

제브라피쉬 근육성장에서의 carnosic acid의 효과

김정환 · 진덕희 · 김영대¹ · 진형주*

강릉원주대학교 해양분자생명공학과, ¹국립수산과학원 동해수산연구소

Effects of Carnosic Acid on Muscle Growth in Zebrafish (*Danio rerio*) by Jeong Hwan Kim, Deuk-Hee Jin, Young-Dae Kim¹ and Hyung-Joo Jin* (Department of Marine Molecular Biotechnology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea; ¹Aquaculture Division, East Sea Regional Fisheries Research Institute, Gangneung 210-860, Korea)

ABSTRACT Myogenesis is the formation process of multinucleated myofiber with a contractile capacity from muscle satellite cell (MSCs) during life. This process is tightly controlled by several transcription factors such as Pax3 and Pax7 (paired box protein 3 and 7), MEF2C (myocyte enhancer factor 2) and MRFs (myogenic regulatory factors) etc. On the contrary, myostatin (MSTN) is a transforming growth factor- β superfamily, which functions as a negative regulator of skeletal muscle development and growth. Carnosic acid (CA) is a major phenolic component in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and have been reported various biological activities such as anticancer, antioxidant, antimicrobial and therapeutic agents for amnesia, dementia, alzheimer's disease. This study was confirmed to effects of CA on muscle cell line and muscle tissue alteration of zebrafish by intramuscular injection or feeding methods. 10 μ M CA showed a non-cytotoxic on myoblast and a complete inhibition effect against myostatin activity on luciferase assay. In intramuscular injection experiment, the total protein and triglyceride amount of 10 μ M/kg of CA injected group increased by 11% and decreased by 13% compared to these of the no injected group. In histology analysis of muscle tissues by hematoxylin/eosin staining, the number of muscle fiber of 10 μ M/kg of CA injected group decreased by 29% and fiber area increased 40% compared to these of no injected group. In feeding experiment, the total protein and triglyceride amount no significance difference compared to these of the normal feeding group. In histology analysis, the number of muscle fiber of 1% CA fed group decreased by 35% and fiber area increased 56% compared to these of normal fed group. We identified that CA have an effect on hypertrophy of muscle fiber in adult zebrafish and the results of this study are considered as the basic data that can reveal the mechanisms of muscle formation via gene and protein level analysis.

Key words : Carnosic acid, zebrafish, muscle, hypertrophy, hyperplasia

서 론

근육은 에너지 대사 및 운동능력에 있어서 매우 중요한 기관이다 (Braun and Gautel, 2011). 근육분화 (myogenesis)는 근원전구세포인 근육위성세포 (muscle satellite cell, MSCs)가 수축성을 가지는 다핵성의 근섬유로 형성되는 과정을 말하

며 paired box protein 3 (Pax3), paired box protein 7 (Pax7), myocyte enhancer factor 2 (MEF2), myogenic regulatory factors (MRFs) 등과 같은 다양한 전사인자들에 의해 조절된다 (Lee *et al.*, 2013). Pax3, Pax7은 세포의 생존, 재생, 분열 및 근육 전구 세포의 분화에 관여하며 특히 Pax3는 초기 발생 과정에서 근육 전구세포의 분화에 영향을 미친다 (Relaix *et al.*, 2005). MyoD, Myf5, MRF4, myogenin을 통틀어 MRFs라 부르며 이 중 MyoD와 Myf5는 근원세포의 분열, MRF4, myogenin과 MEF2는 근관세포로의 분화에 영향을 미친다

*Corresponding author: Hyung-Joo Jin Tel: 82-33-640-2349
Fax: 82-33-640-2340, E-mail: hj-jin@gwnu.ac.kr

(Relaix *et al.*, 2005). 한편 근육의 분화와 분열을 억제하는 인자인 myostatin은 TGF- β (transforming growth factor β) super-family에 속하는 전사인자로서 자연적인 돌연변이로 인한 myostatin 유전자의 결손이 나타난 Belgian blue와 piedmontese종은 근육의 양이 정상개체보다 두 배 많은 대신 지방의 함량은 적은 것으로 보고되어 있다(McPherron and Lee, 2005). 또한 유전자 조작 기법을 통해 마우스의 myostatin 유전자를 결손시킨 결과 정상개체에 비해 근섬유의 과비대 및 과형성에 의한 근육양의 증가가 보고되었다(Fries *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron and Lee, 2005). 어류의 myostatin 구조 및 기능은 포유류와 유사하지만 조직 특이적 발현 정도 및 유전자 동형은 차이를 보인다(Ostbye *et al.*, 2007). 이러한 이유로 다양한 어류에서 유전자 knock-out 또는 knock-down 기법을 통해 myostatin에 관한 연구가 진행되고 있다. 최근 RANi 기법을 통한 myostatin 유전자의 knock-out된 zebrafish의 경우 정상개체에 비해 근섬유의 수가 증가 및 MRFs의 발현 증가가 보고되었다(Amali *et al.*, 2004). 또한 myostatin의 대표적인 antagonist로 알려진 myostatin prodomain의 과 발현 및 우성음성 돌연변이(dominant negative mutant) 제브라피쉬의 경우 근섬유의 과비대로 인한 근육양의 증가가 나타났다(Xu *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2013). 어류의 성장 및 근육의 발생에 있어서 myostatin 역할의 중요성을 나타내지만 아직까지 myostatin 억제에 관한 분자적 메커니즘이나 신호 경로에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

로즈마리는(*Rosmarinus officinalis*) 지중해 지역이 원산지로 강한 향과 다량의 방향족 화합물을 함유하고 있는 특성 때문에 향신료 및 식품 방부제 원료, 민간 요법으로 많이 이용되고 있다(Benzie and Wachtel-Galor, 2011). 특히 항암, 항균, 항비만, 항산화 효과가 보고되어 있는 페놀 화합물 계열인 carnosic acid(CA), carnosol, rosmarinic acid, ursolic acid 등과 다양한 생리활성물질들을 함유하고 있다(Yesil-Celotkas *et al.*, 2010; Benezie and Wachtel-Galor, 2011; Lopez-Jimenez *et al.*, 2013). 최근 ursolic acid가 IGF 신호경로를 통해 골격근의 위축을 억제할 수 있다는 사실이 마우스 연구를 통해서 밝혀졌고, 이로 인해 다양한 페놀계 화합물과 근육 성장 및 근육 위축에 관한 연구가 다양하게 진행 중에 있다.

제브라피쉬는 유전자 및 기관형성이 인간과 유사한 특징을 가지고 있으며, 투명한 배아는 기관형성 과정, 다양한 생물학적 반응들에 대해서 실시간 관찰이 용이하며 유전자 조작 및 유지비용의 경제성 등의 장점으로 동물모델로서 높은 가치를 인정받고 있다(Seth *et al.*, 2013). 포유류와는 달리 제브라피쉬는 한번에 200~300개의 알을 낳으며 발생이 빠른 장점을 이용하여 한번에 많은 수의 천연물 스크리닝에 이용되고 있으며 이러한 *in vivo* 수준에서의 스크리닝을 통해 포

유류를 이용한 동물실험에서 경우의 수를 낮출 수 있는 장점이 있기 때문에 최근에 다양한 연구에서 사용되고 있다(Leonard and Randall, 2005). 따라서 본 연구에서는 로즈마리가 포함하고 있는 대표적인 페놀계 화합물인 carnosic acid가 제브라피쉬의 근육성장에 미치는 영향을 확인해보고자 한다.

재료 및 방법

1. WST assay

L6(KCBL No. 21458), C2C12(ACTC No. AC30004) 근육 세포에 대한 carnosic acid(CA, TCI, Japan)의 세포독성을 WST assay(ITBio, Korea)를 통해 확인하였다. 각 세포는 96 well plate에서 well당 1×10^5 cells개씩 DMEM(10% FBS, 1% penicillin/streptomycin) 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C가 유지한 상태에서 배양하였다. 24시간 후 CA를 1, 5, 10, 50, 100 μ M/well로 처리하였고 10시간 후 10 μ L의 WST reagent를 첨가하고, 1시간 후 450 nm(Tecan, Durham, NC, USA)에서 흡광도를 측정하였다.

2. pGL3-(CAGA)₁₂-luciferase reporter assay

L6 세포에서 pGL3-(CAGA)₁₂-luciferase reporter assay를 이용한 myostatin 활성 억제능을 측정하였다. 세포를 96 well plate에 well당 8×10^3 cell/200 μ L로 24시간 동안 배양한 후 0.1 μ g의 pGL-(CAGA)₁₂ plasmid와 0.05 μ g의 pRL-TK plasmid(Promega, Madison, USA)를 형질 도입하였다(FuGENE 6 transfection Reagent, Promega, Madison, USA). 24시간 후, 혈청이 제거된 DMEM으로 교체하였고, 9시간 후 3 ng/mL의 재조합 myostatin(R&D systems, USA)과 CA를 1, 5, 10 μ M/well로 각각 처리하였다. 6시간 후 Dual-Glo luciferase assay system(Promega, USA)을 이용하여 microplate luminometer(Berthold, USA)에서 luciferase activity를 측정하였다.

3. 제브라피쉬 사육

제브라피쉬는 생후 3개월된 개체를 구입하여(Seoulaqu, Korea) 사육하였다. 사육 수는 UV 멸균된 수돗물을 이용하여 1일 1회 환수하였고 수온을 $28.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. 광주기는 14L:10D을 유지하여 사육하였으며 먹이는 1일 3회 사료를(Color charasin, 43.8% crude protein, 4.5% crude lipid, 2.75% calcium, 2.62% crude fiber, 11.79% crude ash, 1.8% phosphorus, JAQNO, Korea) 급여하였다.

4. CA 근육 내 주사

근육 내 주사 실험을 위해 각 그룹은 0.7 L 사육조 내에

5마리씩 총 4개의 사육조(n=20)로 구성하여 배양기 내에서 사육하였다. 대조구는 주사를 실시하지 않은 그룹과 corn oil을 주입한 그룹, 실험구는 5 $\mu\text{M}/\text{kg}$ 과 10 $\mu\text{M}/\text{kg}$ 의 CA를 주입한 그룹으로 실험을 진행하였다. CA는 corn oil (Sigma, USA)에 녹여 사용하였으며 시료의 주입은 10 μL microsyringe (701RN, HAMILTON, USA)에 32 gauge needle을 이용하여 개체당 1 μL 씩 주입하였다. 근육 내 주사의 부위는 등 지느러미를 기준으로 좌, 우 1 mm 내에 근육이 많은 부분에 주입하였으며 매주 그 위치를 바꾸어 주입하였다. 근육 내 주사 회수는 주 1회 주입, 총 4주간 실험하였으며 매주 개체간 체중 및 체장을 측정하였다.

5. CA 사료

사료를 통한 CA의 효과를 알아보기 위한 실험을 위해 각 그룹은 0.7L 사육 조 내에 5마리씩 총 4개의 사육 조(n=20)로 구성하여 배양기 내에서 사육하였다. CA는 ethanol에 녹여 사료에 0, 1, 5%가 포함되도록 배합하여 급여하였다. 사료는 1일 3회 급여하였으며 매주 개체간 체중 및 체장을 측정하였다.

6. 근육 내 단백질 및 중성지방 함량

제브라피쉬 근육 내 단백질 함량은 근조직으로부터 BCA protein assay kit (Pierce, USA)을 이용하여 측정하였으며 중성지방을 함량은 Triglyceride quantification kit (Biovision, USA)을 이용하여 측정하였다.

7. 근조직 분석

근섬유 분석은 근육조직을 bouin's 용액에 고정한 후 파라핀 침투 후 microtome을 이용하여 5 μm 두께로 박편을 제작하였다. 이후 hematoxylin/eosin 염색을 한 후 Image J 프로그램을 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) 이용하여 근섬유의 수, 면적, 지름을 측정하였다.

8. 통계처리

통계처리는 SPSS 20.0 프로그램을 이용하여 one way ANOVA test를 실시하여 Duncan 검정을 통해 개체 무게, 단백질과 중성지방의 함량, 근섬유의 수와 평균 면적을 분석하였다.

결 과

1. CA 세포 독성 및 myostatin 활성 저해 능

마우스 유래의 근육세포인 C2C12세포에서 CA의 IC50은

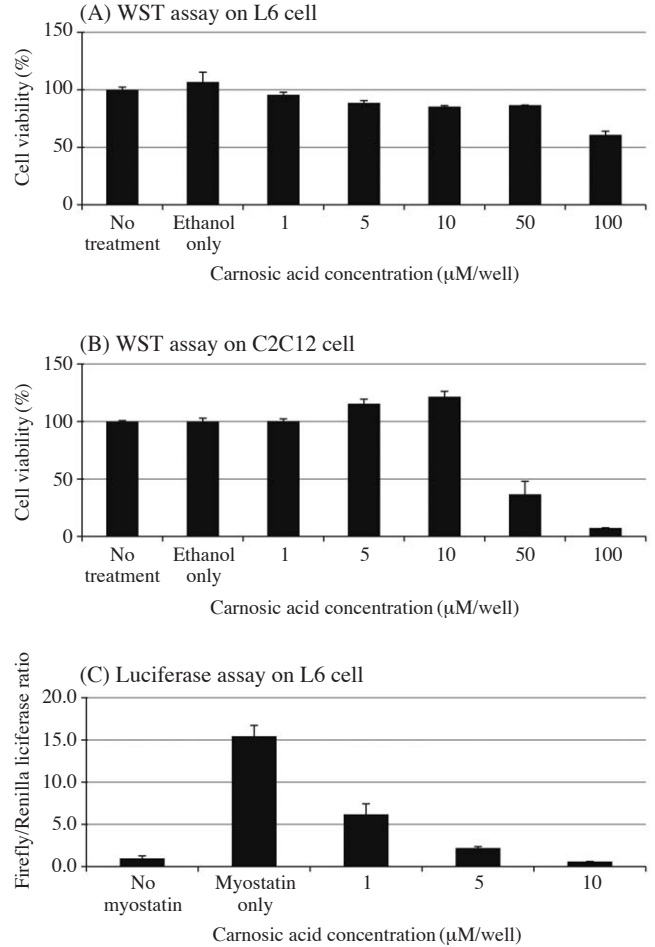


Fig. 1. The cell cytotoxicity and myostatin signal inhibitory activity. (A) Effect of carnosic acid on L6 cell viability by WST assay (IC50=168.4 μM). (B) Effect of carnosic acid on C2C12 cell viability by WST assay (IC50=41.88 μM). Data are expressed as percentage of un-treatment control (which is set at 100%) \pm SD (n=3). (C) Myostatin signal inhibitory effect of carnosic acid on L6 by Luciferase assay (IC50=1.23 μM).

41.88 μM , 랫 유래의 근육세포인 L6세포의 IC50은 168.4 μM 로 확인되었다(Fig. 1A, B). Luciferase assay system을 이용하여 CA의 myostatin 활성 저해 능력을 확인해본 결과 10 μM 에서 myostatin 활성을 저해하는 것으로 확인되었다(Fig. 1C).

2. 근육 내 주사에 의해 CA가 제브라피쉬 근육에 미치는 영향

4주 동안 CA를 근육 내 주사를 통해 주입한 결과 제브라피쉬의 체중은 그룹 간에 유의적인 차이를 보이지 않았지만 10 $\mu\text{M}/\text{kg}$ 의 CA를 주입한 그룹이 대조구에 비해 체장이 감소한 것을 확인하였다. 무게에 따른 성장률에서 대조구의 경우 약 10%의 성장률을 보인 반면, 5 $\mu\text{M}/\text{kg}$ 의 CA를 주입한 그룹은 3%, 10 $\mu\text{M}/\text{kg}$ CA 주입 그룹은 5%의 증가율을

Table 1. Biometric and morphometric properties of muscle fiber in zebrafish injected with carnosic acid (CA)

	No injected group	Corn oil injected group	5 $\mu\text{M}/\text{kg}$ CA injected group	10 $\mu\text{M}/\text{kg}$ CA injected group
Final body weight (g)	0.32 \pm 0.02 ^{ns}	0.32 \pm 0.01	0.31 \pm 0.02	0.31 \pm 0.01
Final body length (mm)	34.00 \pm 0.21 ^b	34.00 \pm 0.50 ^{ab}	34.00 \pm 0.51 ^{ab}	33.00 \pm 0.34 ^a
Growth rate (%)	10.34	5.75	2.79	5.14
Muscle fiber number	39.67 \pm 0.33 ^b	40.00 \pm 4.16 ^b	32.00 \pm 3.00 ^{ab}	28.33 \pm 3.53 ^a
Muscle fiber area (μm^2)	674.88 \pm 16.44 ^a	680.34 \pm 43.80 ^a	798.8 \pm 39.21 ^{ab}	944.39 \pm 116.05 ^b
Distribution of muscle fiber*				
Area	Less than 400 μm^2 (%)	23.55 \pm 1.78 ^{ns}	26.98 \pm 2.91	32.09 \pm 6.07
	More than 1,000 μm^2 (%)	16.03 \pm 3.53 ^a	20.11 \pm 6.28 ^a	31.22 \pm 2.00 ^{ab}
Diameter	Less than 20 μm (%)	27.69 \pm 2.72 ^{ns}	29.15 \pm 3.99	31.82 \pm 3.90
	More than 30 μm (%)	25.32 \pm 6.61 ^a	21.7 \pm 5.01 ^a	36.69 \pm 2.35 ^{ab}

Values are given as means together with standard deviation, Number and area of muscle fibers within $4.0 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, N=3

Growth rate calculated as [(final weight - initial weight)/initial weight] \times 100]

^{ns}No significance, different letters are significantly difference ($p < 0.05$, * $p < 0.1$)

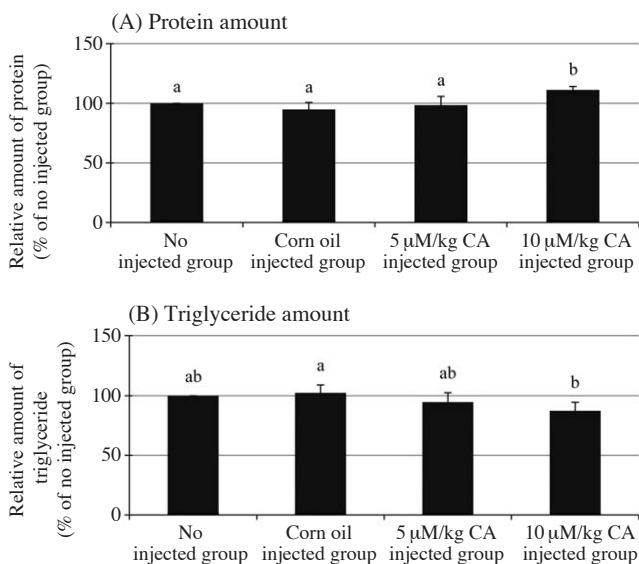


Fig. 2. Biochemical analysis of muscle fiber in zebrafish injected with CA. (A) Total protein amount, (B) triglyceride amount (black bar), different letters are significantly difference ($p < 0.15$).

보였다(Table 1). 근육조직 내 단백질과 중성지방의 함량 분석결과 10 $\mu\text{M}/\text{kg}$ CA 주입 그룹에서 대조구에 비해 단백질 함량은 11% 증가하였고, 중성지방의 함량은 13% 감소하였다(Fig. 2A, B). 근섬유의 크기 및 평균면적 분석을 위한 조직분석 결과, 대조구에 비해 10 $\mu\text{M}/\text{kg}$ CA 주입 그룹이 근섬유의 수는 29% 감소하였고, 근섬유의 평균 면적은 40% 증가하였다. 유사하게 1,000 μm^2 이상의 근섬유의 분포가 대조구에 비해 153% 증가하였고 30 μm 크기의 지름을 가지는 근섬유의 분포 또한 80% 증가하였다(Table 1, Fig. 3).

3. 사료를 통한 CA가 제브라피쉬 근육에 미치는 영향

근육 내 주사 실험과 마찬가지로 4주간 사료에 CA를 첨

가하여 급여한 결과 체중 및 체장 모두 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 체중에 따른 성장률은 대조구가 15% 증가한 반면, 1% CA 사료 그룹이 11%, 5% CA 사료 그룹이 4%의 성장률을 보였다(Table 2). 근육 조직 내 단백질과 중성지방의 함량을 분석해본 결과 그룹 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 4A, B). 근육 섬유의 조직 분석 결과, 1% CA 사료 그룹이 대조구에 비해 근섬유의 면적은 35% 감소하고 근섬유의 평균 면적은 56% 증가하였다. 유사하게 1,000 μm^2 이상 근섬유 및 30 μm 이상의 지름을 가진 근섬유의 분포가 대조구에 비해 각각 136%, 98% 증가하였다(Table 2, Fig. 5).

고찰

천연물의 경우 합성 화합물에 비교적 경제적이고, 멀티타겟 효과 및 부작용이 적은 장점으로 인해 여러 분야에서 높은 관심을 보이고 있다(Harvey, 2008). 생명공학 분야에 있어서 천연물에 관한 연구는 인간에게 나타날 수 있는 질환의 치료 목적으로서 사용할 수 있도록 다양한 생리활성을 검증하고 있고 그 결과 전 임상 및 임상단계 수준의 천연물도 다수 보고되고 있다(Harvey, 2008).

개체 성장에 있어서 근육의 발달은 근섬유의 과형성과 과비대의 메커니즘이 적절히 조절되면서 일어나게 된다. 특히 이러한 메커니즘에 있어서 IGF/Akt/mTOR 신호와 myostatin 신호는 근육을 형성하는 단백질의 합성 및 억제에 있어서 매우 중요한 신호 경로로 알려져 있다(Thomas *et al.*, 2000; Bonaldo *et al.*, 2013). 특히 myostatin은 노화 또는 근육성이 영양증(DM, muscular dystrophy), 루게릭병(ALS, amyotrophic lateral sclerosis), 만성폐쇄성폐질환(COPD, congestive obstructive pulmonary disease), 만성심부전증(CHF, chronic heart failure), 후천성 면역결핍증후군(ADIS, acquired immune defi-

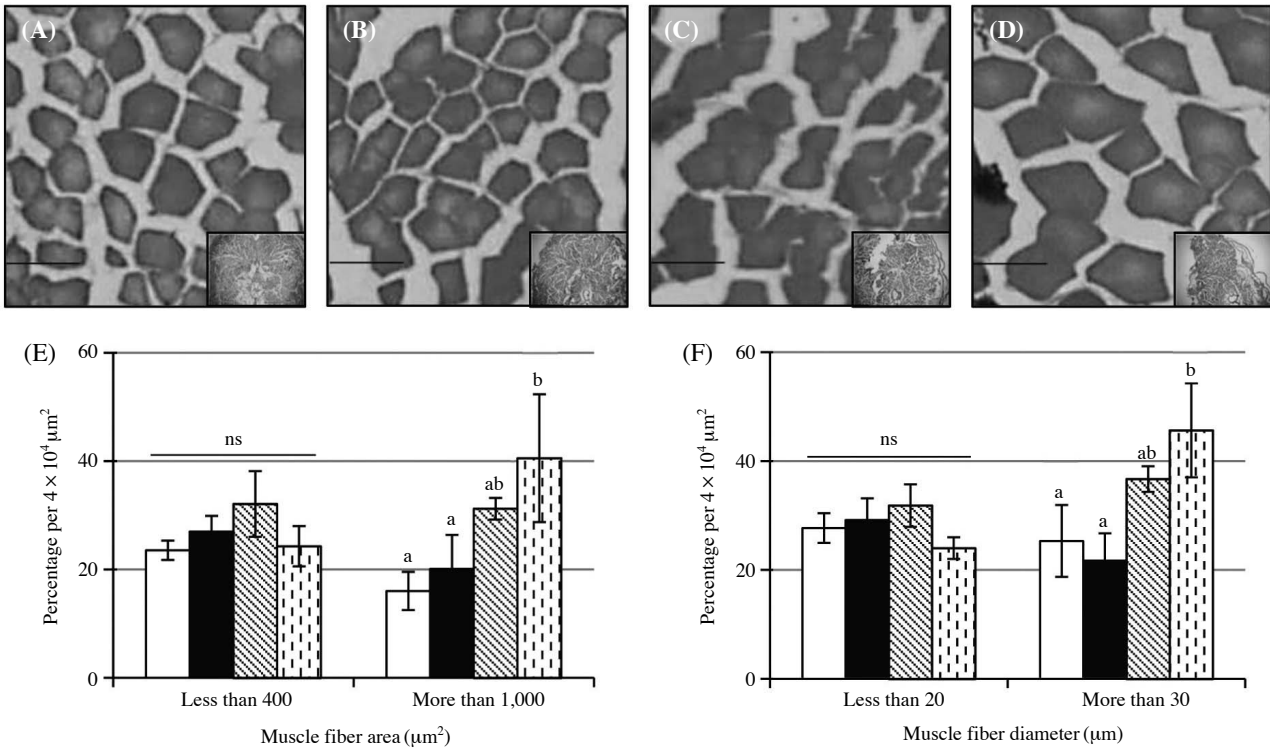


Fig. 3. Histology analysis of muscle fiber in zebrafish injected with CA. (A~D) histology image of muscle fiber, (E) muscle fiber distribution by average area, (F) muscle fiber distribution by diameter. No injection group (A, white bar), corn oil injected group (B, black bar), 5 μm/kg CA injected group (C, diagonal bar), 10 μm/kg CA injected group (D, dotted bar), scale bar is 50 μm, different letters are significantly difference ($p < 0.1$).

ciency syndrome), 암악액질 (cancer cachexia), 신부전 (renal failure), 요독증 (uremia), 류마티즘 관절염 (RA, rheumatoid arthritis) 등과 같은 다양한 질병에서 과잉 발현되는 것으로 알려져 있다 (Bonaldo *et al.*, 2013). 그러므로 천연물을 이용한 myostatin 신호 억제에 관한 연구가 다양한 질병에 따른 근육 소실을 해결할 수 있는 치료제로 부각되기 시작했다.

하지만 천연물을 이용한 근육성장효과를 어류수준에서 확인한 연구는 매우 미흡하다. 특히 제브라피쉬의 경우 주로 배아를 이용한 천연물의 독성 평가에 주로 활용되며 성체의 경우 재조합 단백질 및 유전자 조작 개체를 이용하여 근육 성장 메커니즘에 대한 연구가 대부분이다 (Amali *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011; Fuentes *et al.*, 2013).

본 연구에서 *in vitro* 수준에서 CA가 myostatin 신호의 억제능을 확인하였으며 성체 제브라피쉬를 이용한 *in vivo* 실험을 통해 로즈마리의 대표적인 페놀화합물인 CA가 제브라피쉬 근섬유에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 또한 *in vitro* 실험에서 CA의 효과는 세포에 따라 다른 경향을 나타내었다. 50 μM의 CA는 랫 유래의 근원세포인 L6 세포에는 아무런 영향을 미치지 않았지만, 마우스 유래의 근원세포인 C2C12 세포에는 약 60%의 세포 사멸을 확인할 수 있었다. 앞선 연구에 의하면 K-563, MCF-7, Hep-3B, PC-3, DU-145, MDA-MB-231 등과 같은 인간 유래의 다양한 암

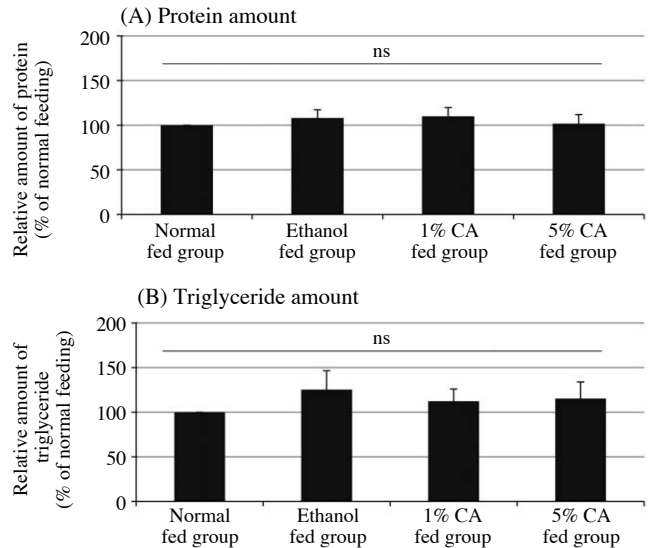


Fig. 4. Biochemical analysis of muscle fiber in zebrafish fed with CA. (A) Total protein amount, (B) triglyceride amount (black bar), different letters are significantly difference.

세포의 경우 CA가 항 증식효과가 있는 것으로 알려져 있고 (Yesil *et al.*, 2010) 백혈구 세포의 항 증식효과 및 분화 촉진, 항산화효과를 이용한 어류 및 육류의 부패방지, 지방

Table 2. Biometric and morphometric properties of muscle fiber in zebrafish fed with carnosic acid (CA)

	Normal fed group	Ethanol fed group	1% CA fed group	5% CA fed group
Final body weight (g)	0.37 ± 0.02 ^{ns}	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.33 ± 0.02
Final body length (mm)	33.67 ± 0.47 ^{ns}	33.89 ± 0.63	34.11 ± 0.54	33.56 ± 0.38
Growth rate (%)	15.25	1.42	11.11	3.86
Muscle fiber number	36.00 ± 1.73 ^{bc}	31.33 ± 2.03 ^b	23.33 ± 1.33 ^a	43.33 ± 3.53 ^c
Muscle fiber area (μm ²)	688.04 ± 84.89 ^{ab}	763.84 ± 35.81 ^b	1070.67 ± 40.51 ^c	511.01 ± 62.69 ^a
Distribution of muscle fiber*				
Area	Less than 400 μm ² (%)	21.79 ± 4.66 ^a	21.21 ± 1.02 ^a	10.14 ± 4.12 ^a
	More than 1,000 μm ² (%)	20.21 ± 8.86 ^a	23.02 ± 7.83 ^a	47.67 ± 6.06 ^b
Diameter	Less than 20 μm (%)	26.52 ± 3.58 ^b	23.48 ± 0.76 ^{ab}	11.66 ± 5.61 ^a
	More than 30 μm (%)	30.46 ± 8.68 ^b	43.99 ± 5.96 ^b	60.37 ± 3.26 ^c

Values are given as means together with standard deviation, Number and area of muscle fibers within 4.0 × 10⁴ μm², N=3

Growth rate calculated as [(final weight - initial weight)/initial weight] × 100

^{ns}No significance, different letters are significantly difference (*p* < 0.05, **p* < 0.1)

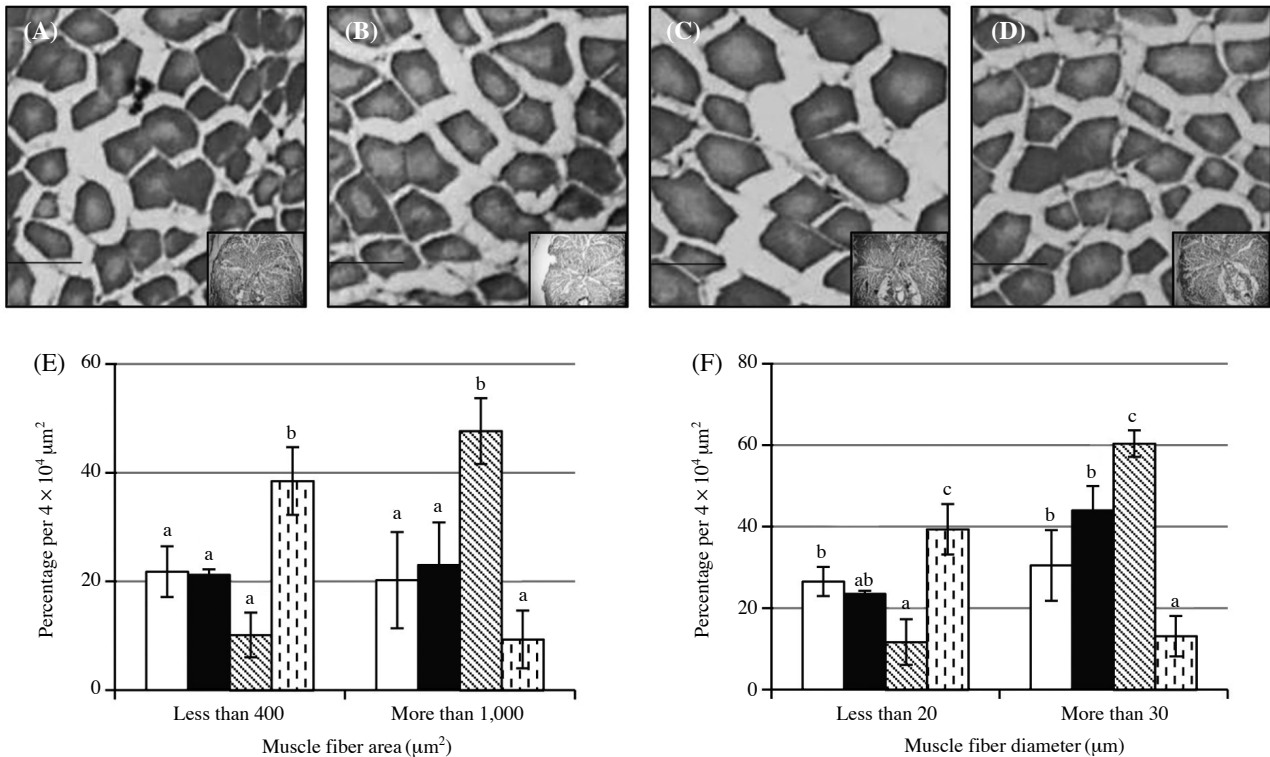


Fig. 5. Histology analysis of muscle fiber in zebrafish fed with CA. (A~D) histology image of muscle fiber, (E) muscle fiber distribution by average area, (F) muscle fiber distribution by diameter. Normal feed group (A, white bar), ethanol treated with feed group (B, black bar), 1% CA treated with feed group (C, diagonal bar), 5% CA treated with feed group (D, dotted bar), scale bar is 50 μm, different letters are significantly difference (*p* < 0.1).

산화 촉진 및 지방 축적 억제 (Frankel *et al.*, 1996; Steiner *et al.*, 2001; Taka-hashii *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012)와 같은 효과를 볼 때 근섬유에 미치는 CA의 효과는 새로운 발견이라 할 수 있겠다.

In vivo 수준에서 볼 때 근육 발달에 있어서 포유류의 경우 근섬유의 과형성이 일어나고 성장기간 동안에 근섬유의 과비대만 일어나는 반면 어류의 경우 발생 초기뿐만 아니라

성장단계에서도 동시 다발적으로 근섬유의 과형성과 과비대가 일어난다 (Kiessling *et al.*, 2006; Rescan, 2008). 또한 어류의 경우 지름 20 μm 이하의 근섬유의 경우 과형성 메커니즘에 의해 새롭게 형성된 근섬유로 판단한다 (Kiessling *et al.*, 2006; Rescan, 2008). 이러한 점으로 미루어 보아 10 μM/kg의 CA를 근육 내 주사 그룹과 1% CA가 포함된 사료를 급식한 제브라피쉬의 경우 근섬유의 과형성이 일어났으며 5%

CA가 포함된 사료를 급식한 그룹의 20 μm 이하의 근섬유의 분포가 대조구에 비해 약 48% 증가한 것으로 미루어 보아 CA가 제브라피쉬 근섬유의 과형성 및 과비대에 영향을 미쳤다고 생각된다. 따라서 본 연구의 자료를 토대로 근육 성장과 관련된 유전자 및 단백질 분석, 더 나아가 포유류를 이용한 동물실험을 통해 CA가 근 섬유에 미치는 메커니즘에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

로즈마리의 주요 성분인 carnosic acid는 carnosol, rosmarinic acid, ursolic acid 등과 같은 폴리페놀의 한 성분으로 다양한 생리활성 기능이 보고되어 있다. 본 연구에서는 로즈마리 유래 폴리페놀인 carnosic acid가 제브라피쉬 근육 성장에 미치는 영향을 근육 내 주사와 사료를 통해서 확인해 보았다. 근육 내 주사 실험을 통해서 CA는 제브라 피쉬의 근육 내 단백질 함량을 증가시키고 중성지방의 함량을 감소시켰다. 또한 조직학적 분석 결과 근섬유의 평균 면적이 커지는 근섬유의 과비대 효과를 나타내었다. 사료 실험 결과 근육 내 단백질 및 중성지방의 함량에는 영향을 미치지 않았으며 조직학적 분석 결과 근육 내 주사 실험에서와 마찬가지로 근 섬유의 과비대를 유도하였다.

사 사

본 논문은 2012년도 강릉원주대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 수행되었습니다.

인 용 문 헌

- Amali, A.A., C.J. Lin, Y.H. Chen, W.L. Wang, H.Y. Gong, C.Y. Lee, Y.L. Ko, J.K. Lu, G.M. Her, T.T. Chen and J.L. Wu. 2004. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Developmental Dynamics*, 229: 847-856.
- Benzie, I.F. and S. Wachtel-Galor. 2011. Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspects. CRC Press.
- Biga, P.R. and F.W. Goetz. 2006. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: Determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291: R1327-R1337.
- Bonaldo, P. and M. Sandri. 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms*, 6: 25-39.
- Braun, T. and M. Gautel. 2011. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12: 349-361.
- Frankel, E.N., S.W. Huang, A. Aeschbach and E. Prior. 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agricultural and Food Chemistry*, 44: 131-135.
- Fries, R., R. Hanset and M. Georges. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Genet.*, 17: 71.
- Fuentes, E.N., K. Pino, C. Navarro, I. Delgado, J.A. Valdés and A. Molina. 2013. Transient inactivation of myostatin induces muscle hypertrophy and overcompensatory growth in zebrafish via inactivation of the SMAD signaling pathway. *J. Biotechnol.*, 168: 295-302.
- Harvey, A.L. 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13: 894-901.
- Kambadur, R., M. Sharma, T.P. Smith and J.J. Bass. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling belgian blue and piedmontese cattle. *Genome Res.*, 7: 910-915.
- Kiessling, A., K. Ruohonen, M. Bjørnevik. 2006. Muscle fibre growth and quality in fish. *Arch Tierz Dummerstorf*, 49: 137-146.
- Kim, J.H., S.B. Lee, M.J. Cho, J.Y. Ahn, S.K. Lee, S.Y. Hong, K.B. Seong and H.J. Jin. 2011. Growth effect of oncorhynchus masou by recombinant myostatin prodomain proteins derived from fish. *J. Life Science*, 21: 1149-1155.
- Kunkel, S.D., C.J. Elmore, K.S. Bongers, S.M. Ebert, D.K. Fox, M.C. Dyle, S.A. Bullard and C.M. Adams. 2012. Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. *PLoS One*, 7: e39332.
- Kunkel, S.D., M. Suneja, S.M. Ebert, K.S. Bongers, D.K. Fox, S.E. Malmberg, F. Alipour, R.K. Shields. and C.M. Adams. 2011. mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. *Cell Metabolism*, 13: 627-638.
- Lee, E.J., A.R. Bhat, M.R. Kamli, S. Pokharel, T. Chun, Y.H. Lee, Y.H. Nahm, J.H. Nam, S.K. Hong, B. Yang, K.Y. Chung, S.H. Kim and I. Choi. 2013. Transthyretin is a key regulator of myoblast differentiation. *PLoS One*, 8: e63627.
- López-Jiménez, A., M. García-Caballero, M.Á. Medina and A.R. Quesada. 2013. Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur. J. Nutr.*, 52: 85-95.
- McPherron, A.C. and S. Lee. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 12457-12461.
- Michael, S., P. Irene, G. Judith, L. Joseph, S. Yoav and D. Michael. 2001. Carnosic acid inhibits proliferation and augments dif-

- ferentiation of human leukemic cells induced by 1,25-Dihydroxyvitamin Dsub3 and Retinoic acid. *Nutrition and Cancer*, 41: 135-144.
- Østbye, T.K., O.F. Wetten, A. Tooming-Klunderud, K.S. Jakobsen, A. Yafe, S. Etzioni, T. Moen and Ø. Andersen. 2007. Myostatin (MSTN) gene duplications in atlantic salmon: Evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and-2. *Gene*, 403: 159-169.
- Relaix, F., D. Rocancourt, A. Mansouri and M. Buckingham. 2005. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*, 435: 948-953.
- Rescan, P. 2008. New insights into skeletal muscle development and growth in teleost fishes. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution.*, 310: 541-548.
- Seth, A., D.L. Stemple and I. Barroso. 2013. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Disease Models & Mechanisms*, 6: 1080-1088.
- Thomas, M., B. Langley, C. Berry, M. Sharma, S. Kirk, J. Bass and R. Kambadur. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.*, 275: 40235-40243.
- Toshiyuki, T., T. Takahito, T. Yosei, K. Kunit, T. Yasunhiro and S. Takumi. 2009. Carnosic acid and carnosol inhibit adipocyte differentiation in mouse 3T3-L1 cells through induction of phase2 enzymes and activation of glutathione metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382: 549-554.
- Wang, T., Y. Takikawa, T. Tabuchi, T. Satoh, K. Kosaka and K. Suzuki. 2012. Carnosic acid (CA) prevents lipid accumulation in hepatocytes through the EGFR/MAPK pathway. *J. Gastroenterology*, 47: 805-813.
- Xu, C., G. Wu, Y. Zohar and S. Du. 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J. Exp. Biol.*, 206: 4067-4079.
- Yesil-Celiktas, O., C. Sevimli, E. Bedir and F. Vardar-Sukan. 2010. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65: 158-163.
- Zon, L.I. and R.T. Peterson 2005. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature Review*, 4: 35-44.