

Germinated *Rhynchosia nulubilis* Hydrolysate Ameliorates Dexamethasone-induced Muscle Atrophy by Downregulating MAFbx Expression in C2C12 Cells and C57BL/6 Mice

Won Keong Lee¹, Eun Ji Kim¹, Sang Gon Kim², Young Min Goo², Young Sook Kil², Seung Mi Sin², Min Ju Ahn², Min Cheol Kang³ and Young-Sool Hah^{1*}

¹Biomedical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University College of Medicine, Jinju 52727, Korea

²Anti-Aging Research Group, Gyeongnam Oriental Anti-Aging Institute, Sancheong 52215, Korea

³Jayeonae BioLab, Sancheong 52215, Korea

Received February 1, 2023 / Revised February 13, 2023 / Accepted February 15, 2023

Sarcopenia is the age-related loss of muscle mass and function. It is a natural part of aging and can lead to decreased mobility and increased frailty. The ubiquitin-proteasome pathway, which is involved in muscle protein degradation, is closely linked to sarcopenia. Germinated *Rhynchosia nulubilis* hydrolysate (GRH) has been reported to have anti-inflammatory and antioxidant properties, but there have been no reports on its inhibitory effect on muscle reduction. However, no study has yet explored the relationship between GRH and muscle loss inhibition. In this study, we evaluated the effects of GRH on muscle atrophy inhibitory activity in dexamethasone (Dexa)-induced muscle atrophy C2C12 myotubes and mouse models. Moreover, we identified a molecular pathway underlying the effects of GRH on skeletal muscle. May Grunwald-Giemsa staining showed that the length and area of myotubes increased in the groups treated with GRH. In addition, the GRH-treated group significantly reduced the expression of muscle ring finger protein 1 and muscular atrophy F-box (MAFbx) in the Dexa-induced muscular atrophy C2C12 model. GRH also improved muscle strength in C57BL/6 mice with Dexa-induced muscle atrophy, resulting in prolonged running exhaustive time and increased grip strength. We found that muscle strengthening by GRH was correlated with a decreased expression of the MAFbx gene in mouse muscle tissue. In conclusion, GRH can attenuate Dexa-induced muscle atrophy by inhibiting the ubiquitin-proteasome pathway via downregulation of the MAFbx gene expression.

Key words : Dexamethasone, muscle atrophy, muscle atrophy F-box (MAFbx), *Rhynchosia Nulubilis*, sarcopenia

서 론

근육량은 나이가 들면서 점차 감소하기 시작한다. 특히 근육량은 20~30세부터는 매년 1~2%씩, 60세 이후에는 2~3%씩 감소해 나이가 들수록 근육량 감소가 심화된다[28]. 노화로 인한 근육량의 감소는 근력, 보행속도, 균형 감각의 약화로 신체활동 수행능력이 저하되어 근감소증(sarcopenia), 허약(frailty) 등의 노인성 질환으로 이어진다

[31]. 근감소증은 노화에 따라 근섬유가 지방으로 대체되어 근골격계 근육의 크기와 질량이 감소하여 근력이 감소하는 것이 특징이다. 동반 증상에는 노화 상관관계가 있는 신체 기능 저하로 인한 질병이 포함된다[25]. 근감소증의 병인 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만, 미토콘드리아 기능 장애, 인슐린 저항성, 만성 염증, 산화 스트레스 증가, 신경근 손상, 지방 조직 침윤 등이 근 감소의 주요 원인으로 보고되었다[10, 13, 16, 17, 22, 23]. 또한 많은 임상적 양상과 만성질환, 그리고 노화는 근육량의 감소를 유발하며, 이 때 두 가지 중요한 E3 유비퀴틴 접합 효소(E3 ubiquitin ligase)인 muscle RING finger 1 (MuRF1) 과 muscle atrophy F-box (MAFbx)는 활성화되어 근 감소를 유발한다[4, 5]. 따라서 이들 효소의 활성을 억제하여 근 감소를 억제 시킬 수 있다[8].

나이가 들면서 근육량이 줄어든다는 것은 단백질 합성이 줄어들었거나, 단백질 분해가 증가되었거나, 혹은 두

*Corresponding author

Tel : +82-55-750-9266, Fax : +82-55-750-9277

E-mail : yshah@gnu.ac.kr

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.

가지 모두를 의미한다[6, 18]. 노화와 동반된 단백질 동화 호르몬의 변화, 염증이나 질병에서 기인한 이화 작용 자극, 저조한 신체활동이나 불충분한 단백질 섭취와 같은 영양 요인을 포함한 많은 대사 요인들이 이런 불균형의 원인이 될 수 있다[6, 26]. 근감소증의 원인은 개인마다 다르지만, 신체의 호르몬과 영양 요인은 근육 단백질 합성과 분해를 조절할 수 있다[11]. 근육 단백질 합성은 주로 기계적 자극과 아미노산 섭취에 의해 영향을 받는다[9]. 특히 필수 아미노산의 섭취 및 흡수가 부족하여 근감소증이 나타나는 비율이 매우 높으며, 필수 아미노산은 신호 분자로 작용하여 근육 단백질 합성을 촉진한다[24]. 류신, 이소류신 및 발린으로 구성된 분지 사슬 아미노산(branch chain amino acid, BCAA)은 근육 단백질을 구성하는 필수 아미노산의 1/3 이상을 차지하며 근육 단백질 합성의 전구체이자 세포내 신호전달경로의 조절자 역할을 수행한다[3]. 그 중 류신은 단백질 대사에 중요한 역할을 한다[2]. 쥐 모델에서 BCAA 경구 투여는 단백질 합성을 증가시키고[1], MuRF1 및 MAFbx 단백질 발현을 억제하여 노화 관련 근 위축을 예방한다[15, 21].

발아 서목태는 항염증 및 항산화 특성이 있는 것으로 밝혀진 전통적인 약용 식물이다. 그러나 근감소 억제 효능에 대하여는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 발아 서목태 가수분해물(Germinated *Rhynchosia Nulubilis* Hydrolysate, GRH)을 BCAA의 공급원으로 선정하여 GRH의 근위축 억제 효과를 조사하였다. 근위축 억제 효과를 평가하기 위하여 덱사메타손(dexamethasone, Dexa)으로 유도된 근위축 세포 모델에서 근위축 억제 효과를 조사하였다. 또한, 덱사메타손으로 유도된 근위축 마우스 모델에서 근위축에 대한 GRH의 억제 효과를 평가하고, 그 기전을 연구함으로써 근위축의 예방 및 치료 후보제로서의 이용 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

Germinated *Rhynchosia Nulubilis* Hydrolysate (GRH) 제조

동광중합물산(Seoul, Korea)에서 구입한 서목태를 약 4 시간가량 물에 불린 후 불량한 검체를 제거한 뒤 공기가 통하도록 체반에 넣어 차광하고 온도는 25°C, 습도는 40~60%의 환경에서 약 4-5시간 간격으로 수분을 공급해주면서 48시간 동안 발아하였다. 발아가 끝난 서목태는 드라이아이스와 함께 분쇄하여 100°C에서 30분간 살균한 뒤 시료 중량의 2배수의 멸균수에 잘 섞어준 후 발아 서목태 중량의 0.2% (v/w)가 되도록 단백질 가수분해 효소 Food Pro Alkaline Protease (Genencor Int. Bvba, Belgium)와 Promod 279 MDP (Biocatalysts Ltd., Wales, UK)를 처리하여 50°C에서 5시간 동안 반응시킨 후 90°C에서 1시간 처리하

여 효소의 활성을 종료 시켰다. 이후 40~45°C의 저온에서 건조한 시료는 중량의 5배수에 해당하는 50% 에탄올에서 1시간 동안 초음파 추출하여 여과 후 진공회전증발농축기(EYELA, JAPAN)를 이용하여 분말화 하여 세포 및 동물실험 시료로 이용하였다.

아미노산 분석

발아 서목태의 아미노산 함량 분석을 위하여 Plant Total Protein Extraction Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 단백질을 분리하였다. 발아 서목태 분말시료 약 0.2 g을 정확히 취하여 1.5 ml 튜브에 넣고 용해액 100 µl를 첨가하여 과쇄봉으로 분쇄하였다. Protein Extraction Filter Cartridge (ThermoFisher Scientific)를 이용하여 ice에 5분 방치한 후 16,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 0.2 µm 여과 필터로 여과하였다. 샘플 간 총 단백질량을 맞추기 위해 BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 아미노산 분석은 Waters UPLC-Class Amino Acid Analysis Application Kit (Waters Corporation, Milford, MA, USA)를 사용하여 발아공의 구성 아미노산을 유도체화 시켜 분석하였다. 즉, 여과된 유리 아미노산 시료 10 µl를 시험관 밑바닥에 취하고 여기에 AccQ-Fluor Reagent Kit (Waters Corporation)의 1 용액 70 µl를 넣어 혼합하였다. 여기에 미리 55°C에서 반응시킨 2A 용액 20 µl를 넣어 재혼합하였고, 이를 실온에서 1분간 방치한 후 55°C에서 10분간 유도체화 시킨 다음 UPLC로 유리아미노산을 측정하였다. 분석에 사용한 아미노산 표준물질은 Amino Acid Standard H (Thermo Fisher Scientific)이고, 칼럼은 AccQ Tag Ultra column (2.1×100 mm, 1.7 µm, Waters Corporation), 검출기는 Acquity UPLC PDA (260 nm, Waters Corporation)이고 분석온도는 43°C이었다.

세포 배양 및 덱사메타손-유도 근위축 세포 모델

마우스 C2C12 근아세포(myoblast)는 American Type Culture Collection (CRL-1772; Bethesda, MD, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA), 1% (v/v) penicillin-streptomycin (Gibco)을 첨가한 DMEM 배지(Gibco)로 37°C, 5% CO₂가 유지되는 조건하에서 배양하였다. 배양된 세포는 3~4일 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 덱사메타손으로 유도된 근위축 C2C12 세포를 만들기 위해 다음과 같이 처리하였다. 세포가 80% 찼을 때 성장 배지를 분화 배지(2% horse serum을 함유한 DMEM)로 교체하였다. 분화배지는 매 2일마다 교체하였으며 6일간 근관세포(myocyte)로 분화를 유도하였다. 이후 1 µM 덱사메타손 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)을 48시간 동안 처리하여 근위축을 유도하였다.

세포독성 시험

GRH 처리에 따른 C2C12 근아세포의 세포생존율을 측정하기 위하여 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo, Kumamoto, Japan)을 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 24-well plate에 세포 농도 5×10^4 cells/well로 분주한 다음 세포 부착을 위해 24시간 배양한 후 GRH를 적정 농도로 처리하였다. 일정 시간 경과 후 CCK-8 반응액을 첨가하여 1시간 반응시킨 후 microplate reader (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450 nm 흡광도를 측정하고 세포생존율을 계산하였다.

May Grunwald-Giemsa 염색

텍사메타손을 처리한 근위축 유발 세포에서 세포핵과 근섬유 구조를 명확히 보여주기 위해 May Grunwald와 Giemsa 염색을 시행하였다. 분화된 근관 세포를 PBS로 세척하고 100% 메탄올로 고정한 후 인산나트륨 완충액(1 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 mM Na_2HPO_4 , pH 6.0)에 1:3 비율로 희석한 May-Grunwald 염색액을 첨가하여 5분간 염색하고 염색된 세포를 증류수로 수세하고 증류수에 1:10의 비율로 희석한 Giemsa 염색액을 첨가하여 10분간 염색하였다. 염색된 세포는 임의로 4개의 구획을 나누어 카메라가 장착된 현미경으로 이미지를 얻었다(Eclipse 80i; Nikon, Tokyo, Japan). NIS Elements software (NIS-Elements Advanced Research, Melville, NY, USA)를 사용하여 각 구획의 세포를 무작위로 선택하여 근관의 폭을 측정하였다.

RNA 분리 및 quantitative real-time PCR (qPCR)

근위축 조건에서 준비된 세포와 마우스 조직의 total RNA는 TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 분리하고 정량한 다음, 동일한 양의 total RNA는 first-strand cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA로 전환되었다. 합성된 cDNA로부터 MAFbx (Mm00499523_m1; Applied Biosystems Inc., Framingham, MA, USA)와 MuRF1 (Mm01185221_m1; Applied Biosystem Inc.) 유전자의 발현을 확인하기 위해 각 유전자 특이적인 primer와 probe를 Applied Biosystems에서 구입하였다. TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem Inc.) 및 ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystem Inc.)을 사용하여 qPCR을 수행하였다. PCR은 95°C에서 10분 동안 초기 변성을 한 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초, 40 cycles 조건으로 qPCR을 수행하였다. housekeeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Mm99999915; Applied Biosystem Inc.) mRNA 발현량으로 표준화 하였다.

웨스턴 블롯

근위축 조절 관련 유전자들의 발현을 단백질 수준에서

비교하기 위하여 준비된 세포와 마우스 근육 조직을 차가운 PBS 완충액으로 2회 수세 후, RIPA 완충액(10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)을 넣고 시료를 용해시켰다. 다시 초음파 분쇄기를 이용하여 균질화 하였다. 균질액은 4°C에서 $13,000 \times g$ 으로 15분간 원심분리 한 후 상층액만 취한 단백질은 BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질은 4× laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 혼합하여 끓인 다음, 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮기고 나서 5% skim milk (Difco, Detroit, MI, USA)가 첨가된 Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20 (TBST) 완충액으로 1시간 실온에서 blocking 하였다. MAFbx (sc-166806; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), MuRF1 (sc-398608; Santa Cruz Biotechnology)과 β -actin (A5441; Sigma, St Louis, MO, USA)에 대한 1차 항체를 5% skim milk가 포함된 TBST에 희석하여 4°C에서 밤새 반응시켰다. TBST로 3회 세척 후, horseradish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 2차 항체와 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 다시 TBST 완충액으로 10분간 3회 세척한 후 Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad)로 1분간 반응시킨 뒤 ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad)을 사용하여 관찰하고 이미지를 획득하였다.

텍사메타손-유도 근위축 마우스 모델

동물실험을 수행하기 위하여 경상국립대학교 동물실험윤리위원회에서 승인(GNU-220519-M0047)을 받았으며, 규정에 따라 동물실험에 관한 윤리 과정을 준수하여 연구를 진행 하였다. 실험동물은 (주)코아텍(Seoul, Korea)에서 구입한 6주령 수컷 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 실험 동물은 온도 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 40~60%, 조도 150~300 lux, 12시간 간격의 명암 주기 환경에서 1주일 간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 적응 기간 동안 일반식을 공급 하였으며 식수로 멸균수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험동물 적응 기간 후 마우스는 정상군(Control), 대조군(텍사메타손 처리군, Dexa), 실험군(텍사메타손+발아콩가 수분해물 처리군, Dexa+GRH) 세 그룹으로 나누었다. 근위축 유도를 위해 매일 오전 10~11시 사이에 텍사메타손 10 mg/kg을 3주간 매일 복강에 투여 하였다. GRH 투여군은 텍사메타손 투여 1주일 전부터 실험 종료일까지 500 mg/kg의 복용량으로 매일 1회 경구 투여하였다. 같은 기간 동안 정상군과 대조군에는 생리식염수를 경구 투여하였다. 체중은 텍사메타손 투여 전과 투여 후 7일, 14일, 21일에 측정하였다.

조직학 분석

각 대조군과 실험군은 실험이 종료되는 날 안락사 시킨 후 전경골근(tibialis anterior muscle)과 비복근(gastrocnemius muscle)을 적출하여 우측 전경골근과 비복근은 동결절편용 포매제인 OCT compound (Lab-Tek; Miles Laboratories, Inc., Naperville, IL, USA)에 포매한 후 즉시 동결시켰다. 냉동절편기(Leica CM 1950; Heidelberg, Germany)를 이용하여 5 μm 두께로 절편한 동결절편 슬라이드 표본을 제작하고, Alexa Fluor488 형광이 붙어있는 Wheat germ agglutinin (W11261; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) 항체를 1:500의 농도로 희석하고 4°C에서 밤새 염색하고 형광현미경(Nikon Eclipse NI DSRi2; Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 표본을 관찰하고 이미지를 얻었다. 섬유 단면적(cross-sectional area, CSA)은 MyoVision v1.0.0으로 측정하였다[27].

지구력 측정

지구력 측정은 이전 논문의 방법을 참조하여 다음과 같이 실시하였다[12]. 마우스 러닝 테스트는 트레드밀(Panlab, Barcelona, Spain)을 이용하여 속도, 지속 시간, 거리를 측정하고, 소프트웨어(SeDaCom v2.0.02; Panlab, Barcelona, Spain)를 사용하여 조절하였다. 이 테스트에서 적응 보행 속도는 10 cm/sec로 3분 동안 달리도록 설정하였고, 75 cm/sec의 최대 속도에 도달하기까지 4분마다 4 cm/sec로 증속하여 지칠 때까지 달리게 하였다. 적응 보행 속도와 달리기 속도는 모든 군에 대해 동일하게 적용하였고, 트레드밀의 각 레일 뒤에서 전기 자극(1.1 mA)을 주어 강제로 달리게 하였다. 지칠 때까지 걸리는 시간(time to exhaustion)을 비교하여 각 개체의 운동능력을 평가하였다. 지침(exhaustion)이 발생한 시점은 앞다리가 레일에 놓이고 뒷다리는 3초 동안 전기 장치에 놓여있는 시간으로 정의하였다.

악력 측정

모든 실험동물은 실험 종료 전 날 악력을 측정하였다. 악력 측정은 이전 논문을 참조하여 실시하였다[7]. 악력은 Bioseb Grip Strength Test (BIO-GS3; BIOScience and Experimental Biology, Florida, USA)를 이용하여 그램 단위로 측정하였다. 스테인리스 스틸 T-bar를 게이지에 부착하여 사용하였다. 실험동물의 양측 전지로 실험 도구의 T-bar를 잡게 하고, 그림이 해체될 때까지 꼬리를 일정한 속도(2 cm/초)로 잡아당겨 악력 세기를 측정하였다. 각 동물에 대한 5개의 측정값을 얻은 후 평균값을 계산하였다.

통계분석

GraphPad Prism (버전 5.01; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 통계 분석에 사용하였다. 세포 실험

데이터는 평균±표준편차로 표시하였고 동물 실험 데이터는 평균±표준에러로 표시하였다. 그룹 간 차이를 분석하기 위해 one-way ANOVA를 통해 통계적 유의성을 5% 수준에서 분석하였고, 사후검정으로 Mann-Whitney test를 수행하였다.

결과 및 고찰

GRH의 총 아미노산 분석

서목태의 발아와 효소 처리에 따른 아미노산 조성의 변화는 자동 아미노산 분석기를 사용하여 분석하였다. 발아하지 않은 일반 서목태의 총 아미노산 함량은 단백질 20 μg 기준으로 할 때 235 pmol로 발아 후 효소처리까지 끝낸 시료는 1,032 pmol로 4배 이상 증가하였으며 특히 근감소증과 관련하여 주요 역할을 하는 BCAA (이소류신, 류신, 발린)의 경우 무처리군 2.8 pmol에 비해 295 pmol로 100배 이상 함량이 증가하였다(Table 1). 이전 연구에서 근위축 유발 C2C12 세포에서 BCAA 처리는 MuRF-1 및 Atrogin-1의 발현을 감소시켰다[15]. 또한, BCAA 투여는 텍사메타손 유도 근위축 마우스 모델의 가자미근에서 텍사메타손 유도 MAFbx의 발현을 감소시켰다[30]. BCAA는 골격근에서 단백질 합성에 필수적이며, BCAA 중에서 류신은 골격근에서 단백질 합성을 자극하는데 특히 중요하다[1]. 따라서 GRH에 풍부한 BCAA가 근위축을 억제하는 활성 성분으로 작용할 수 있을 것이다.

GRH가 텍사메타손으로 유도된 C2C12 근관세포의 근위축에 미치는 영향

GRH의 근위축 억제 효능을 연구하기 위해, 먼저 GRH의 적정 농도 범위를 알아보고자 C2C12 근아세포에 GRH를 농도별로 처리하여 세포 생존율을 측정하였다. GRH를 50-500 $\mu\text{g/ml}$ 범위의 다양한 농도로 24시간 동안 처리하였을 때, C2C12 근아세포의 생존율에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 1A, Fig. 1B). 이후의 실험에서는 GRH를 최대 500 $\mu\text{g/ml}$ 까지 사용하여 연구를 진행하였다.

다음으로 텍사메타손(Dexa)으로 근위축이 유도된 C2C12 근관세포에서 GRH의 근위축 억제 효능을 평가하기 위해 GRH를 Dexa와 함께 48시간 동안 동시에 처리한 후, C2C12 근관세포를 May Grunwald와 Giemsa 염색을 수행하고 근관 직경의 변화를 측정하였다. Dexa 단독 처리군에 비해 Dexa와 GRH가 동시에 처리된 근관세포의 근관 직경은 유의하게 증가하였다(Fig. 1C, Fig. 1D). 이러한 결과는 GRH 처리가 텍사메타손에 의해 유도된 근위축을 억제함을 보여준다.

GRH가 근위축 관련 유전자 발현에 미치는 영향

GRH가 Dexa로 인한 근위축에 영향을 미치는지 알아보

Table 1. Composition of amino acids and branched-chain amino acid (BCAAs) in Germinated *Rhynchosia Volubilis* (GRH) Hydrolysate

Amino acids	Extraction conditions		
	Germination 0 day	Germination 2 day	Germination 2 day + enzymatic hydrolysis
Alanine	22.4±1.5	38.4±2.6	79.2±3.2
Arginine	155.3±12.7	148.7±18.9	26.3±2.4
Aspartic acid	6.3±0.5	20.5±1.4	14.0±0.9
Cysteine	0.3±0.0	0.6±0.2	23.5±4.1
Glutamic acid	17.1±1.9	37.7±11.5	102.0±8.9
Glycine	4.9±0.1	15.7±3.9	40.3±2.8
Histidine	10.6±0.2	16.8±0.6	61.0±4.1
Isoleucine	0.9±0.1	5.5±0.4	60.9±2.7
Leucine	0.3±0.0	6.7±0.5	140.3±6.0
Lysine	2.3±0.0	8.7±0.5	5.3±1.6
Methionine	0.9±0.0	2.5±0.0	55.7±3.9
Phenylalanine	1.6±0.1	6.5±0.1	142.0±7.8
Proline	1.3±0.0	7.5±0.8	20.9±1.2
Serine	6.5±0.4	20.5±0.0	73.7±4.9
Threonine	1.6±0.0	10.1±0.8	21.1±3.6
Tyrosine	1.8±0.0	6.1±0.6	71.6±2.7
Valine	1.6±0.0	9.5±1.0	94.4±5.7
Total amino acids	235.6±5.6	362.2±27.9	1032.0±30.1
Total BCAAs	2.8±0.1	21.7±1.9	295.6±14.4

Total BCAAs is the sum of isoleucine, leucine, and valine. Data are represented as mean ± standard deviation (n=3). pmol/20 mg extracted weight of GRH.

기 위해 C2C12 근관세포에 GRH와 Dexa를 48시간 동안 동시에 처리한 후, 근위축의 바이오마커인 MAFbx와 MuRF1의 mRNA 수준을 분석하였다. GRH에 의한 MAFbx와 MuRF1의 mRNA 발현 변화를 qPCR을 수행하여 텍사메타손 유도 근위축 세포에서 측정하였다. MAFbx와 MuRF1의 mRNA 발현은 정상군에 비해 Dexa군(Dexa만 처리된 C2C12 근관세포)에서 유의하게 증가하였다. 반대로 GRH와 Dexa가 동시에 처리된 C2C12 근관세포에서 MAFbx와 MuRF1의 mRNA 발현이 Dexa 단독 처리된 근관세포보다 유의하게 감소하였다(Fig. 2A). MAFbx mRNA의 경우 GRH 농도 의존적으로 발현이 감소됨을 확인하였다(Fig. 2A, left panel).

다음으로 동일한 조건으로 약물을 처리한 근관세포에서 MAFbx와 MuRF1의 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 측정하였다. MAFbx와 MuRF1의 단백질 발현은 Dexa를 처리한 근관세포에서 각각 2.3배($p<0.01$), 1.7배 증가되었으나 MuRF1의 경우 유의성을 보이지 않았다. 한편 GRH를 Dexa와 동시에 처리한 근관세포에서는 MAFbx ($p<0.05$)의 발현이 유의하게 감소하였다(Fig 2B). 그러나 MuRF1은 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다(Fig 2B). 이러한 결과는 GRH가 Dexa 유도 근위축 근관세포 모델에서 근위축에 관여하는 유전자 및 단백질의 발현

을 유의하게 감소시킨다는 것을 시사한다. 이러한 현상은 근위축을 억제하기 위해 유비퀴틴-프로테아좀 경로의 차단이 중요한 역할을 할 것이라 사료된다.

GRH가 텍사메타손으로 유도된 마우스 근위축에 미치는 영향

근위축을 특징으로 하는 많은 병리학적 상태(폐혈증, 악액질, 기아, 대사성 산증, 및 심각한 인슐린 감소증 등)는 혈액 내 글루코코르티코이드 수준의 증가와 관련이 있으며 이러한 호르몬은 근위축을 유발한다[19]. 텍사메타손에 의해 유도된 근위축 모델은 고정, 신경차단, 및 불용성 근위축 모델과 다르게 이형 근섬유를 감소시키는 사람의 근감소증(sarcopenia)과 유사한 속근(fast-twitch muscle fiber)에서 지근(slow-twitch muscle fiber)으로의 근섬유 전이를 유발하는 것으로 알려져 있다[27]. 본 연구에서는 이를 토대로 행해진 선행 연구를 참조하여 텍사메타손 유도 근위축 마우스 모델을 만들어 GRH의 근위축 억제 효능을 조사하였다[20]. 적응 기간 동안 그룹 간의 체중에는 큰 차이가 없었다(Fig. 3A). Dexa를 3주간 투여 후 비교하였을 때, Dexa 군은 정상군에 비해 유의한 차이로 체중이 적게 나타났다(Fig. 3A). Dexa+GRH 군의 체중이 일부 회복되는 경향을 보였으나 Dexa 군에 대하여 유의한 감소를

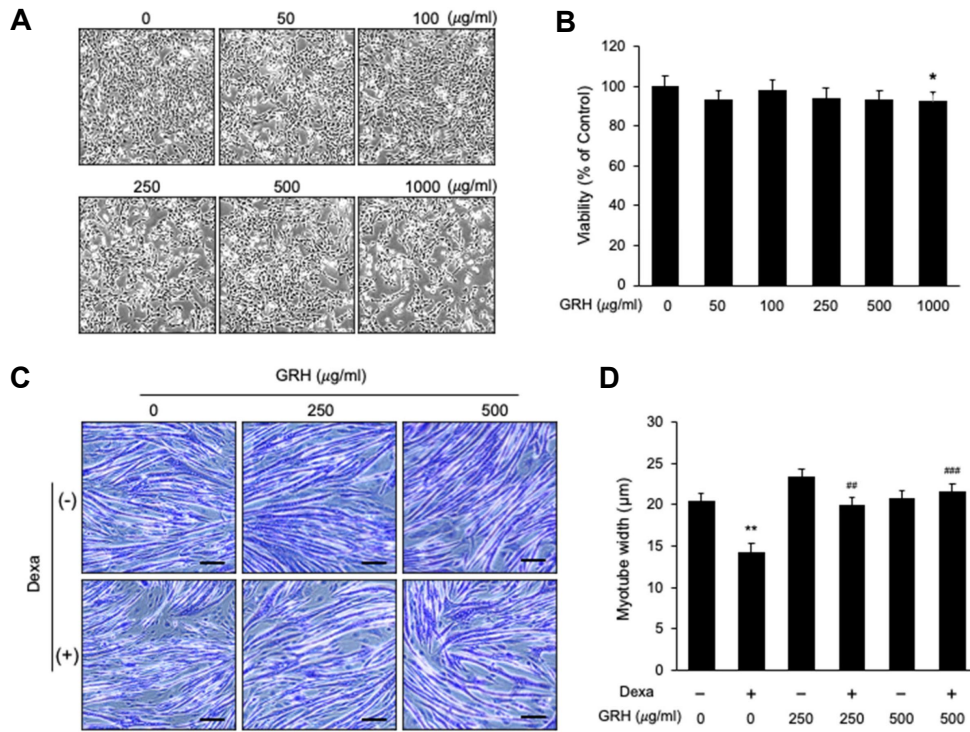


Fig. 1. GRH attenuates Dexamethasone-induced muscle atrophy in C2C12 myotubes. (A, B) C2C12 cells were cultured in a medium with various concentrations (50, 100, 250, 500, and 1,000 µg/ml) of GRH for 24 hr. Cell viability was measured by a CCK-8 assay. The viability of the control (untreated cells) was set to 100%. Viability as a percentage of that of control cells is shown. Bars represent the mean ± S.D. (n=4). **p*<0.05 vs. control. (C) May-Grunwald and Giemsa staining. The cells were incubated with 250 and 500 µg/ml GRH for 48 hr in the presence or absence of 1 µM dexamethasone (Dexa) for 48 hr. The scale bar represents 10 µm. (D) Quantification of myotube widths from May-Grunwald and Giemsa stained images. Data shown are mean ± S.D. (n=100). ***p*<0.01 vs. untreated control, ##*p*<0.01, ###*p*<0.001 vs. Dexa.

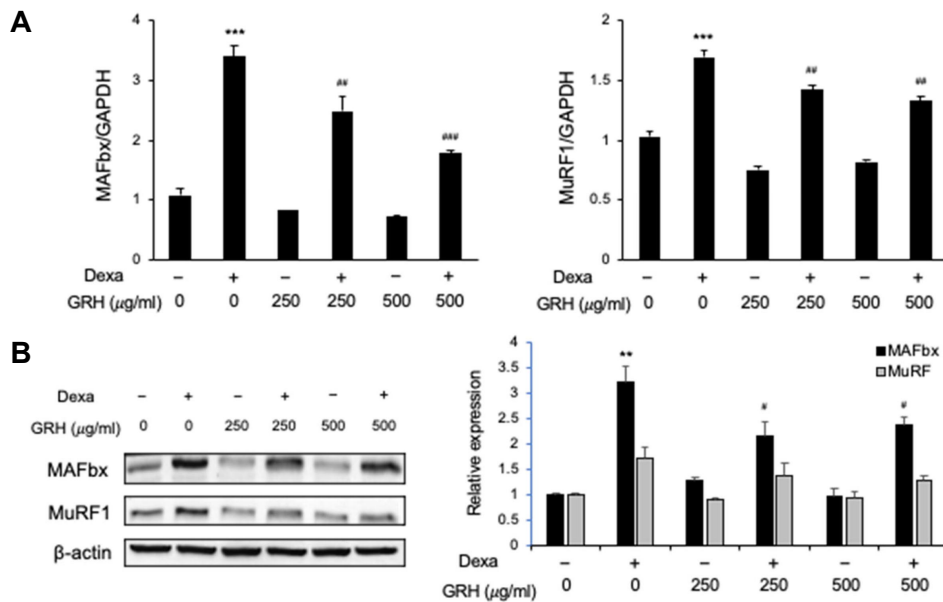


Fig. 2. GRH suppresses the expression of MAFbx and MuRF1. C2C12 myotubes were treated with GRH (250 and 500 µg/ml) in the presence or absence of 1 µM Dexa for 48 hr. (A) MAFbx and MuRF1 mRNA levels were analyzed by quantitative PCR. GAPDH was used as a control. Data are shown as mean ± S.D. (n=4). ****p*<0.001 vs. control, ##*p*<0.01, ###*p*<0.001 vs. Dexa. (B) The expression of MAFbx and MuRF1 protein in C2C12 myotubes was estimated by Western blot analysis. β-actin was used as a control for protein loading. Data are shown as mean ± S.D. (n=3). ***p*<0.01 vs. control, #*p*<0.05 vs. Dexa.

나타내지는 않았다. 다음으로, 뒷발 근육인 비복근과 전경골근을 절단하고 무게를 측정하였다. 결과적으로 Dexamethasone(Dexa) 처리군에서 이들 근육의 무게가 감소하였다(Fig. 3B). 그러나 Dexa + GRH 군에서는 Dexa 군에 비해 이들 근육의 무게가 유의하게 증가되었다(Fig. 3B). 일반적으로 근감소증은 근섬유 수 및 크기 감소와 관련된 근육량의 손실을 초래한다. 따라서 근섬유의 형태학적 변화에 대한 조직학적 특성을 평가하기 위해 근위축 마우스 모델의 비복근과 전경골근의 근섬유에 대한 면역형광염색을 시행하였다. 이들 근육 모두에서 근섬유 단면의 크기는 Dexa 군에서 감소하고 GRH를 경구 투여한 군에서 회복되었다(Fig. 3C). 비복근과 전경골근의 근섬유 단면 크기 정량화에서 Dexa 군의 총 근섬유 위축은 정상군에 비해 근섬유 두께가 감소하였다. GRH 투여군의 근섬유 두께는 Dexa 만을

투여한 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 3D). 다음으로 트레드밀과 악력 측정기를 사용하여 근위축 마우스 모델에서 근육의 기능을 평가하였다. 덱사메타손 유도 근위축 마우스 모델로 시행한 트레드밀 운동 시 지칠 때까지 걸리는 시간(time to exhaustion)을 비교한 실험에서, 정상군은 95.2±5.66분을 기록한 반면, Dexa 대조군은 73.2±2.19분, Dexa + GRH 군에서는 79.4±1.50분을 기록하여 Dexa 대조군과 유의한 차이를 보였다(Fig. 4A). 동일한 마우스로 시행한 악력 측정에서 정상군 116.4±2.19 g에 비해 Dexa 처리군 94.5±3.10 g으로 악력이 감소하였다(Fig. 4B). 반면에, GRH 투여군에서 악력이 108.7±1.85 g으로 Dexa 처리군과 비교하여 유의한 차이를 보여주어 덱사메타손에 의해 유도된 근위축 모델의 근 기능 감소가 GRH 복용에 의하여 회복되었음을 알 수 있었다(Fig. 4B).

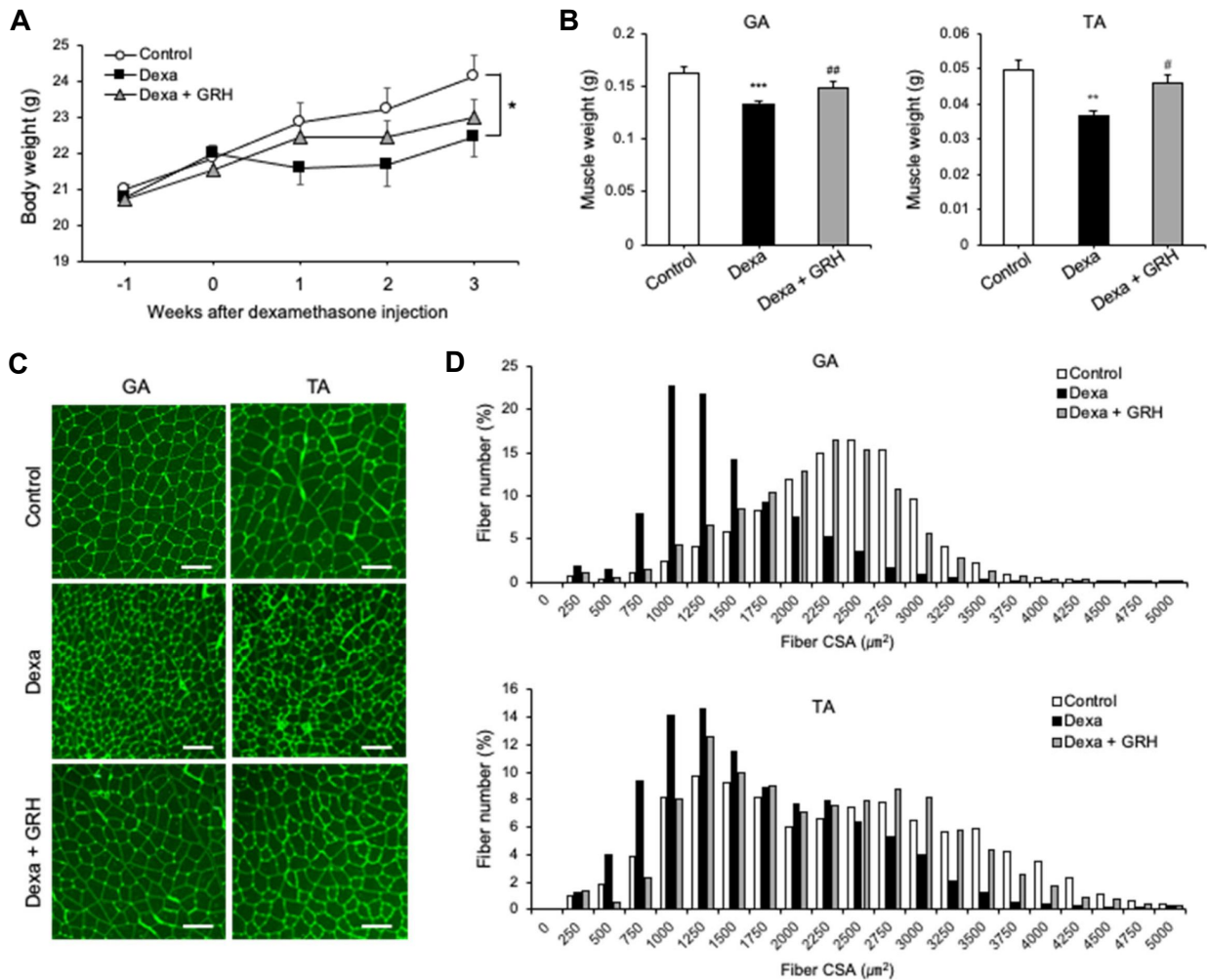


Fig. 3. GRH prevents Dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. (A) Body weight. (B) Muscle weight of GA and TA. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. Control. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Dexa. (C) Representative immunofluorescent staining of myofiber cross-section of GA and TA. A microscope with a 20× objective was used to capture the images. The scale bar represents 100 μm. (D) Quantification of myofiber size by cross-sectional area (CSA) measurements for GA and TA muscle. Data are shown as mean ± S.E. (n=9). GA, gastrocnemius muscles; TA, tibialis anterior.

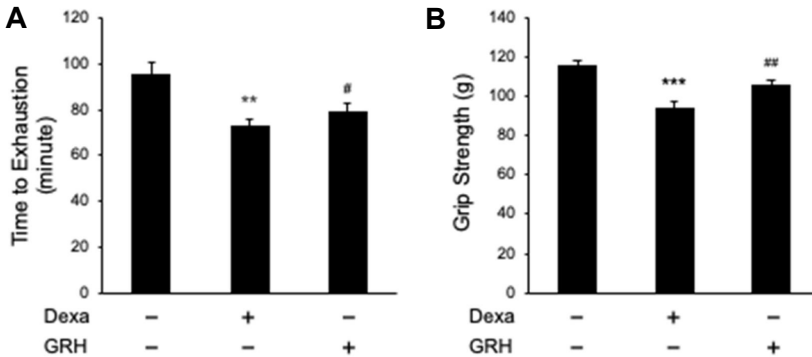


Fig. 4. GRH ameliorates Dexa-induced muscle dysfunction in mice. (A) Forced running time. (B) Grip strength. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the untreated control. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared to the Dexa treated control.

GRH가 덱사메타손으로 유도된 근위축 마우스에서 근위축 관련 유전자 발현에 미치는 영향

골격근의 모든 이화작용 경로는 MuRF1과 MAFbx의 상향 조절을 유도[14]하기 때문에 MuRF1과 MAFbx의 발현 변화를 평가하여 GRH가 Dexa 유도 근위축 마우스의 근육 감소에 미치는 효과를 조사하였다. 모델 마우스의 비복근과 전경골근에서 GRH 처리에 따른 MAFbx와 MuRF1 단백질 발현 변화를 확인하였다. 조사된 두 종류의 근육에서 MAFbx 단백질 발현은 Dexa 처리군에서 증가하고 Dexa + GRH 군에서 감소하였다. 하지만 MuRF1 단백질의 발현은 비복근에서 감소하였지만 전경골근에서는 변화가 없었다(Fig. 5).

본 연구의 결과는 GRH 가수분해물을 사용한 치료가 C2C12 세포와 C57BL/6 마우스 모두에서 덱사메타손으로

유발된 근위축을 상당히 약화시켰음을 보여주었다. 결론적으로, GRH가 *in vitro* 및 *in vivo* 근위축 모델 모두에서 MAFbx의 발현을 억제함으로써 Dexa에 의해 유발된 근위축을 보호하는 효능을 가진다는 것을 입증하였다. 향후 근감소증을 가진 환자를 대상으로 GRH의 안전성과 효능을 평가하기 위한 임상연구로 이어진다면 건강기능식품 및 건강보충제 등의 개발에 주요 소재로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부 2021~2022년도 지역주력산업육성 기술개발 사업(과제번호 S3085632)에 의해 이루어진 것입니다. 이에 감사드립니다.

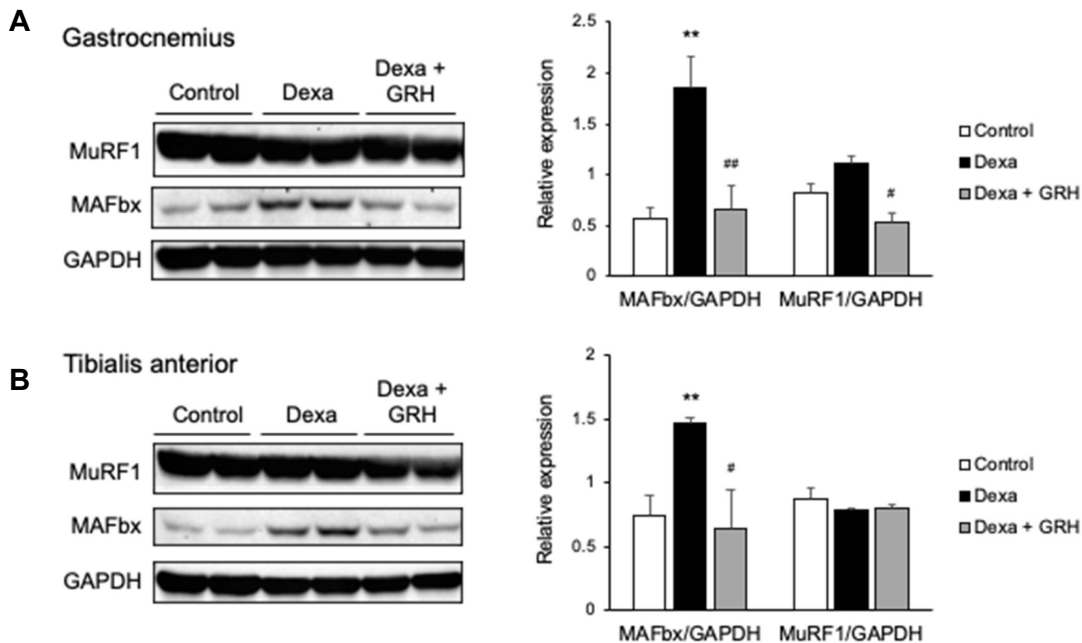


Fig. 5. GRH inhibits muscle atrophy in Dexa-induced atrophy mice by reducing the expressions of MuRF-1 and MAFbx. Representative images of the Western blot analyses for MuRF1 and MAFbx in gastrocnemius muscles (A) and tibialis anterior muscles (B). Right panel shows the quantification of the indicated proteins. Data shown are mean \pm S.D. (n=3). ** $p < 0.01$ vs. control, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Dexa.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Anthony, J. C., Anthony, T. G., Kimball, S. R., Vary, T. C. and Jefferson, L. S. 2000. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of post-absorptive rats in association with increased eIF4F formation. *J. Nutr.* **130**, 139-145.
- Anthony, J. C., Anthony, T. G. and Layman, D. K. 1999. Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. *J. Nutr.* **129**, 1102-1106.
- Blomstrand, E., Eliasson, J., Karlsson, H. K. and Köhnke, R. 2006. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *J. Nutr.* **136**, 269S-273S.
- Bodine, S. C. and Baehr, L. M. 2014. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **307**, 469-484.
- Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L., Clarke, B. A., Poueymirou, W. T., Panaro, F. J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z. Q., Valenzuela, D. M., DeChiara, T. M., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D. and Glass, D. J. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704-1708.
- Boirie, Y. 2009. Physiopathological mechanisms of sarcopenia. *J. Nutr. Health Aging* **13**, 717-723.
- Bonetto, A., Andersson, D. C. and Waning, D. L. 2015. Assessment of muscle mass and strength in mice. *Bone Key Rep.* **4**, 732.
- Bowen, T. S., Adams, V., Werner, S., Fischer, T., Vinke, P., Brogger, M. N., Mangner, N., Linke, A., Sehr, P., Lewis, J., Labeit, D., Gasch, A. and Labeit, S. 2017. Small-molecule inhibition of MuRF1 attenuates skeletal muscle atrophy and dysfunction in cardiac cachexia. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **8**, 939-953.
- Burd, N. A., Tang, J. E., Moore, D. R. and Phillips, S. M. 2009. Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. *J. Appl. Physiol.* **106**, 1692-1701.
- Cleasby, M. E., Jamieson, P. M. and Atherton, P. J. 2016. Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities. *J. Endocrinol.* **229**, R67-81.
- Davis, T. A., Suryawan, A., Orellana, R. A., Fiorotto, M. L. and Burrin, D. G. 2010. Amino acids and insulin are regulators of muscle protein synthesis in neonatal pigs. *Animal* **4**, 1790-1796.
- Dougherty, J. P., Springer, D. A. and Gershengorn, M. C. 2016. The treadmill fatigue test: a simple, high-throughput assay of fatigue-like behavior for the mouse. *J. Vis. Exp.* **111**, 54052.
- Fulop, T., Larbi, A., Dupuis, G., Le Page, A., Frost, E. H., Cohen, A. A., Witkowski, J. M. and Franceschi, C. 2017. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: friends or foes? *Front. Immunol.* **8**, 1960.
- Glass, D. J. 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1974-1984.
- Herningtyas, E. H., Okimura, Y., Handayaningsih, A. E., Yamamoto, D., Maki, T., Iida, K., Takahashi, Y., Kaji, H. and Chihara, K. 2008. Branched-chain amino acids and arginine suppress Mafbx/atrogen-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. *Biochim. Biophys. Acta.* **1780**, 1115-1120.
- Huang, J. H. and Hood, D. A. 2009. Age-associated mitochondrial dysfunction in skeletal muscle: Contributing factors and suggestions for long-term interventions. *IUBMB Life* **61**, 201-214.
- Ibeunjo, C., Chick, J. M., Kendall, T., Eash, J. K., Li, C., Zhang, Y., Vickers, C., Wu, Z., Clarke, B. A., Shi, J., Cruz, J., Fournier, B., Brachat, S., Gutzwiller, S., Ma, Q., Markovits, J., Broome, M., Steinkrauss, M., Skuba, E., Galarnau, J. R., Gygi, S. P. and Glass, D. J. 2013. Genomic and proteomic profiling reveals reduced mitochondrial function and disruption of the neuromuscular junction driving rat sarcopenia. *Mol. Cell Biol.* **33**, 194-212.
- Lang, T., Strepper, T., Cawthon, P., Baldwin, K., Taafee, D. R. and Harris, T. B. 2010. Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention and assessment. *Osteoporos. Int.* **21**, 543-559.
- Lecker, S. H., Solomon, V., Mitch, W. E. and Goldberg, A. L. 1999. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Nutr.* **129**, 227S-237S.
- Ma, K., Mallidis, C., Bhasin, S., Mahabadi, V., Artaza, J., Gonzalez-Cadavid, N., Arias, J. and Salehian, B. 2003. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, E363-E371.
- Maki, T., Yamamoto, D., Nakanishi, S., Iida, K., Iguchi, G., Takahashi, Y., Kaji, H., Chihara, K. and Okimura, Y. 2012. Branched-chain amino acids reduce hindlimb suspension-induced muscle atrophy and protein levels of atrogen-1 and MuRF1 in rats. *Nutr. Res.* **32**, 676-683.
- Meng, S. J. and Yu, L. J. 2010. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1509-1526.
- Pagano, A. F., Brioché, T., Arc-Chagnaud, C., Demangel, R., Chopard, A. and Py, G. 2018. Short-term disuse promotes fatty acid infiltration into skeletal muscle. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **9**, 335-347.
- Ravi, V., Jain, A., Mishra, S. and Sundaresan, N. R. 2020. Measuring protein synthesis in cultured cells and mouse tissues using the non-radioactive SUNSET assay. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **133**, e127.
- Roberts, S., Collins, P. and Rattray, M. 2021. Identifying and managing malnutrition, frailty and sarcopenia in the community: a narrative review. *Nutrients* **13**, 2316.

26. Rolland, Y., Czerwinski, S., Abellan, Van Kan G., Morley, J. E., Cesari, M., Onder, G., Woo, J., Baumgartner, R., Pillard, F., Boirie, Y., Chumlea, W. and Vellas, B. 2008. Sarcopenia: its assessment, etiology, pathogenesis, consequences and future perspectives. *J. Nutr. Health Aging* **12**, 433-450.
27. Seene, T., Kaasik, P., Pehme, A., Alev, K. and Riso, E. M. 2003. The effect of glucocorticoids on the myosin heavy chain isoforms' turnover in skeletal muscle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **86**, 201-206
28. Volpi, E., Nazemi, R. and Fujita, S. 2004. Muscle tissue changes with aging. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **7**, 405-410.
29. Wen, Y., Murach, K. A., Vechetti, I. J. Jr., Fry, C. S., Vickery, C., Peterson, C. A., McCarthy, J. J. and Campbell, K. S. 2018. MyoVision: software for automated high-content analysis of skeletal muscle immunohistochemistry. *J. Appl. Physiol.* (Bethesda, Md. : 1985) **124**, 40-51.
30. Yamamoto, D., Maki, T., Herningtyas, E. H., Ikeshita, N., Shibahara, H., Sugiyama, Y., Nakanishi, S., Iida, K., Iguchi, G., Takahashi, Y., Kaji, H., Chihara, K. and Okimura, Y. 2010. Branched-chain amino acids protect against dexamethasone-induced soleus muscle atrophy in rats. *Muscle Nerve* **41**, 819-827.
31. Zhang, Y., Zhang, J., Ni, W., Yuan, X., Zhang, H., Li, P., Xu, J. and Zhao, Z. 2021. Sarcopenia in heart failure: a systematic review and meta-analysis. *ESC Heart Fail.* **8**, 1007-1017.

초록 : 발아 서목태 가수분해물의 근위축 억제 효과

이원경¹ · 김은지¹ · 김상곤² · 구영민² · 길영숙² · 신승미² · 안민주² · 강민철³ · 하영술^{1*}

(¹경상국립대학교병원 의생명연구원, 경상국립대학교 의과대학 건강과학연구원, ²(재)경남한방향노화연구원, ³자연에바이오랩)

스테로이드 유발 근위축은 장기간 코르티코스테로이드 요법의 일반적인 부작용이며 근육량과 기능의 현저한 감소로 이어질 수 있다. 발아된 *Rhynchosia Nulubilis* (GRH)는 항염증 및 항산화 특성이 있는 것으로 밝혀진 전통적인 약용 식물이다. 그러나 근 감소 억제 효능에 대하여는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 텍사메타손에 의해 유도된 근위축 C2C12 근관세포 모델과 마우스 모델에서 근위축 억제 활성화에 대한 GRH의 영향을 평가하였다. 또한 골격근에 대한 GRH 효과의 기본이 되는 분자 경로를 확인하였다. May Grunwald-Giemsa 염색을 통한 근관 세포 염색 결과는 GRH 처리군에서 근관의 길이와 면적이 증가함을 보여주었다. 또한, muscle ring-finger protein-1 (MuRF-1)와 muscle atrophy F-box (MAFbx) 발현이 GRH 처리군에서 유의하게 감소하였다. 더욱이 텍사메타손에 의해 유도된 근위축 C57BL/6 마우스에서 트레드밀을 사용한 지구력 측정과 악력측정기를 이용한 악력 측정을 통한 근육 기능을 평가한 결과 GRH를 경구 투여한 마우스의 근육 기능이 향상되었다. 또한 이러한 결과는 근육 조직에서 GRH에 의한 MAFbx의 발현 억제를 통해 일어남을 확인하였다. 결론적으로 GRH는 MAFbx 발현을 억제하여 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 차단함으로써 텍사메타손에 의해 유발된 근위축을 개선할 수 있을 것이다.