

C2C12 세포에서 토끼고기 추출물의 근육분화 및 에너지 조절 효과

†배인선 · 이정아* · 박원서 · 유자연 · 함준상** · 서강민*** · 김기현****

농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과 농업연구사, * 농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과 박사과정,
농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과 농업연구관, *농촌진흥청 국립축산과학원 동물복지연구팀 연구원,
****농촌진흥청 국립축산과학원 동물복지연구팀 농업연구사

Effects of Rabbit Meat Extract on Myogenic Differentiation and Energy Regulation in C2C12 Cells

†In-Seon Bae, Jeong Ah Lee*, Won-Seo Park, Jayeon Yoo, Jun-Sang Ham**, Kangmin Seo*** and Ki Hyun Kim****

Researcher, Animal Products Utilization Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

*Doctoral Student, Animal Products Utilization Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

**Senior Researcher, Animal Products Utilization Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

***Researcher Assistant, Animal Welfare Research Team, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

****Researcher, Animal Welfare Research Team, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

Abstract

The present study was conducted to investigate effects of rabbit meat extract on energy metabolism and muscle differentiation in C2C12 myotubes. Water extract of rabbit meat (10, 50, 100, and 200 µg/ml) was used to treat differentiated C2C12 cells. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot analysis were used to determine mRNA or protein levels of energy metabolism-related genes. Total adenosine triphosphate (ATP) content was also measured. Treatment with rabbit meat extract significantly increased expression levels of muscle differentiation markers (myogenin and myosin heavy chain) and mitochondrial biogenesis regulators (PGC1α, NRF1, and TFAM) in C2C12 myotubes compared to non-treated control. Additionally, rabbit meat extract activated phosphorylation of AMPK and acetyl-coA carboxylase (ACC). Rabbit meat extract significantly increased ATP contents in myotubes. These results suggest that rabbit meat extract has the potential to improve energy metabolism in skeletal muscles.

Key words: rabbit meat extract, energy metabolism, C2C12 cells

서 론

골격근은 에너지 대사와 열생산의 주요 기관으로서, 미토콘드리아가 가장 풍부하게 존재한다(Kwak HB 2015; Dong & Tsai 2023). 골격근에서 생체에너지 조절과 관련된 미토콘드리아 기능 조절 인자는 다양하다(Ashcroft 등 2020; Lee & Kim 2021). 골격근 내에서 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha(PGC1α)는 세포 에너지 대사의 주요 인자로 작용하여 지방산 산화를 조절하고 미토콘드리아 생합성을 증가시킨다(Kim 등 2022). AMP-activated protein kinase(AMPK)도 세포 내 에너지 항상성을 유지하는

효소로 작용하며, 근육 내에서 AMPK를 활성화하여 PGC1α 발현을 직접적으로 증가시킨다(Irrcher 등 2008; Kim 등 2016). 또한 미토콘드리아 생합성에 관련된 인자로 nuclear respiratory factor 1(NRF-1)과 mitochondrial transcription factor A(TFAM) 등이 있다(Kang 등 2019).

미토콘드리아 생합성 증가는 근육 분화에도 밀접한 관련이 있다(Porter 등 2011). 골격근 세포는 근육분화 과정을 통해 미분화 상태의 근아세포(myoblast)에서 관 형태의 다핵세포인 근관세포(myotube)로 성숙된다(Song MY 2015). 근육분화는 myogenin과 myosin heavy chain(MHC)의 발현량이 증가하는 것으로 알려져 있다(Yoon 등 2013; Kang 등 2019). 따라

† Corresponding author: In-Seon Bae, Researcher, Animal Products Utilization Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea. Tel: +82-63-238-7356, Fax: +82-63-238-7397, E-mail: isbae746@korea.kr

서 이들 유전자들의 발현량 측정을 통해 근육 분화도를 확인할 수 있다. 이로써 골격근은 당 및 지방산 대사를 조절함으로써 비만뿐만 아니라 근육량 감소를 나타내는 근감소증에도 직접적으로 영향을 미쳐 골격근에 대한 연구와 관심이 더욱 증가하고 있다.

토끼는 토끼과에 속하는 가축으로 우리나라에서는 삼국 시대부터 사육하였다. 우리나라의 농림축산식품부 통계자료(MAFRA 2023)에 따르면 토끼 농장 1,540호에서 43,579마리를 사육하고 있으며 매년 감소 추세를 나타내고 있다. 토끼고기 생산량은 중국이 약 60%를 차지하여 가장 많이 생산하고 있으며, 프랑스와 이탈리아 등 일부 유럽 국가들에서 다양한 요리로 널리 사용된다. 토끼고기는 지방 함량이 적고 불포화지방산과 비타민 B12, 미네랄 등이 풍부하다고 알려져 있으며, 피부 미용뿐만 아니라 두뇌 활동 증진과 노년층 치매 예방에 도움을 줄 수 있다(Lee 등 2022). 또한, 예로부터 동의보감이나 민간요법에서는 토끼고기를 고혈압, 당뇨, 동맥경화 등 다양한 질병을 치료하고 예방하는 보양식으로 사용되어왔다.

하지만 토끼고기의 연구는 주로 육질특성, 사양방법에 따른 지방산 조성, 위생 안전성, 영양성분 분석, 육가공품 개발 등이 수행되었으나(Kouba 등 2008; Bianchi 등 2009; Cavani 등 2009; Valenzuela 등 2011; Apatá 등 2012), 토끼고기의 효능에 대한 직접적인 연구는 부족한 실정이다. 본 연구진들은 토끼고기의 소비 활성화를 위해 선행연구에서 3T3-L1 지방세포에서 토끼고기 추출물이 항비만과 인슐린 조절 경로를 활성화시켜 인슐린 저항성을 개선하는 효과를 확인하였다(Bac 등 2023). 이에 본 연구에서는 토끼고기 추출물의 효능 특성이 근육 기능에 미치는 영향을 조사하기 위해 C2C12 골격근 세포 배양 모델을 사용하였다. 이 모델을 통해 토끼고기 추출물의 처리가 근육세포의 분화 및 에너지대사 조절작용에 미치는 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 토끼추출물 제조

토끼고기 추출물은 부직포 주머니에 토끼 200 g을 넣고 정수된 물 200 mL로 120°C에서 12시간 동안 가열하였으며, 압력은 30 psi를 유지하였다. 압력을 뺀 후, 토끼고기가 들어있는 부직포 주머니를 압착시킨 후 토끼고기 추출물을 여과지(Whatman paper filter No.1)로 거르고 동결건조하여 추출물을 제조하였다. 이와 같이 토끼고기 추출물은 진액 추출 과정을 약간 변형하여 제조하였다. 이 과정에서 수율은 36%였다.

2. 세포 배양 및 근육 분화

미분화상태의 근아세포인 C2C12 세포(CRL-1772™, ATCC, Manassas, VA, USA)는 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclone, UT, USA) 및 1% penicillin-streptomycin(P/S; Hyclone)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Welgene, Daegu, Korea)으로 배양하였다. 약 85~95%의 세포가 성장하였을 때 2% Horse serum(Hyclone)이 함유된 배지로 매일 1회씩 총 6일간 교체하였다. 이를 통해 미분화상태의 근아세포(myoblasts)를 근관세포(myotubes)로 분화시켜주었으며, 분화 2일부터 토끼고기추출물(10, 50, 100, 200 µg/mL)을 처리하였다. 근관의 너비는 무작위로 선택된 섹션에서 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

3. 세포독성 평가

C2C12 세포에서 토끼고기 추출물 처리에 의한 세포 생존 능력을 측정하기 위해 EZ-CyTox(Daeil Lab Service, Seoul, Korea)를 사용하였다. C2C12 세포(2×10^4 cells/well)를 96-well culture plate에 seeding하고, 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 토끼고기 추출물을 10, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였다. 그 후 각 well 당 EZ-Cytox solution을 10 µL씩 넣고 1시간 동안 배양한 후, microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 정도는 대조군에서의 100% 생존도를 기준으로 상대적인 세포생존도를 계산하였다.

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

C2C12 세포를 수거하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 TRIzol(Sigma-Aldrich, MO, USA) 용액을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA에 iScript cDNA synthesis kit(Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 25°C에서 5분, 46°C에서 20분, 95°C에서 1분의 조건으로 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 SsoAdvanced universal SYBR Green supermix(Bio-Rad)를 혼합하여 에너지대사 관련 유전자인 PGC1α, SIRT1, NRF1, TFAM 그리고 근육분화 관련 유전자인 myogenin, MHC의 발현에 대한 토끼고기 추출물의 조절 효과를 확인하기 위해 qRT-PCR을 수행하였다.

5. Western blot

C2C12 세포에서 발현되는 근육분화(myogenin, MHC), 에너지대사(PGC-1α, Sirt1, NRF1, TFAM), 에너지 항상성 유지(ACC, AMPK)와 관련된 단백질에 대한 토끼고기 추출물의 조절 효과를 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 즉, C2C12 세포를 수거하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후

RIPA buffer(50 mM Tri-HCl, 150 mM sodium chloride, 1% NP-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), a protease inhibitor cocktail, 50 mM sodium fluoride, and 0.2M sodium orthovanadate)를 넣고 4°C, 13,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 상등액을 수집하여 Bradford's assay 용액(Bio-Rad)을 사용하여 단백질의 농도를 측정하고, 20 µg 단백질을 10~12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 사용하여 분리하였다. 이를 nitrocellulose membrane에 transfer한 후, 5% skim milk로 blocking하였다. Blocking된 membrane에 각각의 1차 항체를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후, 1X PBST buffer로 세척하고, HRP-conjugated 2차 항체로 실온에서 40분간 반응시켰다. 이후 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액(Advansta Inc., CA, USA)으로 기질 반응을 수행하고 X-ray film에 감광하였다. 각 단백질의 밴드는 Image J program(NIH, USA)을 이용하여 β-actin의 발현 정도와 비교한 발현 비율로 계산하였다.

6. ATP assay

C2C12 세포에서 ATP colorimetric assay kit(Abcam, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 분화된 C2C12 세포를 수집한 후, 110 µL의 ATP assay buffer를 넣고 원심분리하여 상층액을 96 well plate에 50 µL씩 분주하였다. ATP assay buffer, ATP Probe, ATP converter, Developer를 혼합한 용액을 96 well plate에 각각 50 µL씩 분주하고 상온에서 빛을 차단시킨 상태에서 30분 동안 반응시킨 후 570 nm의 파장으로 측정하였다. ATP의 농도는 ATP standard를 이용하여 계산하였다.

7. 통계 분석

Statistical Package for the Social Science(SPSS V28, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계 분석을 수행하였다.

Student's *t*-test를 사용하였고, 통계적으로 유의한 차이를 확인하기 위해 *p*-value가 0.05 이하인 경우를 인정하였다.

결과 및 고찰

1. 세포독성

C2C12 myoblasts와 myotubes에서 토끼고기 추출물의 독성을 평가하기 위해 cell viability를 측정하였다. 결과적으로, 세포만 배양한 경우의 세포생존율을 100%로 설정하였을 때 토끼고기 추출물의 10, 50, 100, 200 µg/mL 농도 처리에서 myoblasts의 경우 각각 100.47±6.49, 98.74±2.9, 100.29±4.6, 101.99±2.51로 측정되었고(Fig. 1A), myotubes의 경우 각각 100.7±3.06, 100.4±0.13, 100.27±0.26, 100.7±2.9로 측정되었다(Fig. 1B). 따라서 토끼고기 추출물을 처리한 결과 모든 농도에서 유의한 변화가 나타나지 않았음을 확인하였다. 이는 해당 농도 범위에서 토끼고기 추출물이 세포에 미치는 독성이 낮거나 없음을 시사할 수 있다.

2. 근육분화에 대한 효과

C2C12 세포에서 토끼고기 추출물이 근육 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 근육 분화 마커인 myogenin과 MHC의 mRNA와 단백질 발현을 각각 qRT-PCR과 western blot 방법으로 분석하였다. 실험 결과에 따르면 토끼고기 추출물을 처리한 세포에서 myogenin과 MHC mRNA 발현이 농도 의존적으로 증가($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$)하였다. 또한, 단백질의 발현도 200 µg/mL 토끼고기 추출물을 처리한 세포에서 대조군보다 myogenin 발현은 약 1.9배($p<0.001$), MHC 발현은 약 3.73배($p<0.001$)로 가장 높았다(Fig. 2A). 이러한 결과는 토끼고기 추출물이 근육 분화 단백질의 발현을 증가시킴으로써 근육

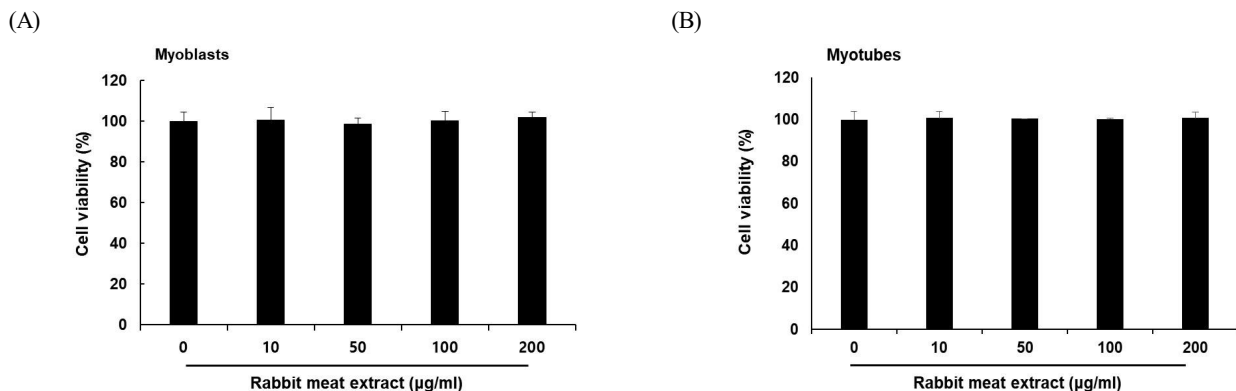


Fig. 1. Effects of rabbit meat extract on cell viability in C2C12 myoblasts (A), and differentiated C2C12 myotubes (B). Cells were treated with rabbit meat extract at 10, 50, 100 and 200 µg/mL for 24 h. Data represents mean±S.D. of three independent experiments.

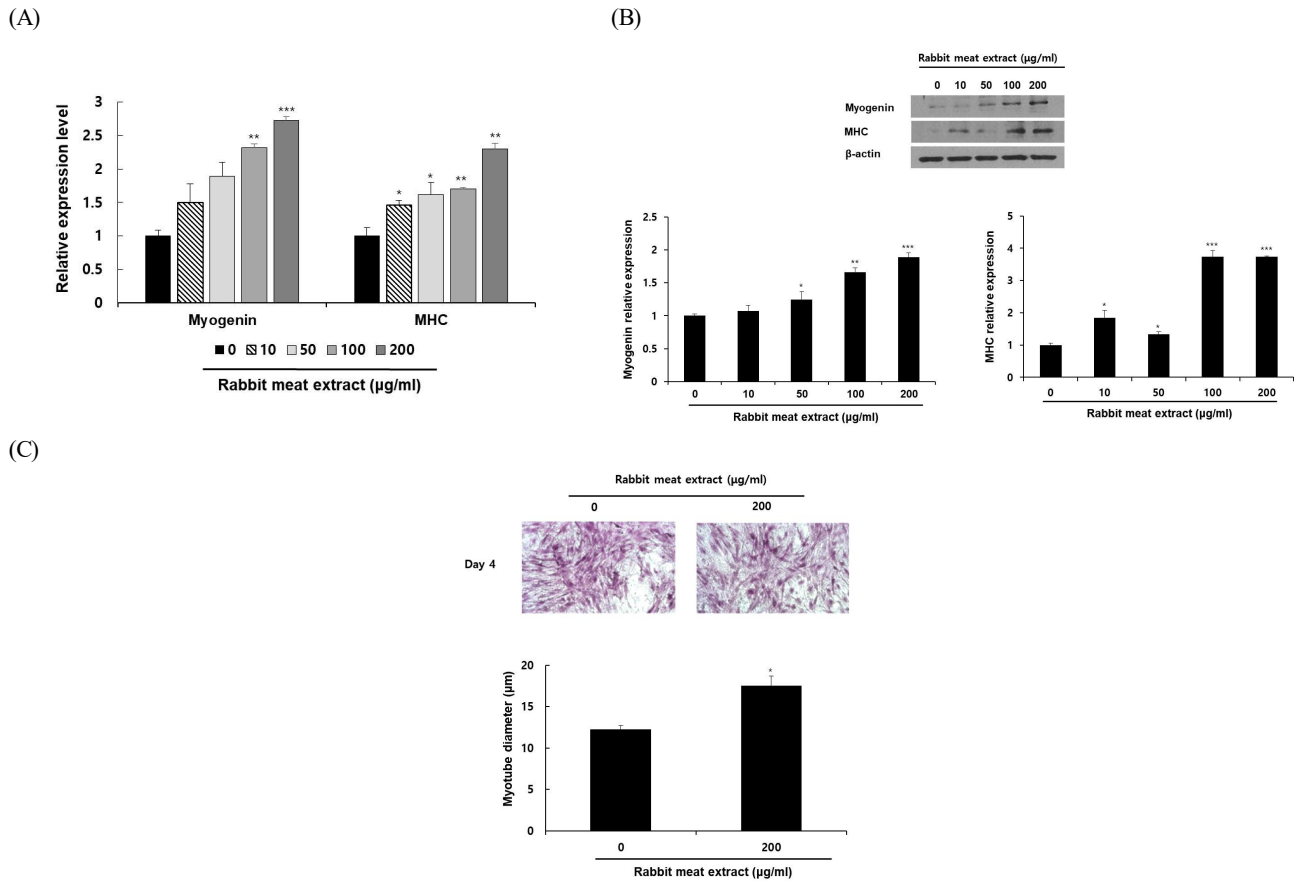


Fig. 2. Effects of rabbit meat extract on myocyte differentiation in C2C12 cells Myogenin and MHC mRNA (A) and protein (B) levels were determined by qRT-PCR and western blotting, respectively. The cells were stained using the May-Grunwald and Giemsa staining methods on day 4. Measurement of myotube widths based on images (C). Data represents mean \pm S.D. of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. non-treated differentiated cells.

육 분화를 촉진할 수 있는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 C2C12 세포에서 말고기 추출물의 처리 농도를 참고하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 시작하였으며(Lee 등 2024), 추가적으로 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 결과, 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리군과 유사한 수준의 근육 분화 마커 발현이 측정되었다. 따라서 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리하여 분석을 수행하였다. 본 연구에서는 토끼고기 추출물이 골격근 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 현미경을 통해 형태적인 변화를 관찰하였다. 실험 결과 myotube의 너비가 토끼고기 추출물을 처리하지 않은 세포보다 토끼고기 추출물을 처리한 세포에서 증가(p <0.05)하는 경향을 보였다(Fig. 2B 및 Fig. 2C). 근육분화는 myogenin, MyoD, MHC 발현량을 증가시켜 근육분화를 증가시킨다고 보고하고 있다(Miller JB 1990; Je 등 2019). 그러므로 본 결과를 통해 토끼고기 추출물은 근육분화 증진과 관련이 있다는 것을 확인할 수 있었다. 농촌진흥청의 제10판 국가표준식품성분표에 따르면 토끼고기는 소고기보다 20배, 돼지고기보다 2.6배 높은 알파-

리놀렌산(alpha-linolenic acid) 함량을 지니고 있다(RDA, 2022). 알파-리놀렌산은 C2C12 세포의 근육 분화 과정에서 근분화 유전자 마커인 myogenin의 발현을 증가시킨다(Zhou 등 2022). 또한 토끼고기는 소고기와 돼지고기보다 더 많은 갈슘과 칼륨을 함유하고 있다(Iseki 등 2021; Sinha 등 2022). 비록 토끼고기 추출물에서 근육 분화를 촉진하는 특정 물질은 아직 밝혀지지 않았으나, 토끼고기는 근육 분화에 유익한 성분들이 많이 포함되어 있다. 따라서 향후 토끼고기의 유효 성분을 탐색하여 근육 분화를 유도할 수 있는 기능성 물질을 발굴할 필요가 있다.

3. 골격근 세포에서 에너지대사에 대한 효과

골격근 세포는 myoblasts에서 myotubes로 분화되는 과정에서 미토콘드리아 활성이 증가하면서 미토콘드리아가 근육 분화의 조절에 기여한다고 알려져 있다(Porter 등 2011). C2C12 세포에 토끼고기 추출물의 에너지대사 조절효과를

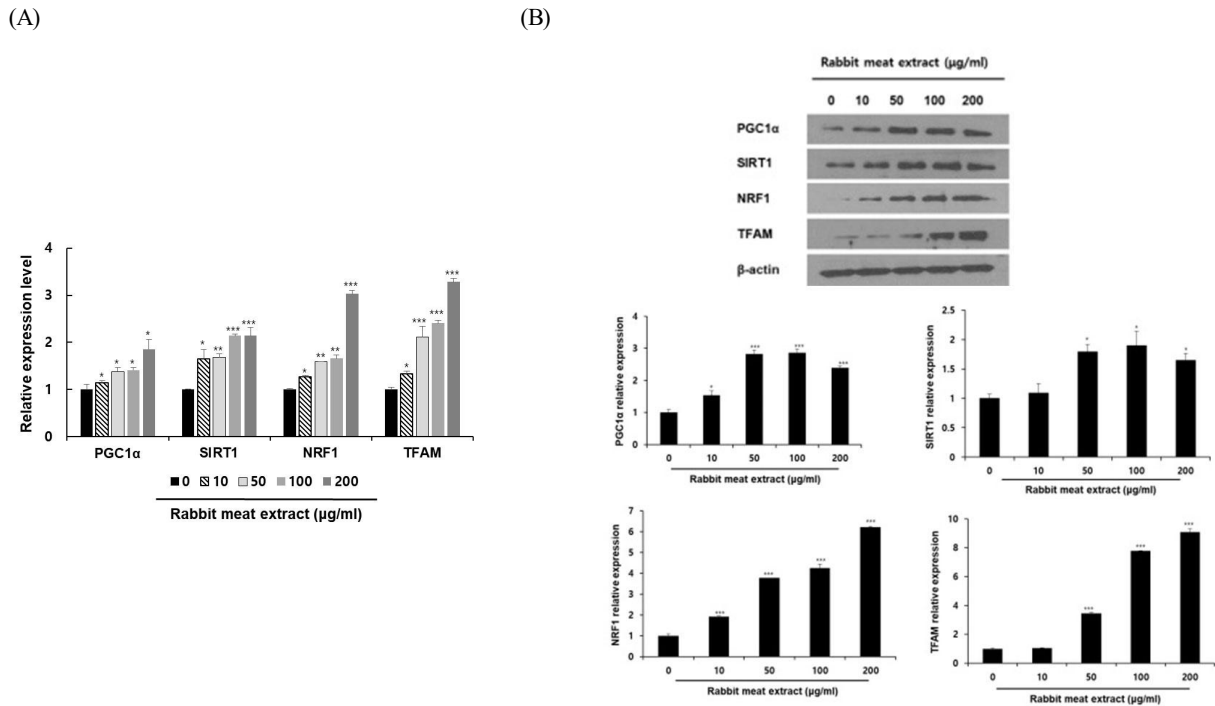


Fig. 3. Effects of rabbit meat extract on the biogenesis-regulating factors in C2C12 myotubes. The expression of PGC1 α , Sirt1, NRF1, and TFAM mRNA (A) and protein (B) were analyzed by qRT-PCR and western blotting, respectively. Data represents mean \pm S.D. of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. non-treated differentiated cells.

확인하기 위해 미토콘드리아 매개 에너지대사 조절인자들인 PGC-1 α , Sirt1, NRF1, TFAM의 mRNA 및 단백질 발현을 qRT-PCR 방법과 western blot 방법으로 조사하였다. 그 결과, PGC1 α , Sirt1, NRF1, TFAM의 mRNA와 단백질 발현이 모두 대조군에 비해 토끼고기 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 증가(p <0.05, p <0.01, p <0.001) 하였다(Fig. 3). PGC-1 α 는 미토콘드리아 생합성을 촉진시키고(Halling & Pilegaard 2020), NRF1은 미토콘드리아에서의 산화적 인산화 과정의 조절인자이며(Kiyama 등 2018), TFAM은 미토콘드리아 복제 및 전사를 조절하는 미토콘드리아 DNA의 프로모터에서 작용하는 전사인자이다(Kang 등 2018). PGC-1 α 는 NRF-1 및 TFAM을 활성화시켜 미토콘드리아 증식과 DNA의 전사를 촉진하여 미토콘드리아 생합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Chen 등 2022). 본 연구에서는 토끼고기 추출물에 의해 NRF1과 TFAM의 발현이 증가함을 확인하였는데, 이를 통해 토끼고기 추출물이 골격근 내 미토콘드리아 생합성에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상된다. 기존 문헌에서 지방세포의 미토콘드리아 합성 증가에 대한 긍정적 효과를 보고하고 있지만(Bae 등 2023), 토끼고기 추출물이 골격근 세포에서의 미토콘드리아에 미치는 영향에 대해 직접적으로 연구된 바는 없다. 따라서 본 연구에서는 토끼고기 추출물이 C2C12 세포

에서 근육분화와 미토콘드리아 합성에 미치는 효과를 확인하였다. 이에 동물 모델을 활용한 추가 연구를 통해 토끼고기 추출물의 항비만 효능, 에너지 대사 조절 및 미토콘드리아 기능 조절 효과를 보다 구체적으로 평가할 필요가 있다.

4. 골격근 세포에서 토끼고기 추출물의 AMPK/ACC signaling pathway에 대한 효과

AMPK는 골격근에서 지방산 대사에 중요한 역할을 하며, 미토콘드리아 내 ATP 생산을 증가시키는 작용을 한다(Das 등 2012). 이에 토끼고기 추출물의 에너지대사 증진 효과에 AMPK의 관련성을 평가하기 위하여 AMPK 및 p-AMPK 단백질 발현량을 측정하였다. 그 결과, AMPK 인산화 단백질(p-AMPK)의 발현은 대조군에 비해 토끼고기 추출물 처리 농도에 따라 증가(p <0.01, p <0.001)하는 경향을 보였다(Fig. 4A). AMPK의 활성화는 지질합성에 관여하는 유전자인 ACC가 인산화 및 불활성화를 유발한다. 이에 phospho-ACC(pACC)의 단백질 발현량을 측정하여 토끼고기 추출물의 AMPK 활성화 경로를 명확히 하고자 하였다. 실험 결과, 토끼고기 추출물 처리로 인해 ACC의 인산화가 증가(p <0.05, p <0.01, p <0.001)하였으며(Fig. 4B), 이는 AMPK의 활성화 결과와도 일치하는 내용이었다. 따라서 토끼고기 추출물이 골격근 내에서

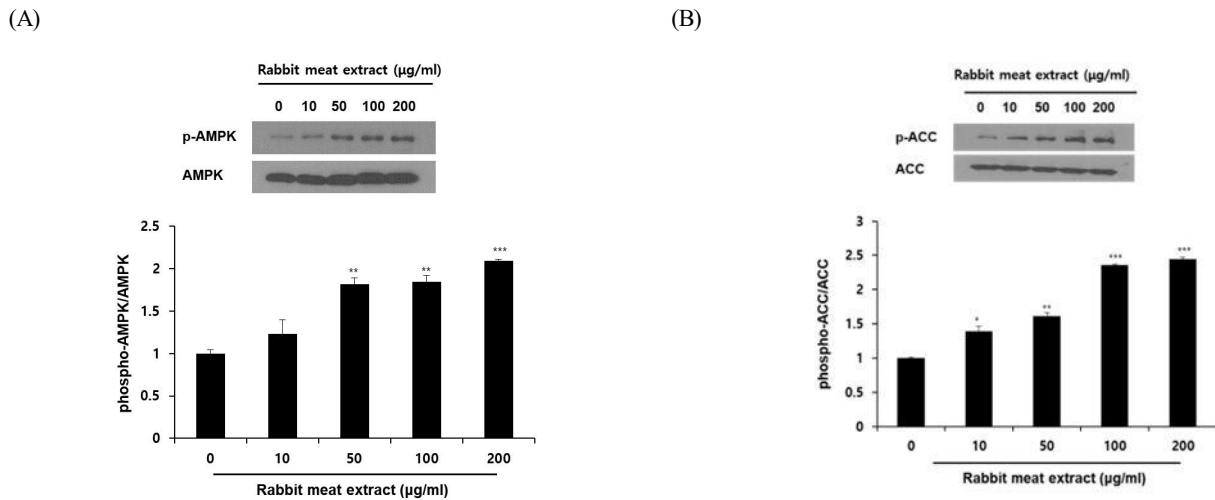


Fig. 4. Effects of rabbit meat extract on the phosphorylation of AMPK and ACC in C2C12 myotubes. The expression of protein level were determined by western blotting. Data represents mean±S.D. of three independent experiments. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ vs. non-treated differentiated cells.

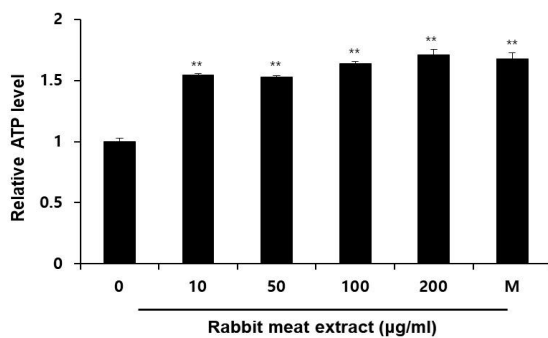


Fig. 5. Effects of rabbit meat extract on the levels of ATP in C2C12 myotubes. Data represents mean±S.D. of three independent experiments. ** $p<0.01$ vs. non-treated differentiated cells. M: metformin treatment (2.5 mM/mL).

AMPK 활성화에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. AMPK는 인산화를 통해 PGC-1 α 활성화에 직접적으로 기여한다. PGC-1 α 의 발현을 통해 미토콘드리아 관련 유전자들의 발현을 증가시키는 것으로 보고된 바, 본 연구 결과와 일치하였다(Halling & Pilegaard 2020; Chen 등 2022).

5. 골격근 세포에서 ATP 생산에 대한 효과

골격근 세포는 미토콘드리아가 풍부하여 ATP 생산에 중요한 역할을 하는 조직이다(Lee & Kim 2021; Akiyama 등 2022). ATP의 원료는 포도당과 지방산이며, 골격근 내 미토콘드리아 기능 이상으로 포도당과 지방산의 대사가 저하되면서 인슐린 저항성이 발생하고, 미토콘드리아의 에너지 발

생이 감소하는 것으로 알려져 있다(Brand 등 2013).

C2C12 myotubes에서 토끼고기 추출물의 에너지 합성 증가를 확인하기 위하여 세포 내 ATP 농도를 측정하였다. 그 결과, 세포 내 ATP의 농도는 토끼고기 추출물 처리구에서 대조구에 비해 유의적으로 증가($p<0.01$)하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 또한, 양성 대조군으로 AMPK 활성화제로서 미토콘드리아 생합성 조절을 하는 metformin 처리군에서도 대조군에 비해 증가($p<0.01$)하는 것으로 나타났다.

요약 및 결론

본 연구는 토끼고기 추출물이 골격근 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 세포독성을 평가한 결과, 토끼고기 추출물이 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다. 또한, 근육분화에 대한 효과로는 myogenin과 MHC의 발현이 증가하였으며, 에너지 대사에 대한 효과로는 AMPK 및 p-AMPK 단백질 발현이 증가하였으며, 에너지 생산에 대한 효과로는 세포 내 ATP 농도가 증가하였다. 이를 통해, 토끼고기 추출물이 세포독성을 유발하지 않으면서 근육 분화와 에너지 대사를 촉진할 수 있음을 확인하였다. 특히, PGC1 α 및 AMPK 신호 경로의 활성화를 통해 미토콘드리아 생합성과 ATP 생산이 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 토끼고기 추출물이 근육 기능 향상 및 에너지 대사 조절에 유용하게 사용될 가능성을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제번호:RS-2022-RD010371)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Akiyama M, Mizokami T, Miyamoto S, Ikeda Y. 2022. Kaempferol increases intracellular ATP content in C2C12 myotubes under hypoxic conditions by suppressing the HIF-1 α stabilization and/or by enhancing the mitochondrial complex IV activity. *J Nutr Biochem* 103:108949
- Apata ES, Eniolorunda OO, Amao KE, Okubanjo AO. 2012. Quality evaluation of rabbit meat as affected by different stunning methods. *Int J Agric Sci* 2:54-58
- Ashcroft SP, Bass JJ, Kazi AA, Atherton PJ, Philp A. 2020. The vitamin D receptor regulates mitochondrial function in C2C12 myoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 318:C536-C541
- Bianchi M, Petracci M, Cavani C. 2009. The influence of linseed on rabbit meat quality. *World Rabbit Sci* 17:97-107
- Bae IS, Lee JA, Cho SH, Kim HW, Kim Y, Seo K, Cho HW, Lee MY, Chun JL, Kim KH. 2023. Rabbit meat extract induces browning in 3T3-L1 adipocytes via the AMP-activated protein kinase pathway. *Foods* 12:3671
- Brand MD, Orr AL, Perevoshchikova IV, Quinlan CL. 2013. The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. *Br J Dermatol* 169:1-8
- Cavani C, Petracci M, Trocino A, Xiccato G. 2009. Advances in research on poultry and rabbit meat quality. *Ital J Anim Sci* 8:741-750
- Chen L, Qin Y, Liu B, Gao M, Li A, Li X, Gong G. 2022. PGC-1 α -mediated mitochondrial quality control: Molecular mechanisms and implications for heart failure. *Front Cell Dev Biol* 10:871357
- Das AK, Yang QY, Fu X, Liang JF, Duarte MS, Zhu MJ, Trobridge GD, Du M. 2012. AMP-activated protein kinase stimulates myostatin expression in C2C12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 427:36-40
- Dong H, Tsai SY. 2023. Mitochondrial properties in skeletal muscle fiber. *Cells* 12:2183
- Halling JF, Pilegaard H. 2020. PGC-1 α -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications. *Appl Physiol Nutr Metab* 45:927-936
- Ircher I, Ljubicic V, Kirwan AF, Hood DA. 2008. AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1 α promoter in skeletal muscle cells. *PLOS ONE* 3:e3614
- Iseki Y, Ono Y, Hibi C, Tanaka S, Takeshita S, Maejima Y, Kurokawa J, Murakawa M, Shimomura K, Sakamoto K. 2021. Opening of intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in C2C12 skeletal muscle cells increases the myotube diameter via the Akt/mammalian target of rapamycin pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 376:454-462
- Je HJ, Kim MG, Cho IH, Kwon HJ. 2019. Induction of myogenic differentiation in myoblasts by electrical stimulation. *J Korean Soc Phys Med* 14:63-70
- Kang I, Chu CT, Kaufman BA. 2018. The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: Emerging evidence and mechanisms. *FEBS Lett* 592:793-811
- Kang SY, Hyun SY, Kwon Y, Park YK, Jung HW. 2019. Effects of chaenomelis fructus extract on the regulation of myoblasts differentiation and the expression of biogenetic factors in C2C12 myotubes. *Korean J Herbol* 34:99-107
- Kim I, Park CH, Jung HY, Jeong J, Hong HU, Kim JB. 2016. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract enhances exercise capacity in mouse model. *Korean J Food Nutr* 29:506-512
- Kim K, Sim MS, Kwak MK, Jang SE, Oh YS. 2022. The effects of *Allomyrina dichotoma* larval extract on palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Nutr Health* 55:462-475
- Kiyama T, Chen CK, Wang SW, Pan P, Ju Z, Wang J, Takada S, Klein WH, Mao CA. 2018. Essential roles of mitochondrial biogenesis regulator Nrf1 in retinal development and homeostasis. *Mol Neurodegener* 13:56
- Kouba M, Benatmane F, Blochet JE, Mourot J. 2008. Effect of a linseed diet on lipid oxidation fatty acid composition of muscle, perirenal fat and raw and cooked rabbit meat. *Meat Sci* 80:829-834
- Kwak HB. 2015. Skeletal muscle mitochondria and insulin resistance: The role of exercise. *Korean J Obes* 24:78-86
- Lee JA, Jung SH, Seol KH, Kim HW, Cho S, Kang SM. 2022. Evaluation of the nutritional composition and quality traits of rabbit meat. *J Korean Soc Food Cult* 37:171-177
- Lee HJ, Kim D, Do K, Yang CB, Jeon SW, Jang A. 2024. Effects of horse meat hydrolysate on oxidative stress, proinflammatory cytokines, and the ubiquitin-proteasomal

- system of C2C12 cells. *Food Sci Anim* 44:132-145
- Lee MS, Kim Y. 2021. Effects of isorhamnetin on the regulation of mitochondrial function in C2C12 muscle cells. *J Nutr Health* 54:335-341
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs [MAFRA]. 2023. 2022 Statistics on Other Livestock. p. 20. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs
- Miller JB. 1990. Myogenic programs of mouse muscle cell lines: Expression of myosin heavy chain isoforms, MyoD1, and myogenin. *J Cell Biol* 111:1149-1159
- Porter GA Jr, Hom J, Hoffman DL, Quintanilla RA, de Mesy Bentley KL, Sheu SS. 2011. Bioenergetics, mitochondria, and cardiac myocyte differentiation. *Prog Pediatr Cardiol* 31:75-81
- Rural Development Administration [RDA]. 2022. 10th Revision Korean Food Composition Table. Rural Development Administration
- Sinha S, Elbaz-Alon Y, Avinoam O. 2022. Ca²⁺ as a coordinator of skeletal muscle differentiation, fusion and contraction. *FEBS J* 289:6531-6542
- Song MY. 2015. Effects of root of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi on myogenesis in C2C12 cells. *J Korean Med Obes Res* 15:38-44
- Valenzuela C, de Romaña DL, Schmiede C, Morales MS, Olivares M, Pizarro F. 2011. Total iron, heme iron, zinc, and copper content in rabbit meat and viscera. *Biol Trace Elem Res* 143:1489-1496
- Yoon BR, Kim YH, Lee JS, Hong HD, Rhee YK, Cho CW, Kim YC, Lee OH. 2013. Protective effect of ferments of hot-water extract mixture from *Rhodiola sachalinensis* and red ginseng on oxidative stress-induced C2C12 myoblast. *Korean J Food Nutr* 26:485-491
- Zhou D, Li XH, Lee SH, Heo G, Cui XS. 2022. Effects of alpha-linolenic acid and essential amino acids on the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts. *J Anim Reprod Biotechnol* 37:17-26

Received 28 August, 2024
Revised 10 September, 2024
Accepted 07 October, 2024