pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 2, pp. 69~78 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.2.69

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

덱사메타손으로 유도된 근위축 C2C12 모델에서 효소처리스테비아의 보호 효과

오건[1] · 최선일[2] · 한웅호[1] · 문효[1] · 이세정[1] · 임지현[1] · 이호성[3] · 정형동[3] · 라문진[4] · 권민희[4] · 이옥환[1,2]*

[1]강원대학교 식품환경융합학과
[2]강원대학교 농업생명과학연구원
[3](주)산돌식품
[4](재)홍천메디칼허브연구소

Protective Effect of Enzymatically Modified Stevia on C2C12 Cell-based Model of Dexamethasone-induced Muscle Atrophy

Geon Oh[1], Sun-Il Choi[2], Xionggao Han[1], Xiao Men[1], Se-Jeong Lee[1], Ji-Hyun Im[1], Ho-Seong Lee[3], Hyeong-Dong Jung[3], Moon Jin La[4], Min Hee Kwon[4], Ok-Hwan Lee[1,2]*

[1]Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon, Korea
[2]Agricultural and Life Sciences Research Institute, Kangwon National University, Chuncheon, Korea
[3]Sandol Food Co., Ltd, Hongcheon, Korea
[4]Hongcheon Institute of Medicinal Herb, Hongcheon, Korea

(Received March 20, 2023/Revised April 4,2023/Accepted April 4, 2023)

This study aimed to investigate the protective effect of enzymatically modified stevia (EMS) on C2C12 cell-based model of dexamethasone (DEX)-induced muscle atrophy to provide baseline data for utilizing EMS in functional health products. C2C12 cells with DEX-induced muscle atrophy were treated with EMS (10, 50, and 100 μg/mL) for 24 h. C2C12 cells were treated with EMS and DEX to test their effects on cell viability and myotube formation (myotube diameter and fusion index), and analyze the expression of muscle strengthening or degrading protein markers. *Schisandra chinensis* Extract, a common functional ingredient, was used as a positive control. EMS did not show any cytotoxic effect at all treatment concentrations. Moreover, it exerted protective effects on C2C12 cell-based model of DEX-induced muscle atrophy at all concentrations. In addition, the positive effect of EMS on myotube formation was confirmed based on the measurement and comparison of the fusion index and myotube diameter when compared with myotubes treated with DEX alone. EMS treatment reduced the expression of muscle cell degradation-related proteins Fbx32 and MuRF1, and increased the expression of muscle strengthening and synthesis related proteins SIRT1 and p-Akt/Akt. Thus, EMS is a potential ingredient for developing functional health foods and should be further evaluated in preclinical models.

Key words: Muscle atrophy, Sarcopenia, Enzymatically modified stevia, C2C12, Dexamethasone

국내 통계청 자료에 의하면 65세 이상 노인 인구가 2005년에 9.1%이었던 것이 2020년에는 15.7%, 2030년에는 24.1%에 이를 것으로 전망하고 있으며, 이러한 속도는 OECD 국가 중에서 가장 빠른 속도이다[1)]. 골격근육량(skeletal muscle mass)의 감소로 인해 생기는 근감소증(sarcopenia)은 노화와 연관된 근육량의 감소를 의미하며, 직접적으로 근력(muscle strength)의 저하를 유발하고 그 결과 각종 신체기능(physical function)의 감소 및 장애(disability)을 일으켜 사망의 위험성도 증가되는 것으로 알려져 있다[2)]. 또한 노화에 따른 체질량지수, 체지방량, 복강 내 지방량의 증가는 심혈관질환 및 제2형 당뇨병의 위

*Correspondence to: Dr. Ok-Hwan Lee, Dept. of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: +82-33-250-6454, Fax: +82-33-259-5561
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

험과 관계가 있다[3,4]. 따라서 근육량의 감소와 체지방 또는 복강 내 지방의 증가는 상승적 작용으로 기능장애와 대사장애의 위험을 증가시킬 수 있다[1]. 최근 이러한 추정과 관심으로 근감소성 비만(sarcopenic obesity)이라는 개념이 등장하게 되었다[5,6]. 그리고 WHO(World Health Organization, 2016)에서 근감소증을 질병으로 분류하여[7] 근감소증 예방에 대한 중요성이 커지고 있다.

설탕의 과다섭취가 비만, 당뇨 등 성인병 발생원인 중 하나라는 인식이 확산되고[8,9] 소비자의 건강에 대한 관심이 높아지면서 전 세계적으로 설탕을 대체하는 대체감미료 시장이 높은 성장세를 나타내고 있다[10]. 대체감미료는 열량을 기준으로 열량성(caloric), 비열량성(non-caloric) 또는 저열량성(low-caloric)으로 분류되고, 비열량성/저열량성 감미료는 감미도에 따라 크게 고감미료(high intensity sweetener)와 저감미도 감미료(low intensity sweetener)로 구분된다[11]. 고감미도 대체감미료인 스테비오사이드는 국화과에 속하는 다년초인 스테비아(Stevia rebaudiana)로부터 추출된 스테비아 감미료 중 하나이며, enzymatically modified stevia (EMS)는 당전이효소를 이용하여 스테비오사이드의 쓴맛, 떫은 맛, 그리고 뒷맛이 산뜻하지 못한 단점을 감미질과 감미도를 향상시킨 것이며, 신체에서 거의 대사하지 않기 때문에 설탕을 대체하는 감미료로 산업체에서 사용되고 있다[12]. 2011년 품목제조 보고 분석에 따르면 EMS가 소스류, 어묵, 절임류, 기타가공품, 김치 등 가장 많은 품목(1,007개)에서 사용되었다[13]. 현재 식품에서 사용되는 설탕을 비열량감미료로 대체한 식이 조절을 통해 전반적인 칼로리와 당질의 섭취를 줄이고 비만과 제2형 당뇨병의 주요 대사 합병증을 일부 예방할 수 있다는 연구[14-18]가 제시되고 있고 대체감미료로 사용되는 알룰로스가 근력개선에 효능이 있음을 나타내는 연구도 발표되었다[19]. 그러나 EMS에 관한 연구는 EMS를 동일한 단맛을 제공하는 수준으로 제품에 첨가하여 최종 제품의 물성 및 관능적·이화학적 특성을 측정하거나 EMS 첨가 전후의 관능검사 결과를 비교한 연구들[20-22]이 주를 이루는 반면에 근력개선과 관련된 연구는 미흡한 실정이다.

마우스 유래 근육세포주인 C2C12 myoblast는 근육으로 분화되기 전 단계의 단핵 세포로서 호르몬이나 외부자극 등 다양한 전사인자에 의해 다핵의 myotube로 분화되어 근육을 형성하는 것으로 알려져 있으며, 근육세포의 증식이나 분화에 관련한 연구의 주요한 세포 모델로 사용되고 있다[23,24]. 또한 합성 glucocorticoid인 dexamethasone (DEX)은 염증, 알레르기 및 자가 면역질환, 암 등의 치료에 사용되지만, 장시간 투여에 의해 근육량과 관련된 단백질의 분해가 촉진되어 근위축을 유발하고 근감소증과 동일한 근섬유를 감소시키는 것으로 알려져 있으며 이를 C2C12에 처리하여 근위축 관련 연구에서 많이 사용되고 있다[25,26]. 따라서 근감소증과 동일한 근섬유를 감소시키는 DEX를 처리하여 근위축 모델링을 설정하였으며, 식품의약품안전처에서 근력 개선에 도움을 줄 수 있음을 인정받아 개별인정형 기능성 원료로 등록된[27] 오미자 추출물 (제2018-9호)을 사용하여 EMS 항위축 효능의 객관성을 확보하고자 하였다.

본 연구에서는 C2C12 myoblast를 분화시키는 동안 DEX을 처리하여 근위축을 유도하고 EMS를 처리한 C2C12 myotube의 세포 생존율과 myotube diameter, fusion index 측정을 통해 세포 보호 효과를 평가한다. 그리고 단백질 발현량 측정을 통해 작용기전을 구명함으로써 EMS의 근감소증 및 근위축의 예방 및 개선의 효능을 파악하고 이를 통해 건강기능식품 소재로 활용하기 위한 기초적인 데이터를 제공하고자 한다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 효소처리스테비아는 ㈜대평(Sangju, Korea)에서 구매하였고 오미자 추출물(*Schisandra chinensis* Extract, SE)은 개별인정형 기능성 원료로서 ㈜비에스씨(Yongin, Korea)에서 제공받았으며, 두 시료 모두 증류수에 희석하여 실험에 사용하였다. C2C12 세포배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), horse serum (HS), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S), Phosphate-Buffered Saline (PBS) 및 trypsin-EDTA는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였으며, myotube diameter 및 fusion index 측정을 위한 염색에 사용된 Jenner's stain과 Giemsa Stain은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 methanol은 J.T.Baker (Deventer, Holland)에서 구매하여 사용하였다. Western blot 분석에 사용된 1차 항체인 SIRT1 (2028s) 및 p-Akt (9271s), Akt (4685s)는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며, Fbx32 (ab168372)은 abcam (Cambridge, UK)에서, MuRF1 (sc-398608)은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구매하였다. 2차 항체 Anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (HRP)(7074s)와 Anti-mouse IgG-HRP (7076s)는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

C2C12 세포 배양 및 분화

마우스 유래 세포주인 C2C12 myoblast는 American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1772, Manassas, VA, USA)으로부터 분양받아 사용하였다. C2C12 근육 세포는 실험목적에 따라 96-well plate 및 24-well plate, 100 mm petridish에 각각 2.5×10^5 cells/mL로 seeding한 후, FBS (10%) 및 P/S (1%)를 함유한 고농도 포도당 DMEM (89%)에서 80-90% confluence 될 때까지 배양하였다. 그 후 HS

(2%) 및 P/S (1%)를 함유한 고농도 포도당 DMEM (97%)으로 교체하여 C2C12의 분화를 유도하였다.

XTT assay를 이용한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Kerasioti의 방법[28]을 변형하여 진행하였다. 96-well plate에 C2C12 myoblast를 80~90% confluence 될 때까지 배양한 후 분화시킨 myotube에 10, 50, 100 μg/mL의 EMS 및 SE 또는 200 μM DEX를 24시간 동안 처리하고 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) assay kit (WelGene, Seoul, Korea)를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. XTT reagent와 N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate (PMS) reagent를 첨가하고 CO_2 incubator에서 4시간 동안 반응하였다. 그 후 microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 사용해 450 nm와 690 nm에서 흡광도 값을 측정하였으며, 450 nm에서 측정된 흡광도 값에서 690 nm에서 측정된 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포 생존율을 계산하여 세포 보호 효능을 평가하였다.

Jenner-Giemsa 염색 및 fusion index 측정

Jenner-Giemsa 염색 및 fusion index 측정은 Veliça의 방법[29]을 참고하였다. EMS 또는 SE와 DEX를 24시간 처리한 C2C12 myotube plate의 각 well을 PBS로 세척하고 100% methanol로 5분간 고정시킨 뒤 10분간 air dry하였다. 고정 후에 오염되지 않았음을 확인하고 plate를 뚜껑으로 덮어 상온에 보관하였다. Jenner staining solution을 1 mM sodium phosphate buffer (pH 5.6)와 1:3 비율로 희석하여 혼합용액을 만들고 각 well에 혼합용액을 넣고 인큐베이터에서 5분간 반응시키고 증류수로 세척하였다. 그 후 Giemsa stain을 1 mM sodium phosphate buffer (pH 5.6) 1:20 비율로 희석한 혼합용액으로 10분간 상온에서 반응시키고 증류수로 세척하였다. Fusion index를 측정하기 위하여 광학현미경(CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 x200배율로 촬영한 후 Image J software (Image J 1.53k, NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 fusion index를 측정하여 기록하였다. Fusion index의 계산식은 다음과 같다.

$$Fusion\ index(\%) = \frac{Number\ of\ the\ nuclei\ inside\ myotubes}{Total\ number\ of\ nuclei} \times 100$$

Myotube diameter 측정

Jenner-Giemsa 염색법으로 염색된 24-well plate의 C2C12 myotube를 광학현미경(CKX41, Olympus)을 이용하여 x200 배율로 촬영한 후 Image J software (Image J 1.53k, NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 myotube diameter를 측정하여 기록하였다. Myotube diameter의 측정 방법은 well 당 무작위로 4번 촬영하여 저장한 뒤, 50개의 myotube diameter를 기록하고 평균값으로 나타내었다.

Western blot 분석

100 mm plate에서 배양한 C2C12 myotube에 100 μg/mL의 EMS 및 SE의 처리와 200 μM DEX로 근위축을 유도한 후, 세포를 lysis buffer로 용해시키고 4°C에서 12,000×g로 15분간 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 분리된 단백질을 bradford protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량하였다. 그 후 단백질 10 μL을 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에서 전기영동하고, 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)으로 전이시켰다. 비특이적 결합을 억제하기 위하여 5% skim milk 또는 3% bovine serum albumin을 함유한 tris-buffered saline을 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 TBST buffer로 10분간 3회 세척하였으며, 목적 단백질에 대한 1차 항체(SIRT1, p-Akt, Akt, Fbx32, MuRF1)와 membrane을 4°C에서 12시간 반응시키고 3회 세척 후 2차 항체(Anti-rabbit IgG-HRP, Anti-mouse IgG-HRP)를 상온에서 1시간 반응하였다. 그 후 ECL detection reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)와 Chemi Doc image software 5.2.1(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 사용하여 단백질 발현 정도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 최소 3회 반복하여 평균값과 표준편차를 계산하였으며, 결과값은 통계 소프트웨어 IBM SPSS statics (Version 26.0, IBM Corporation, NC, USA)를 이용하여 통계처리하였다. 유의성은 Duncan의 다중 범위 검정(Duncan's multiple range test)을 이용하였다. 실험군의 평균값 간의 유의성은 $P<0.05$ 수준에서 검정하였다. 상관관계는 Pearson의 적률 상관계수(Pearson's correlation coefficient)를 이용하여 유의성을 표기하였다.

Results and Discussion

DEX 유도 근위축 모델링 확립

EMS의 *in vitro* 근력 개선 효과의 확인 및 작용기전의 구명을 위해 근위축 모델을 확립하고자 하였다. 분화시킨 myotube에 DEX를 농도별(25, 50, 100, 200 μM) 및 시간별(1, 3, 6, 12, 24시간)로 처리하여 세포생존율의 변화를 관찰하였다(Fig. 1). C2C12를 분화 기간과 DEX 처리 기간의 합이 6일이 되도록 배양하였다. DEX의 처리 시간 및 농도에 따라서 세포 생존율의 변화를 나타내는 선행연구[30]와 유사하게 DEX의 처리 시간 및 농도에 따라서 유의적으로 C2C12 myoblast의 세포 생존율이 감소하는 것

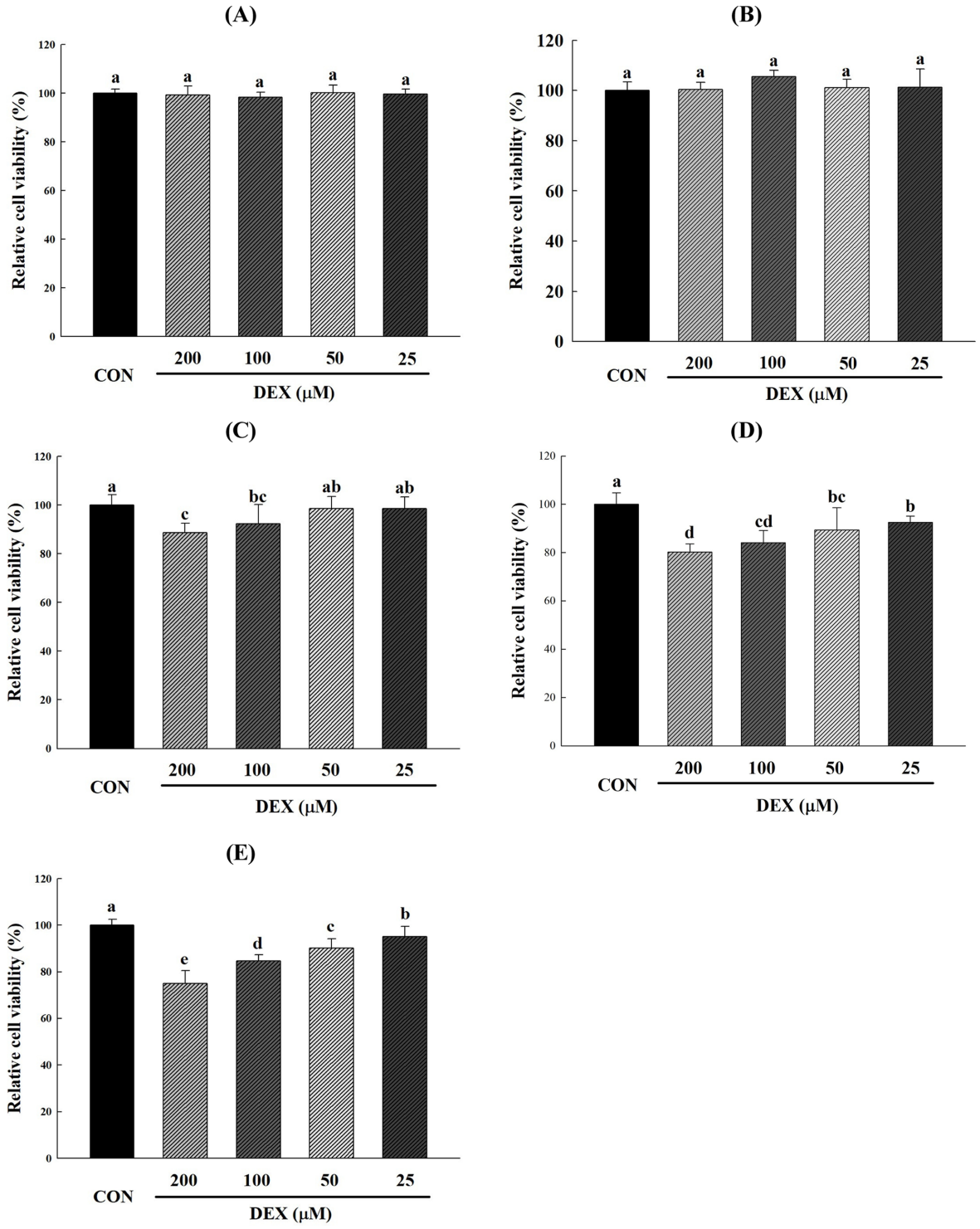

Fig. 1. Effect of DEX on cell viability in C2C12 myotubes. C2C12 was cultured such that the sum of the differentiation period and the DEX treatment period was 6 days (144 h). (A); cell viability of C2C12 myotube treated DEX for 1 h, (B); cell viability of C2C12 myotube treated DEX for 3 h, (C); cell viability of C2C12 myotube treated DEX for 6 h, (D); cell viability of C2C12 myotube treated DEX for 12 h, (E); cell viability of C2C12 myotube treated DEX for 24 h. Results are presented as the mean±SD of triplicates. In each sample, $^{a-e}$superscripts are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. CON: control. DEX: dexamethasone.

으로 관찰되었다. 80% 이상의 C2C12 근육세포의 세포생존율은 근위축을 나타내지 않으며, 80% 이하의 세포생존율은 기능성 소재로부터 근력개선 효능을 평가하기 어려운 조건이므로 70-80% 수준의 C2C12 근육세포의 세포생

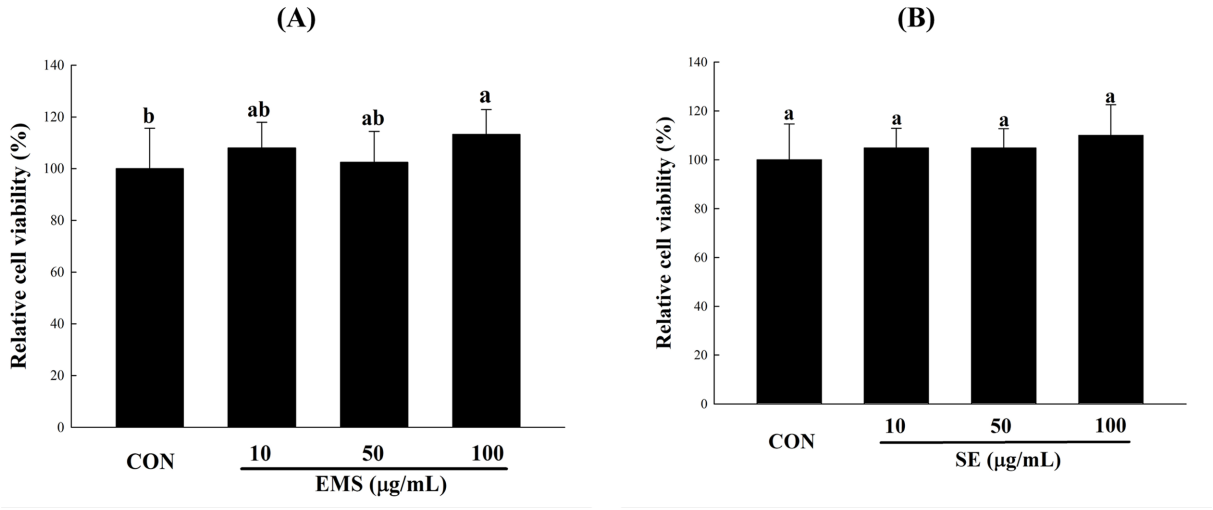

Fig. 2. Effects of EMS (A) and SE (B) on cell viability in C2C12 myotubes. Results are presented as the mean±SD of triplicates. In each sample, [a-b]superscripts are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. CON: control, EMS: enzymatically modified stevia, SE: *Schisandra chinensis* extract.

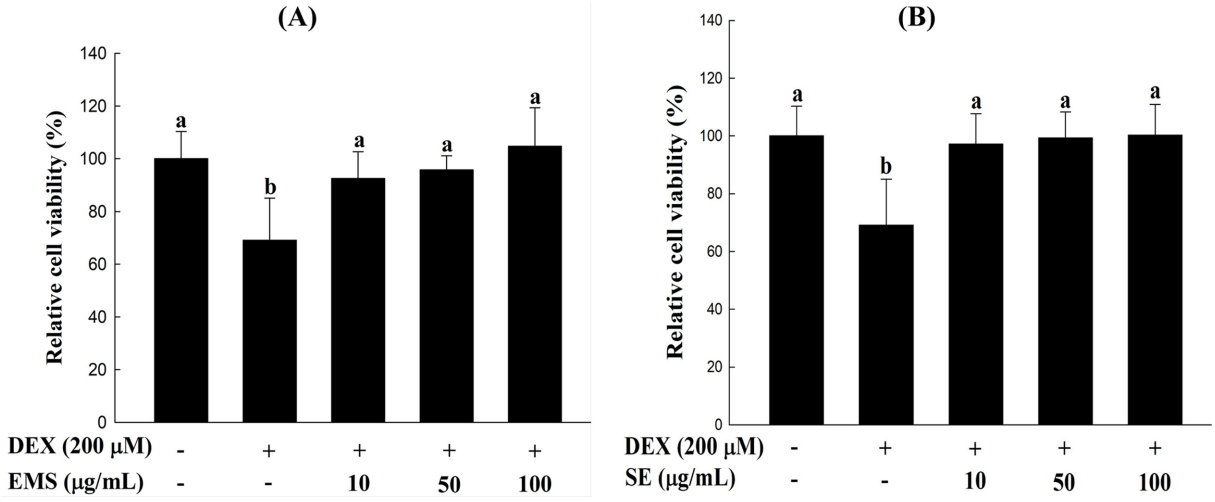

Fig. 3. Protective effect of EMS (A) and SE (B) on cell viability in DEX-treated C2C12 myotubes. Results are presented as the mean±SD of triplicates. In each sample, [a,b]superscripts are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. EMS: enzymatically modified stevia, SE: *Schisandra chinensis* extract.

존율을 최적 근위축 모델로 확립하고자 하였다. DEX 1시간 처리군과 3시간 처리군은 모든 농도의 DEX에서 세포생존율의 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 6시간 처리군과 12시간 처리군에서는 DEX 처리 농도에 따라 유의적인 차이를 보여주었으나 세포생존율이 모두 80% 이상을 나타내었다. 24시간 처리군에서는 200 μM DEX의 세포생존율이 75.0%로 70-80% 범위안에 포함되었다. 따라서 C2C12 seeding시 C2C12 cell 농도는 2.5×10^5 cells/mL, C2C12의 분화 유도 기간은 5일(120시간)로 설정하고 200 μM 농도의 DEX를 24시간 처리하는 조건을 근위축 모델로 확립하였다.

EMS 및 SE의 독성평가

EMS 및 SE의 세포 보호효과 측정 및 작용기전 구명에 앞서 DEX 외에 EMS 및 SE가 C2C12 myoblast 및 myotube에 독성을 미치지 않는 농도를 설정하기 위해 EMS와 SE의 독성을 평가하였다(Fig. 2). 분화시킨 myotube에 10, 50, 100 μg/mL의 EMS 및 10, 50, 100 μg/mL SE를 처리하여 세포생존율의 변화를 측정하였다. 양성대조군으로 사용된 SE는 근력개선 효능을 나타내는 연구가 이미 보고된 바 있다[31]. 독성 평가 결과를 나타낸 Fig. 2를 확인하였을 때, 아무것도 처리하지 않은 그룹과 비교하여 모든 EMS와 SE 처리군에서 통계적으로 유의미한 독성이 없는 것으로 나

타났다. 따라서 EMS 및 SE는 100 μg/mL 농도까지 실험에 사용하였다.

세포 보호 효과 평가

EMS 및 SE의 세포 보호효과를 평가한 결과, DEX만 처리한 실험군을 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교했을 때 세포생존율이 유의적으로 감소하였다. 하지만 EMS 및 SE을 함께 처리하였을 때 모든 농도의 처리군에서 유의적으로 세포생존율이 증가 되었다(Fig. 3). 이는 오미자에서 추출한 Schisandrin C를 근위축을 유도한 C2C12에 처리하여 그 영향을 알아보는 연구[32]에서 산화적 스트레스로 근위축만을 유도한 실험군에서는 세포 생존율이 감소하였지만 Schisandrin C을 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 유의적으로 증가한 결과와 유사한 경향을 보였다. 따라서 EMS는 DEX으로 유도한 근위축 모델에서 protective effect가 있음을 확인하여 근위축을 예방하는 소재로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

Fusion index 측정

근육이 분화할 때는 myoblast로부터 관상형의 기다란 myocyte를 지나 3개 이상의 핵을 가지는 myotube로 분화되며[33], 분화가 진행될수록 myotube는 결합하여 핵 수가

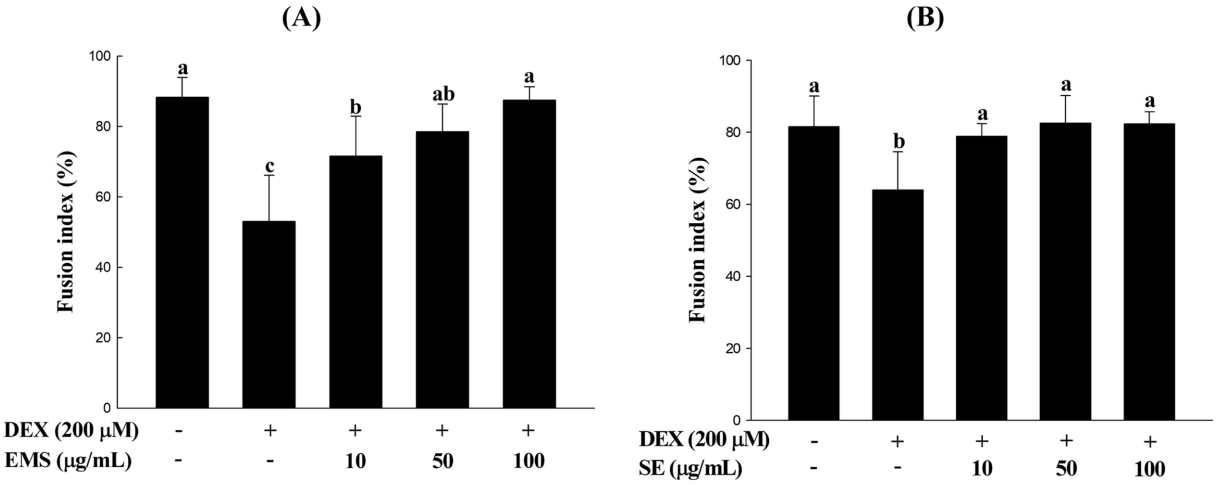

Fig. 4. Effect of EMS (A) and SE (B) on fusion index in DEX-treated C2C12 myotubes. Results are presented as the mean±SD of triplicates. In each sample, [a-c]superscripts are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. DEX: dexamethasone, EMS: enzymatically modified stevia, SE: *Schisandra chinensis* extract.

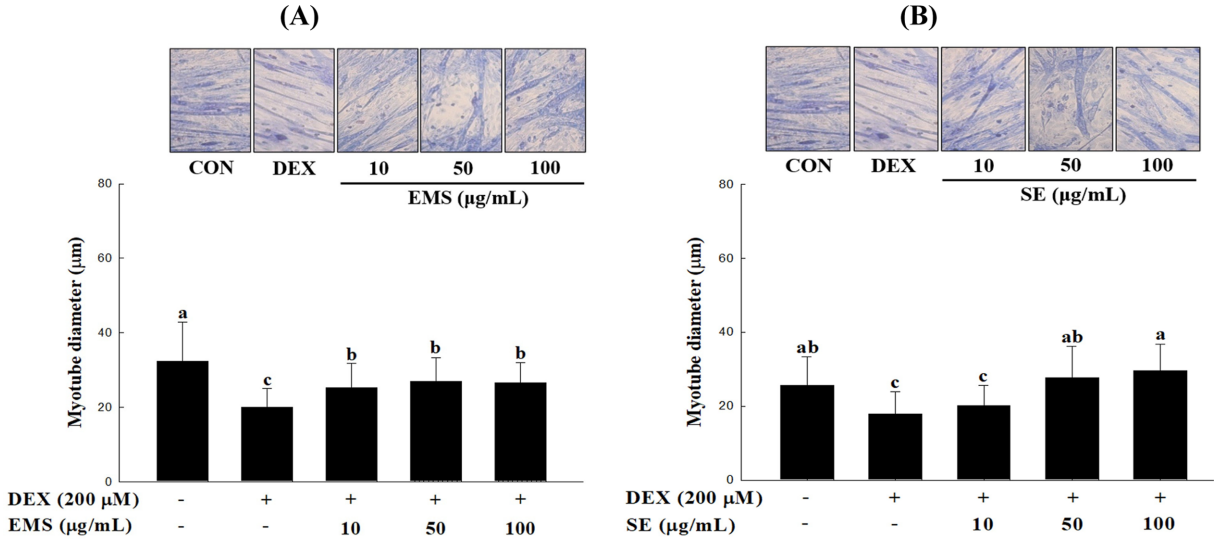

Fig. 5. Effect of EMS (A) and SE (B) on myotube diameter in DEX-treated C2C12 myotubes. Results are presented as the mean±SD of triplicates. In each sample, [a-c]superscripts are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. DEX: dexamethasone, EMS: enzymatically modified stevia, SE: *Schisandra chinensis* extract.

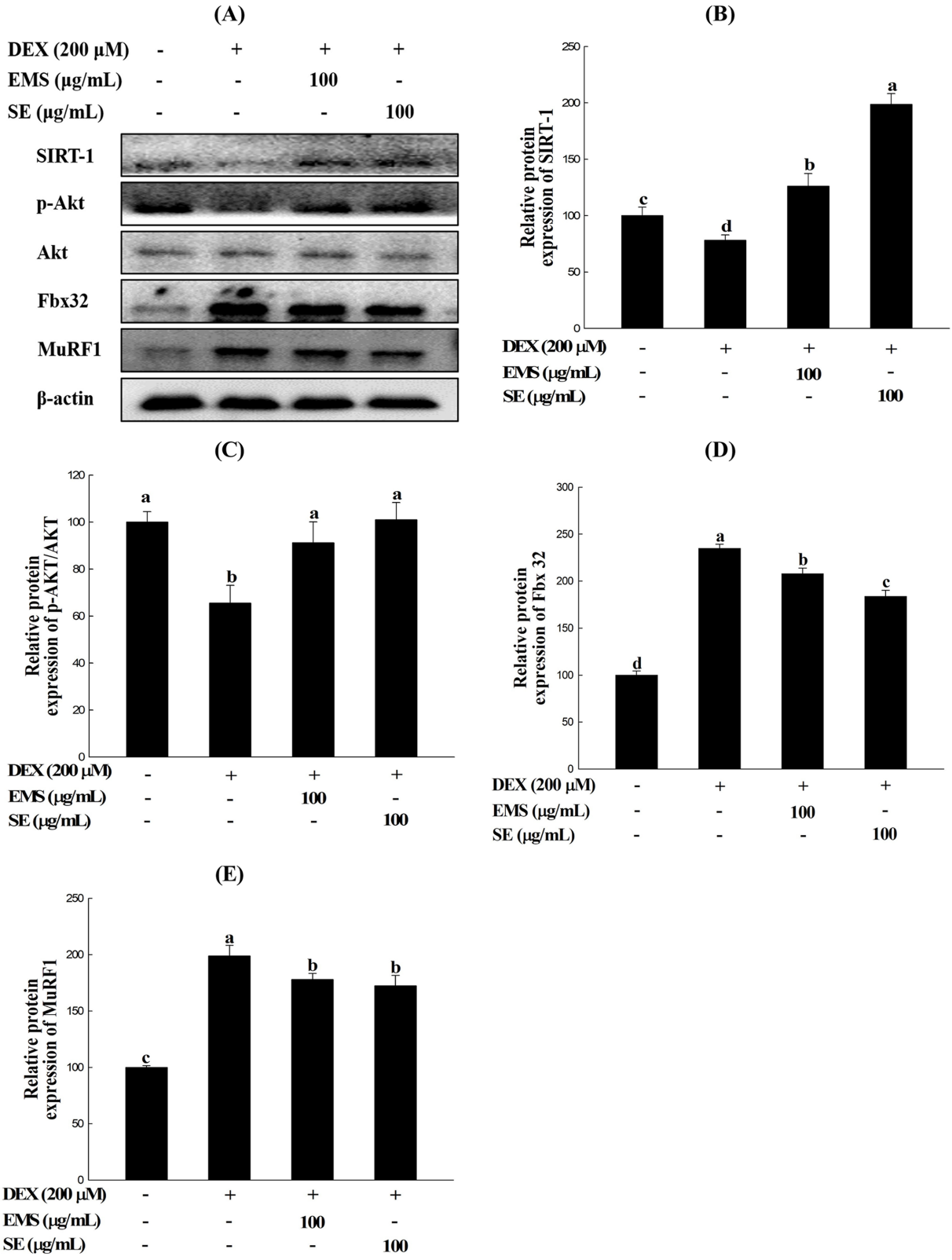

Fig. 6. Effect of EMS and SE on protein expression levels of SIRT1, p-Akt, Akt, Fbx32 and MuRF1 in DEX-treated C2C12 myotubes. EMS(100 μg/mL) and SE(100 μg/mL) were treated for 24 h in DEX-treated C2C12 myotube, respectively. and protein expression levels were determined using western blot assay. (A); protein band, (B); expression levels of SIRT1, (C); expression levels of p-Akt/Akt, (D); expression levels of Fbx32, (E); expression levels of MuRF1. Results are presented as the mean±SD of triplicates. In each sample, $^{a-d}$superscripts are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. DEX: dexamethasone, EMS: enzymatically modified stevia, SE: *Schisandra chinensis* extract.

증가하게 된다[27]. 따라서 myotube의 핵을 Jenner-Giemsa 염색법으로 염색하고 촬영한 사진의 myotube 내부 핵 수와 전체적인 핵 수를 비교하여 fusion index로 나타내었다(Fig. 4). DEX의 처리 농도가 진해질수록 유의하게 fusion index가 감소한다고 보고한 연구[34]처럼 DEX만 처리한 실험군과 아무것도 처리하지 않은 대조군을 비교했을 때 DEX만 처리한 실험군의 fusion index가 유의적으로 감소하였음을 확인하였다. 하지만 이는 EMS 또는 SE 각각의 모든 처리군에서 DEX만 처리한 실험군과 비교하여 유의적으로 fusion index가 증가되었다. 이를 통해서 EMS 및 SE의 myotube 형성 효능이 있음을 확인하였다.

Myotube diameter 측정

myoblast에서 myotube로 분화가 유발될 경우에 세포 사이의 융합에 따라 근섬유의 수가 증가하고 근섬유의 지름이 두꺼워지는 특징이 나타나고 근위축이 유발될 경우에는 근육단백질 분해를 통해 근섬유의 수와 지름이 감소함으로서 전체적으로 근육량이 감소하는 특징이 나타나게 된다[29]. 또한 C2C12 myotube는 분화가 진행될수록 결합하기 때문에 분화 정도의 지표로 myotube diamater를 설정할 수 있다[35]. 근위축을 유도한 C2C12 myotube에서 EMS와 SE가 myotube diameter에 미치는 영향은 Fig. 5와 같다. DEX만 처리한 실험군과 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교했을 때 myotube diameter가 유의적으로 감소함을 확인하였다. 그러나 EMS 또는 SE를 처리하였을 때 모든 처리군에서 유의적으로 myotube diameter가 증가 되었다. 이는 DEX 유도 근위축 모델에서 스피루리나 단백질 가수분해물을 처리한 실험군의 myotube diameter가 DEX만 처리한 실험군과 비교하여 유의하게 증가한 연구결과[34]와 유사하게 EMS 및 SE의 myotube 형성 효능 있음을 확인하였다.

단백질 발현량 측정

EMS의 근력개선 작용기전을 확립하고자 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원에서 제시한 '근력 관련' 편의 건강기능식품 기능성 평가 가이드[36]에 따라 근육 세포사멸(Apoptosis) 억제, 근육 단백질 합성증가, 근육 단백질 분해 억제에 따른 단백질 발현을 확인하고자 하였다.

미토콘드리아 DNA의 산화적 손상에 의해 야기되는 미토콘드리아 기능부전(mitochondrial dysfunction)은 노화 과정을 촉진하는 주요 원인이며 미토콘드리아의 기능부전과 산화적 스트레스는 세포사멸(apoptosis)을 유발한다고 보고되고 있고, 미토콘드리아는 세포사멸을 유발하는 주요 장소로서 세포사멸과 관련된 인자인 SIRT1이 발현된다고 알려져 있다[37].

노화된 골격근에서 억제된 자가포식작용이 단백질 전환의 손상으로 인해 변형된 단백질 축적으로 결국 항상성과 생존 유지에 요구되는 다양한 생물학적인 경로의 항상성을 저하시켜 근섬유의 변성과 약화의 원인이 되어 노화 촉진 작용에 관여하게 되며, 인슐린과 IGF-1은 class I PI3K와 Akt signal을 활성화시켜서 mTOR를 조절함으로써 자가포식을 조절한다[38].

MuRF1은 근육 단백질을 분해하는 신호전달 물질로서, MuRF1이 활성화되면 근육위축이 발생되는 것으로 알려져 있으며[39], Fbx32 (Atrogin-1)는 근육위축의 초기과정에서 유도되어 근육량의 감소에 선행하여 증가하는 것으로 알려져 있고[40], 따라서 DEX이 유발하는 근위축 모델에서 EMS와 SE가 mitochondria biogenesis에 관련된 biomarker인 SIRT1 과 근단백질 합성 자극과 관련된 biomarker인 Akt, p-AKT, 근단백질 분해에 관여하는 ubiquitin-proteasome pathway와 관련된 biomarker인 Fbx32, MuRF1의 단백질 발현에 어떠한 영향을 미치는 지를 확인하였다(Fig. 6).

먼저 mitochondria biogenesis에 관련된 biomarker인 SIRT1의 단백질 발현량을 측정한 결과로, DEX에 의해 SIRT1의 발현량이 감소되었음을 protein 레벨에서 확인하였으며, EMS와 SE 모두 감소된 SIRT1의 발현량을 유의적으로 증가시켰다(Fig. 6A&B).

근단백질합성 자극과 관련된 biomarker인 Akt, p-Akt의 발현량을 측정한 결과, DEX에 의해 p-Akt/Akt의 단백질 발현량이 감소 됨을 protein 레벨에서 확인하였으며, EMS 및 SE 모두 SIRT1의 발현량과 유사하게 DEX로 감소된 p-Akt/Akt의 발현량을 유의적으로 증가시켰다(Fig. 6A&C).

근단백질 분해에 관여하는 ubiquitin-proteasome pathway와 관련된 biomarker인 Fbx32, MuRF1의 단백질 발현량의 결과는 DEX를 처리하였을 때, 발현량이 증가하였음을 protein 레벨에서 확인할 수 있었으며 EMS와 SE 모두 SIRT1 및 p-Akt/Akt의 발현량 경향과는 다르게 DEX로 증가된 발현량을 유의하게 감소시켰음을 보여주었다(Fig. 6A&D,E).

EMS는 DEX를 처리한 근위축 모델에서 근육세포 분해 관련 단백질의 발현을 감소시켰으며, 그와 반대로 근력 강화 및 합성과 관련된 단백질의 발현량을 증가시켰다. 이러한 결과는 EMS가 건강기능식품의 주요 소재로 활용될 수 있으며, *in vivo* 동물 모델에서 활용될 가능성이 있다고 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 중소벤처기업부와 중소기업기술정보진흥원의 "지역특화산업육성+(R&D, S3272010)"사업과 "중소기업기술개발지원사업(S3241314)" 그리고 정부(과학기술정보통신부)와 교육부, 한국연구재단의 재원으로 교육부 및 한국연구재단을 통한 "4단계 두뇌한국21 사업(4단계 BK21 사업)(4299990913942)"과 "기초연구사업(2021R1A6A1A03044242)"의 연구로 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 EMS를 건강기능식품으로 활용하기 위한 기초적인 데이터를 제공하기 위해 EMS가 DEX으로 유도한 근위축 C2C12 모델에서 미치는 보호 효과를 조사하고자 하였다. DEX를 처리한 근위축 모델을 확립하였다. 그리고 DEX으로 유도한 근위축 C2C12 myotube에 24시간 동안 10, 50, 100 μg/mL 농도의 EMS를 처리하였으며, C2C12에 EMS와 DEX를 처리하여 XTT 세포독성 테스트와 myotube 형성 효능(myotube diameter와 fusion index) 측정, 단백질 발현량 분석을 수행하였다. 또한, 기능성을 입증받은 SE를 positive control로 사용하였다. EMS의 세포독성 평가 결과, 100 μg/mL 농도까지 유의한 독성이 없는 것을 확인하였다. C2C12 myotube에서 EMS는 DEX만 처리한 실험군과 비교하여 모든 농도에서 유의적으로 세포 보호 효능이 있음을 확인하였다. 또한 fusion index와 myotube diameter를 측정하여 DEX만 처리한 실험군과 비교하였을 때, EMS의 myotube 형성 효능을 확인하였다. EMS는 근육세포 분해 관련 단백질인 Fbx32와 MuRF1의 발현을 감소시키고, 그와 반대로 근력 강화 및 합성과 관련된 단백질인 SIRT1과 p-Akt/Akt의 발현은 증가시켰다. 이러한 연구결과는 EMS가 건강기능식품 개발의 성분으로 활용될 수 있으며, *in vivo* 동물 모델에서도 활용 가능할 것으로 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Geon Oh https://orcid.org/0000-0003-2808-5467
Sun-Il Choi https://orcid.org/0000-0001-7400-6286
Xionggao Han https://orcid.org/0000-0002-5057-7401
Xiao Men https://orcid.org/0000-0003-1101-5796
Se-Jeong Lee https://orcid.org/0000-0001-8738-7559
Ji-Hyun Im https://orcid.org/0000-0001-7068-0564
Ho-Seong Lee https://orcid.org/0009-0001-6335-9542
Hyeong-Dong Jung https://orcid.org/0009-0007-4929-2365
Moon Jin Ra https://orcid.org/0000-0001-8148-2037
Min Hee Kwon https://orcid.org/0000-0003-3307-8608
Ok-Hwan Lee https://orcid.org/0000-0001-6855-3136

References

1. Jang, H.C., Recent progression in sarcopenia and sarcopenic obesity. *J. Korean Geriatr. Soc.*, **15**, 1-7 (2011).
2. Park, S.W., Sarcopenia of the old age. *J. Korean Soc. Endocrinol.*, **22**, 1-7 (2007).
3. Hernández-Ono, A., Monter-Carreola, G., Zamora-González, J., Cardoso-Saldaña, G., Posadas-Sánchez, R., Torres-Tamayo, M., Posadas-Romero, C., Association of visceral fat with coronary risk factors in a population-based sample of postmenopausal women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.,* **26**, 33-39 (2002).
4. Pi-Sunyer, F.X., The epidemiology of central fat distribution in relation to disease. *Nutr. Rev.*, **62**, S120-S126 (2004).
5. Roubenoff, R. Sarcopenic obesity: the confluence of two epidemics. *Obes. Res.*, **12**, 887-888 (2004).
6. Zamboni, M., Mazzali, G., Fantin, F., Rossi, A., Francesco V.D., Sarcopenic obesity: a new category of obesity in the elderly. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **18**, 388-395 (2008).
7. Cao, L., Morley, J.E., Sarcopenia is recognized as an independent condition by an international classification of disease, tenth revision, clinical modification (ICD-10-CM) code. *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, 17, 675-677 (2016).
8. Park, H.Y., Choi, H.D., Kim, Y.S., Research trend in sugar alternatives. *Food Sci. Ind.*, **49**, 40-54 (2016).
9. Ha, K., Joung, H., Song, Y.J., Intake of dietary sugar and its influence on chronic disease in the Korean population. *Food Sci. Ind.*, **49**, 2-11 (2016).
10. Han, S.Y., Kim T.H., The effect of food consumption value on attitude towards alternative sweetened foods and purchase intention: focusing on the moderating effect of subjective body image. *Culi. Sci. & Hos. Res.*, **28**, 124-135 (2022).
11. Kim, Y.H., Kim, S.B., Kim, S.J., Park, S.W., Market and trend of alternative sweeteners. *Food Sci. Ind*., **49**, 17-28 (2016).
12. Gardner, C., Wylie-Rosett, J., Gidding, S.S., Steffen, L.M., Johnson, R.K., Reader, D., Lichtenstein A.H., Nonnutritive sweeteners: current use and health perspectives: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Diabetes Care,* **35**, 1798-1808 (2012).
13. Ju, D.L., The efficacy and safety of non-nutritive sweeteners. *J. Korean Diabetes*, **16**, 281-286 (2015).
14. Wiebe, N., Padwal, R., Field, C., Marks, S., Jacobs, R., Tonelli, M., A systematic review on the effect of sweeteners on glycemic response and clinically relevant outcomes. *BMC Med.*, **9**, 1-18 (2011).
15. Gougeon, R., Spidel, M., Lee, K., Field, C.J., Canadian diabetes association national nutrition committee technical review: non-nutritive intense sweeteners in diabetes management. *Can. J. Diabetes*, **28**, 385-399 (2004).
16. Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., Nathan, D.M., Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med.*, **346**, 393-403 (2002).
17. Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Eriksson, J.G., Valle, T.T., Hamalainen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Rastas, M., Salminen, V., Uusitupa, M., Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose

tolerance. *N. Engl. J. Med.*, **344**, 1343-1350 (2001).
18. Vermunt, S.H., Pasman, W.J., Schaafsma, G., Kardinaal, A.F., Effects of sugar intake on body weight: a review. *Obes. Rev.*, **4**, 91-99 (2003).
19. Kim, J.E., Kwon, E.Y., Han, Y., Allulose attenuated age-associated sarcopenia via regulating IGF-1 and myostatin in aged mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, **66**, 2100549 (2022).
20. Beak, S.E., Sensory properties of low calorie *Ssanhwa* beverages containing sweetener(l);relative sweetness and sensory properties of *Ssanghwa* beverages sweetened with glucosyl stevia, acesulfame-K and aspartame. *Korean J. Food & Nutr.,* **21**, 190-196 (2008).
21. Ryu, D., Kim, D.B., Lee, K.H., Son D.S., Surh, J., Influences of sugar substitutes on the physicochemical and sensory properties and hardness of *Baksulgi* during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**, 568-576 (2012).
22. Kim, H.A., Lee K.H., Quality characteristics of *Yanggeng* made with various sweeteners. *J. East Asian Soc. Dietary Life*, **22**, 818-825 (2012).
23. Kim, H.J., Lee W.J., Effects of dietary polyphenol (–)-epigallocatechin 3-gallate on the differentiation of mouse C2C12 myoblasts. *J. Life Sci.*, **17**, 420-426 (2007).
24. Jung, H.J., Kim, S., Park, J., Kim K.H., Kim K., Jun W., Antioxidant activities and protective effects of hot water extract from *Curcuma longa* L. on oxidative stress-induced C2C12 myoblasts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **46**, 1408-1413 (2017).
25. Menconi, M., Gonnella, P., Petkova, V., Lecker, S., Hasselgren, P.O., Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12 myotubes. *J. Cell Biochem*., **105**, 353-364 (2008).
26. Jeon, S.K., Kim, O.H., Park, S.M., Lee, J.H., Park, S.D., Effects of glucoraphanin in dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy in vitro model. *Herb. Formula Sci.*, **28**, 29-39 (2020).
27. MFDS, (2023, March 1). Information by ingredient of health functional food. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr:443/portal/board/boardDetail.do?menu_no=2660&menu_grp=MENU_NEW01&bbs_no=bbs987&ntctxt_no=1070097
28. Kerasioti, E., Stagos, D., Priftis, A., Aivazidis, S., Tsatsakis, A. M., Hayes, A. W., Kouretas, D., Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem.*, **155**, 271-278 (2014).
29. Veliça, P., Bunce, C.M., A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. *Muscle Ner.*, **44**, 366-370 (2011).
30. Park, C., Jeong, J.W., Choi, Y.H., Induction of muscle atrophy by dexamethasone and hydrogen peroxide in differentiated C2C12 myotubes. *J. Life Sci*., **27**, 1479-1485 (2017).
31. Cho, Y.H., Lee, S.Y., Lee, C.H., Park, J.H., So, Y.S., Effect of *Schisandra chinensis Baillon* extracts and regular low-intensity exercise on muscle strength and mass in older adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, **113**, 1440-1446 (2021).
32. Kim, J.S., Yi, H.K., Schisandrin C enhances mitochondrial biogenesis and autophagy in C2C12 skeletal muscle cells: potential involvement of anti-oxidative mechanisms. *NS. Arch. Pharmacol.*, **391**, 197-206 (2018).
33. Murphy, D.P., Nicholson, T., Jones, S.W., O'Leary, M.F., MyoCount: a software tool for the automated quantification of myotube surface area and nuclear fusion index. *Wellcome Open Res.*, **4**, 6 (2019).
34. Kim, J., Park, M.Y., Kim, H.K., Park, Y., Whang, K.Y., Cortisone and dexamethasone inhibit myogenesis by modulating the AKT/mTOR signaling pathway in C2C12. *Biosci. Biotech. Bioch*., **80**, 2093-2099 (2016).
35. Lee, C.W., Chang, Y.B., Park, C.W., Han, S.H., Suh, H.J., Ahn, Y., Protein hydrolysate from *Spirulina platensis* prevents dexamethasone-induced muscle atrophy via Akt/Foxo3 signaling in C2C12 myotubes. *Mar. Drugs*, **20**, 365 (2022).
36. MFDS, (2023, March 1). Health functional food functional evaluation guide 'Related to muscle strength'. Retrieved from https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/view.do?seq=14654&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=15
37. Lin, M.T., Beal, M.F., Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, **443**, 787-795 (2006).
38. Vainshtein, A., Grumati, P., Sandri, M., Bonaldo, P., Skeletal muscle, autophagy, and physical activity: the ménage à trois of metabolic regulation in health and disease. *J. Mol. Med.*, **92**, 127-137 (2014).
39. Foletta, V.C., White, L.J., Larsen, A.E., Léger, B., Russell, A.P., The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy*, **461**, 325-335 (2011).
40. Zeng, Z., Liang, J., Wu, L., Zhang, H., Lv, J., Chen, N., Exercise-induced autophagy suppresses sarcopenia through Akt/mTOR and Akt/FoxO3a signal pathways and AMPK-mediated mitochondrial quality control. *Front. Physiol.,* **11**, 583478 (2020).