice Fed a High-fat Diet. *Herbal Formula Sci.* 2017 ; 25(4) : 457–69.
12. Lee YM, Shin HD, Lee JJ, Lee MY. Antioxidative Effect of *Chaenomelis Fructus* Ethanol Extract. *Korean J Food Preserv.* 2007 ; 14(2) : 177–82.
13. Hur SS, Kim IC. Antioxidative Properties and Whitening Effects of the *Chaenomelis fructus*, *Armeniaca semen* and *Thujae semen*. *J Investig Cosmetol.* 2011 ; 7(4) : 383–7.
14. Yoo JH, Han SH, Kil GJ. Active Effect of Anticoagulant Effects in *Chaenomelis Fructus* Water Extract. *Kor J Herbol.* 2009 ; 24(2) : 7–11.
15. Choi JM. Skin Controlling effects of the extracts of *Chaenomeles sinensis* Koehne. Chungang University, 2008.
16. Ryu HW, Kim YS, Lim EM. The Antiinflammatory Effects of *Chaenomelis Fructus Herba* Water Extract on Mouse RAW 264.7 Cell. *J Orient Obstet Gynecol.* 2012 ; 25(3) : 1–15.
17. Zak ę os-Szyda M, Pawlik N. Japanese quince (*Chaenomeles japonica* L.) fruit polyphenolic extract modulates carbohydrate metabolism in HepG2 cells via AMP-activated protein kinase. *Acta Biochim Pol.* 2018 ; 65(1) : 67–78.
18. Choi YS, Han HS, Lee YJ. Study of the Intestinal Motility Effects of *Chaenomelis Sinensis Fructus* and *Chaenomelis Lagenariae Fructus*. *Kor J Herbol.* 2010 ; 25(4) : 113–20.
19. Zhang SY, Han LY, Zhang H, Xin HL. *Chaenomeles speciosa*: A review of chemistry and pharmacology. *Biomed Rep.* 2014 ; 2(1) : 12–8.
20. Daneschvar HL, Aronson MD, Smetana GW. FDA-approved anti-obesity drugs in the United States. *Am J Med.* 2016 ; 129(8) : 879.
21. Krssak M, Petersen KF, Dresner A, DiPietro L, Vogel S, Rothman D, et al. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1H NMR spectroscopy study. *Diabetologia.* 1999 ; 42 : 113–6.
22. Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, Manco M, Morroni M, Cinti S, et al. Insulin resistance in morbid obesity reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes.* 2002 ; 51 : 144–51.
23. Akhmedov D, Berdeaux R. The effects of obesity on skeletal muscle regeneration. *Front Physiol.* 2013 ; 4 : 371.
24. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol.* 2012 ; 8(8) : 457–65.
25. Burattini S, Ferri P, Battistelli M, Curci R, Luchetti F, Falcieri E. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur J Histochem.* 2009 ; 48(3) : 223–34.
26. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 ; 4(2) : a008342.
27. Ferri P, Barbieri E, Burattini S, Guescini M, D'Emilio A, Biagiotti L, et al. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *J Cell Biochem.* 2009 ; 108(6) : 1302–17.
28. Dedieu S, Mazères G, Cottin P, Brustis JJ.

- Involvement of myogenic regulator factors during fusion in cell line C2C12. *Int J Dev Biol*. 2002 ; 46 : 235-41.
29. Wells L, Edwards KA, Bernstein SI. Myosin heavy chain isoforms regulate muscle function but not myofibril assembly. *EMBO J*. 1996 ; 15(17) : 4454-9.
 30. Liang H, Ward WF. Pgc-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Eudc*. 2006 ; 30 : 145-51.
 31. Richard C, Scarpulla. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*. 2011 ; 1813(7) : 1269-78.
 32. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol*. 2005 ; 25(4) : 1354-66.
 33. Wagatsuma A, Sakuma K. Mitochondria as a potential regulator of myogenesis. *Sci World J*. 2013 ; 2013 : 593267.
 34. Duguez S, Féasson L, Denis C, Freyssenet D. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 ; 282(4) : E802-E9.
 35. Hardie DG: AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 ; 8 : 774-85.
 36. Koh HJ, Brandauer J, Goodyear LJ. LKB1 and AMPK and the regulation of skeletal muscle metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 ; 11(3) : 227.
 37. Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferfe P, Fougelle F. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1998 ; 273 : 14767-71.
 38. Lage R, Diéguez C, Vidal-Puig A, Lopez M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med*. 2008 ; 14 : 539-49.