

Ameliorative Effects of Soybean Leaf Extract on Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy in C2C12 Myotubes and a C57BL/6 Mouse Model

Hye Young Choi¹, Young-Sool Hah², Yeong Ho Ji³, Jun Young Ha⁴, Hwan Hee Bae⁴, Dong Yeol Lee⁵, Won Min Jeong⁵, Dong Kyu Jeong⁵, Jun-Il Yoo³ and Sang Gon Kim^{5*}

¹Department of Radiology, Gyeongsang National University Hospital and Institute of Medical Science, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52727, Korea

²Biomedical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital and Institute of Medical Science, Jinju 52727, Korea

³Department of Orthopaedic Surgery, Inha University Hospital, Incheon 22332, Korea

⁴Department of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16429, Korea

⁵Gyeongnam Anti-Aging Research Institute, Sancheong 52215, Korea

Received November 23, 2023 /Revised December 14, 2023 /Accepted December 18, 2023

Sarcopenia, a condition characterized by the insidious loss of skeletal muscle mass and strength, represents a significant and growing healthcare challenge, impacting the mobility and quality of life of aging populations worldwide. This study investigated the therapeutic potential of soybean leaf extract (SL) for dexamethasone (Dexa)-induced muscle atrophy in vitro and in an in vivo model. In vitro experiments showed that SL significantly alleviated Dexa-induced atrophy in C2C12 myotube cells, as evidenced by preserved myotube morphology, density, and size. Moreover, SL treatment significantly reduced the mRNA and protein levels of muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) and muscle atrophy F-box (MAFbx), key factors regulating muscle atrophy. In a Dexa-induced atrophy mouse model, SL administration significantly inhibited Dexa-induced weight loss and muscle wasting, preserving the mass of the gastrocnemius and tibialis anterior muscles. Furthermore, mice treated with SL exhibited significant improvements in muscle function compared to their counterparts suffering from Dexa-induced muscle atrophy, as evidenced by a notable increase in grip strength and extended endurance on treadmill tests. Moreover, SL suppressed the expression of muscle atrophy-related proteins in skeletal muscle, highlighting its protective role against Dexa-induced muscle atrophy. These results suggest that SL has potential as a natural treatment for muscle-wasting conditions, such as sarcopenia.

Key words : Dexamethasone, muscle atrophy, muscle atrophy F-box (MAFbx), muscle RING-finger protein-1 (MuRF1), soybean leaf

서 론

근위축은 노화, 질병, 비활동적 생활 방식 및 글루코코르티코이드의 장기간 사용과 같은 다양한 조건에서 발생하는 복잡한 생리학적 과정이다[6, 10, 22]. 노화에 따른 자연스러운 과정인 근감소증(sarcopenia)은 근육 질량과 기능의 감소를 특징으로 하며, 이는 노인 인구에서 신체적 기능 저하, 독립성 상실, 증가된 사망률 및 의료비 부담과 연관되어 있다[7, 22, 24]. 스테로이드 호르몬인 텍사메

타손(Dexa)은 다양한 임상적 이점에도 불구하고 장기간 사용 시 근위축을 유발하는 부작용이 있으며, 이는 근육 단백질 분해를 증가시켜 근육 손상을 초래한다[19, 25]. 근육의 구조적 무결성과 기능적 보전은 개인의 독립성 및 삶의 질을 유지하는 데 필수적이다.

근육량의 감소는 근감소증(sarcopenia)과 노약(frailty)과 같은 증상을 유발하는 주요한 원인으로, 특히 노화 과정과 밀접한 관련이 있다[27]. 이러한 근육량 감소의 메커니즘은 아직 완전히 규명되지 않았으나, 미토콘드리아 기능 장애, 인슐린 저항성, 만성 염증, 산화 스트레스의 증가, 신경근 손상, 그리고 지방 조직의 침윤과 같은 다양한 생리적 변화가 근감소의 주요 원인으로 보고되었다[4, 8, 13, 14, 20, 21]. 또한, 노화와 연관된 만성질환들이 이러한 근육량 감소를 촉진시키며, 이 과정에서 E3 유비퀴틴 리가제인 MuRF1 및 MAFbx는 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 활성화하여 근위축에서 중추적인 역할을 하며, 이는 근육 섬유의 단백질 분해를 촉진하여 근육 소모를 유발한다[1,

*Corresponding author

Tel : +82-82-55-970-1110, Fax : +82-55-974-1067

E-mail : sen600@hanmail.net

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.

9]. 따라서 이들의 활성을 억제하는 것이 근육량을 유지하고 근감소증의 진행을 늦추는 데 도움이 될 수 있다.

근위축에 대한 치료법 개발은 많은 연구에서 집중적으로 다루어져 왔으며, 최근의 연구는 특히 천연 물질의 치료 잠재력에 주목하고 있다. 콩잎 추출물(Soybean Leaf Extracts, SL)은 항산화, 항염, 항암 등의 다양한 생리활성 효과가 있는 것으로 알려져 있다[17, 18]. SL의 이러한 생물학적 활성은 근육 섬유의 보호 및 근위축 조절 기전에서의 역할을 암시한다. 그러나 SL이 근위축과 관련된 분자 경로에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 미비한 상태이다.

근위축의 분자적 메커니즘을 이해하는 것은 치료적 중재를 위한 타겟 발굴에 중요하다. 본 연구는 SL의 근위축에 대한 치료적 효과와 관련된 분자적 타겟을 규명하고, 이를 통해 근위축 관련 질환의 치료 전략을 제시하고자 한다. 근위축 억제 효능을 평가하기 위하여 덱사메타손으로 유도된 근위축 세포 모델에서 근위축 억제 효과를 조사하였다. 또한, 덱사메타손으로 유도된 근위축 마우스 모델에서 근위축에 대한 SL의 억제 효능을 평가하고, 그 기전을 연구함으로써 SL의 근육 소모와 관련된 질환의 자연 치료제로서의 잠재력을 평가하는 데 기초를 마련할 것이다.

재료 및 방법

콩잎 추출물(Soybean leaf extracts, SL) 제조

콩잎 추출물(Soybean Leaf Extracts, SL)은 표준화된 방법에 따라 제조되었다. 건조한 콩잎 200 g을 정제수 5 L에 첨가하고, 이 혼합물을 95-100°C에서 60분 동안 가열하여 추출하였다. 추출물은 상온에서 냉각된 후, 200메쉬 크기의 여과기를 사용하여 첫 번째 여과 과정을 거쳤으며, 여과된 액체는 5,000 × rpm에서 10분간 원심 분리되어 상등액을 분리하였고, 상등액은 진공회전증발농축기(EYELA, JAPAN)를 이용하여 60°C에서 농축되었다. 농축된 추출물은 90°C에서 20분간 살균 처리한 후 동결 건조하였다. 최종적으로, 건조된 콩잎 추출물은 60메쉬 크기로 분쇄하여 실험에 사용하기 위해 준비되었다.

세포 배양, 근관세포 분화 및 근위축(atrophy) 유도

마우스 유래 근아세포(myoblast)인 C2C12 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1772; Manassas, VA, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. C2C12 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)에 10%(v/v) Fetal Bovine Serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Inc.)과 1% penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Inc.)을 첨가한 성장 배지(growth medium, GM)에서 배양되었

다. 세포는 습윤 인큐베이터에서 37°C, 5% CO₂로 유지되었다. 세포는 2일마다 신선한 배지로 교체되었고, 80-90% confluent 상태가 되면 계대배양하여 실험에 사용하였다.

C2C12 근아세포는 80-90%의 밀도에 도달하면 GM을 2% horse serum (HS; Thermo Fisher Scientific, Inc.)으로 구성된 분화 배지(differentiation medium, DM)로 교체하여 근관세포로의 분화를 시작하였다. 세포는 DM을 2일마다 교체하며 6일간 근관세포(myotube)로 분화를 유도하였다.

근위축 유도를 위해, 6일간 분화된 성숙한 근섬유에 1 μM 덱사메타손과 SL을 48시간 처리하여 단백질 분해 경로를 활성화시켜 위축을 모방하였다. 처리 후 세포는 형태학적 변화를 분석하였고, 근위축의 마커인 MuRF1과 MAFbx의 발현을 웨스턴 블로팅과 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)을 통해 평가하여 근위축 상태의 유도를 확인하였다.

세포 생존율 측정

C2C12 세포는 24-well 플레이트에 5×10⁴ cell/well의 밀도로 분주하였다. 세포가 부착된 후, SL을 0, 50, 100, 200, 500, 1,000 μg/ml의 농도로 처리하였다. 일정 시간 경과 후 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 사용하여 세포 생존율을 평가하였다. 각 웰에 CCK-8 용액 10 μl를 추가한 후, 37°C에서 1시간 동안 추가로 배양하고, 생성된 formazan의 흡광도를 450 nm에서 microplate reader (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 생존율은 처리군의 흡광도를 대조군의 흡광도로 나눈 값에 100을 곱하여 백분율로 나타내었다.

May-Grunwald 및 Giemsa 염색

분화된 근섬유 세포는 인산 완충 식염수(PBS)로 세척하고 100% 메탄올로 고정하였다. 세포는 인산염 완충액(1 mM NaH₂PO₄·H₂O 및 1 mM Na₂HPO₄, pH 6.0)에 1:3으로 희석한 May-Grunwald 용액으로 5분 동안 염색하였다. 증류수로 잠시 헹군 후, 세포는 증류수에 1:10으로 희석한 Giemsa 용액으로 10분 동안 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 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)

C2C12 근관세포는 차가운 PBS로 두 번 세척하고 TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA는 iScript cDNA 합성 키

트(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 역전사하였다. mRNA 발현은 TaqMan 분석을 사용하여 ViiATM7 Real-Time PCR 시스템(Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, USA)으로 평가하였다. 증폭 설정은 다음과 같다: 초기 변성은 95°C에서 10분 동안 수행한 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초의 40주기로 PCR을 수행하였다. MAFbx (Mm00499523_m1; Applied Biosystems Inc.)와 MuRF1 (Mm01185221_m1; Applied Biosystem Inc.) 및 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Mm99999915_g1; Applied Biosystem Inc.)에 대한 primer와 probe를 사용하였다.

웨스턴 블롯

준비된 세포와 마우스 근육 조직은 인산 완충 식염수 (PBS)로 세척하고 단백질 분해효소 억제제(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)가 첨가된 RIPA 버퍼(10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)를 사용하여 용해하였다. 초음파 분쇄기를 이용하여 균질화한 후 4°C에서 15분 동안 13,000 × g로 원심 분리한 후 단백질 농도는 BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 결정하였다. 동일한 양의 단백질은 4× laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories)와 혼합하여 끓인 다음, 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동하고 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 5% skim milk (Difco, Detroit, MI, USA)가 첨가된 Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20 (TBST) 완충액으로 1시간 실온에서 blocking 하고, MuRF1 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), MAFbx (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 및 β-actin (Sigma-Adrich, St Louis, MO, USA)을 포함한 일차 항체와 함께 배양하였다. 하룻밤 배양 후, 막은 TBST로 세척하고 퍼옥시다아제 결합 이차 항체와 함께 배양하였다. 단백질 밴드는 Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 시각화 하였고 이미지는 ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories)을 사용하여 캡처하였다.

텍사메타손-유도 근위축 마우스 모델

본 연구는 경상대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (GNU-230526-M0104) 하에 수행되었으며, 실험에 사용된 6주령 수컷 C57BL/6 마우스는 (주)코아텍(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 마우스들은 24±2°C의 온도, 40~60%의 상대습도, 150-300 lux의 조도를 갖춘 환경에서 12시간 간격의 명암 주기를 유지하며 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용되었다. 실험군은 정상군(Control), 텍사메타손 처리 대조군(Dexa), 그리고 텍사메타손과 SL (250, 500 mg/kg)를 병용 처리한 실험군(D + SL 250, D + SL 500) 네 그룹으

로 나누었다. 근위축 유도를 위해 매일 오전 10~11시 사이에 텍사메타손 10 mg/kg을 3주간 매일 복강에 투여 하였다. SL 투여군은 텍사메타손 투여 1주일 전부터 실험 종료일까지 250 mg/kg과 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

실험 종료 시점에 안락사 시킨 후, 대조군과 실험군 마우스로부터 전경골근(tibialis anterior muscle)과 비복근(gastrocnemius muscle)을 채취하고, 이를 동결절편용 포매제인 OCT compound (Lab-Tek; Miles Laboratories, Inc., Naperville, IL, USA)에 포매하여 급속 냉동시켰다. 이후, 냉동절편기(Leica CM 1950; Heidelberg, Germany)를 사용하여 5 μm 두께의 조직 슬라이드를 준비했다. Wheat germ agglutinin (W11261; ThermoFisher Scientific Inc.)에 결합된 Alexa Fluor488 형광 표지 단백질로 4°C에서 밤새 염색한 뒤, 형광현미경(Nikon Eclipse NI DSRi2; Nikon, Tokyo, Japan)을 통해 표본을 관찰하고 이미지를 취득했다. 근섬유의 단면적(cross-sectional area, CSA)은 MyoVision v1.0 소프트웨어를 활용하여 측정하였다[19].

지구력 측정

지구력 측정은 이전 논문의 방법을 참조하여 실시하였다[5]. 트레드밀(Panlab, Barcelona, Spain)을 사용한 러닝 테스트를 실시하여 마우스의 지구력을 평가하였다. 모든 마우스는 3분간 10 cm/sec의 속도로 적응 달리기를 하였고, 이후 4분마다 속도를 4 cm/sec씩 증가시켜 지칠 때까지 달리도록 하였다. 트레드밀의 속도는 소프트웨어 (SeDaCom v2.0.02; Panlab, Barcelona, Spain)를 사용하여 조절하였다. 모든 실험 군에 대해 이 적응 보행 속도와 증속 조건을 동일하게 적용하였으며, 트레드밀의 각 레일 뒤에서는 1.1 mA의 전기 자극을 주어 마우스가 지속적으로 달리도록 유도하였다. 마우스가 지칠 때까지 걸리는 시간(time to exhaustion)을 기록하여, 이를 통해 개체 별 운동 능력을 평가하였다. 지침(exhaustion)이 발생한 시간은 앞다리가 레일에 놓이고 뒷다리는 3초 동안 전기 장치에 놓여있는 시간으로 정의하였다.

악력 측정

모든 실험 동물의 악력 측정은 실험 종료일에 이전 논문을 참조하여 실시하였다[2]. Bioseb Grip Strength Test (BIO-GS3; BIOScience and Experimental Biology, Florida, USA) 장비를 활용하여 실험동물의 악력을 그래프 단위로 측정하였다. 이를 위해 스테인리스 스틸 T-bar를 케이지에 부착하고, 실험동물이 T-bar를 양측 전지로 잡도록 한

다음, 꼬리를 일정한 속도(2 cm/초)로 잡아당겨 악력이 해제될 때까지의 세기를 측정하였다. 각 실험동물에 대해 5번의 시도를 실시하고 이들의 평균값을 도출하여 악력의 강도를 결정하였다.

통계분석

통계 분석은 그래프패드 프리즘 소프트웨어(버전 5.01; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 세포 실험은 세 번 반복 수행하였으며 결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 동물 모델의 결과는 각 그룹의 평균±표준오차로 표시하였다. 그룹 간 차이를 분석하기 위해 one-way ANOVA를 통해 통계적 유의성을 5% 수준에서 분석하였고, 사후검정으로 Mann-Whitney test를 수행하였다.

결과 및 고찰

C2C12 근관세포 근위축에서 SL의 근위축 억제 효과

SL의 텍사메타손 유도 근위축 억제 효능을 연구하기 위해, SL의 적정 농도 범위를 알아보하고자 C2C12 근육세포에 SL을 50-1,000 µg/ml의 다양한 농도로 24시간 동안 처리하여 세포 생존율을 측정하였다. SL 500 µg/ml과 1,000 µg/ml의 농도에서 유의미한 형태학적 변화가 관찰되었으며(Fig. 1A), 세포 생존율도 농도 의존적으로 감소하여 형태학적인 관찰과 일치하는 세포 독성이 나타났다(Fig. 1B). 따라서 이후 실험에서는 SL을 최대 500 µg/ml까지 사용하여 연구를 진행하였다.

다음으로, 텍사메타손 유도 근위축을 가진 근관세포에서 SL의 근위축 억제 효능을 평가하기 위해 분화 및 성숙된 근관세포에 SL을 텍사메타손과 함께 처리한 후,

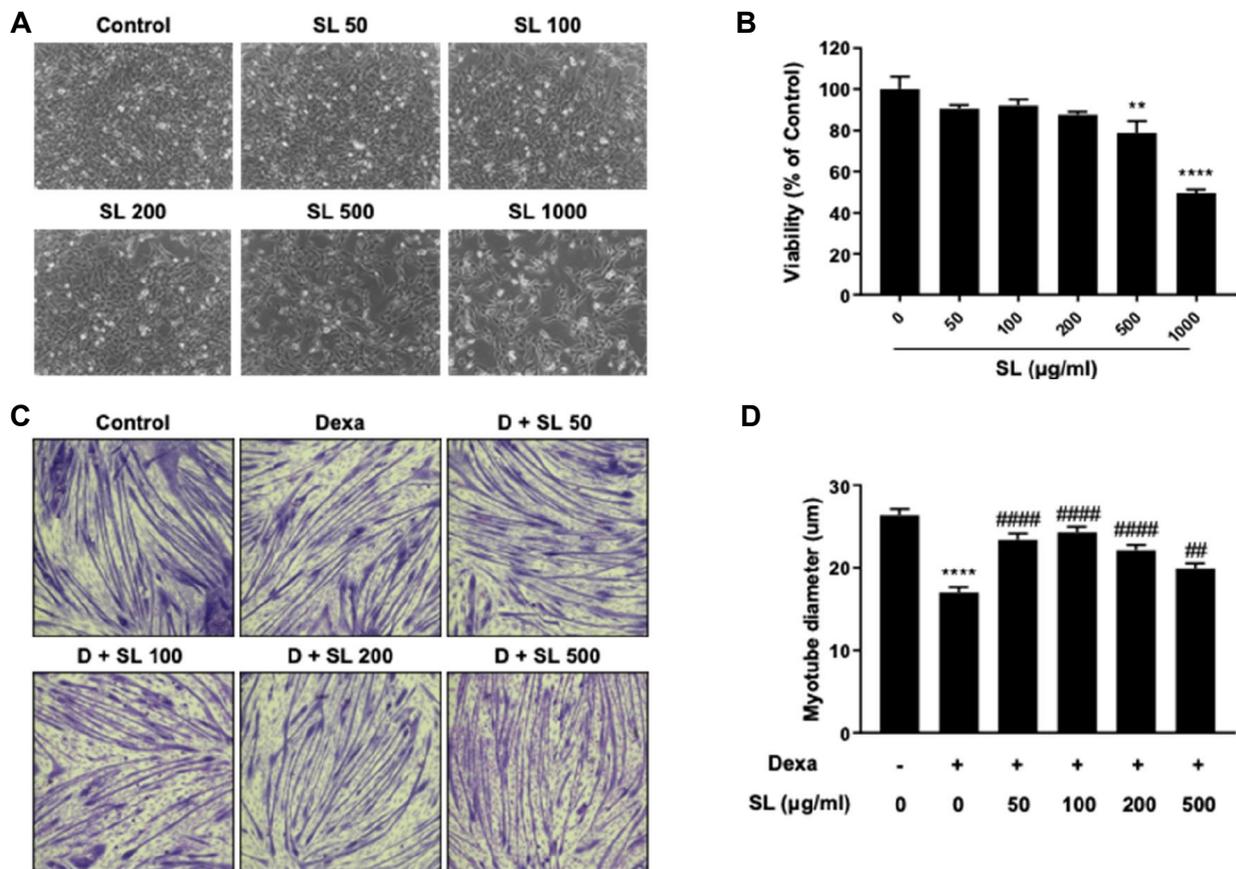


Fig. 1. Mitigating effects of Soybean Leaf Extracts (SL) on Dexamethasone (Dexa)-induced atrophy in C2C12 myotubes. (A) Phase-contrast microscopy captured the morphology of undifferentiated C2C12 myoblasts 24 hr after treatment with varying concentrations of SL (0, 50, 100, 200, 500, and 1,000 µg/ml) at 100× magnification. (B) Cell viability was assessed quantitatively using the CCK-8 assay. (C) Differentiated C2C12 myotubes were treated with SL in the presence or absence of 1 µM Dexa, followed by Giemsa and May-Grunwald staining to evaluate myotube morphology and density. (D) The diameter of myotubes was measured, and the results were graphically presented, highlighting the influence of SL on myotube size and differentiation. Statistical significance is denoted by ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$ vs. the control group; ## $p < 0.01$ and #### $p < 0.0001$ vs. the Dexa-only group.

May-Grunwald와 Giemsa 염색을 수행하여 근관세포의 근관 직경을 측정하였다. SL 처리는 근위축 효과를 감소시키는 것으로 나타났으며, 형태학적인 관찰에서 이러한 경향이 명확하게 관찰되었다(Fig. 1C). 더욱이, 근섬유의 직경 측정 결과, SL이 근섬유의 크기와 분화에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 보여주었다(Fig. 1D). 이러한 결과는 SL 처리가 텍사메타손에 의해 유도된 근위축을 억제함을 보여주며, 근위축 방지에 있어 유망한 천연 물질로서의 가능성을 시사한다.

SL에 의한 MuRF1과 MAFbx 발현 조절

유비퀴틴-프로테아좀 경로는 단백질 분해를 담당하며 근육량 조절에 중요한 역할을 한다. MuRF1과 MAFbx는 이 조절 과정에서 핵심적인 역할을 하는 구성 요소이다 [1]. 이에 SL이 근위축 조절 인자인 MuRF1과 MAFbx의 발현에 미치는 영향을 연구하였다. qPCR 분석 결과, 텍사메타손으로 처리한 C2C12 근관세포에 SL을 다양한 농도로 처리했을 때, MuRF1과 MAFbx의 mRNA 수준이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2A, 2B). 이러한 감소는 SL이 근위축 관련 유전자의 조절에 효과적임을

시사한다. 웨스턴 블롯 분석 결과, SL 처리에 의해 MuRF1과 MAFbx 단백질 수준이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2C). 또한, 밀도계 분석으로 얻은 단백질의 상대적 풍부도를 막대 그래프로 나타낸 결과, 텍사메타손과 SL을 함께 처리한 군에서 단백질 수준이 유의미하게 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2D). 근육 위축 조절인자인 MuRF1과 MAFbx의 mRNA와 단백질 수준 간에 관찰된 불일치는 전사 후 조절 메커니즘에 기인할 수 있다. 또한, 낮은 농도(50 및 100 µg/ml)에 비해 높은 SL 농도(200 및 500 µg/ml)에서 단백질 수치가 유의미한 경향을 보이지 않는 것은 역치 농도에서 최대 효능이 달성되고 그 이상에서는 더 이상의 활성 향상이 관찰되지 않는 포화 효과의 가능성을 시사한다. 이러한 결과는 SL이 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 조절하여 MuRF1과 MAFbx의 발현을 억제함으로써 근위축을 방지하는 가능성 있는 치료적 역할을 수행할 수 있음을 시사한다.

근위축 마우스 모델에서 SL의 근육량 보호 효과

다양한 의학적 상태가 근위축을 초래할 수 있는데, 이는 패혈증, 악액질, 기아, 대사성 산증, 그리고 심각한 인

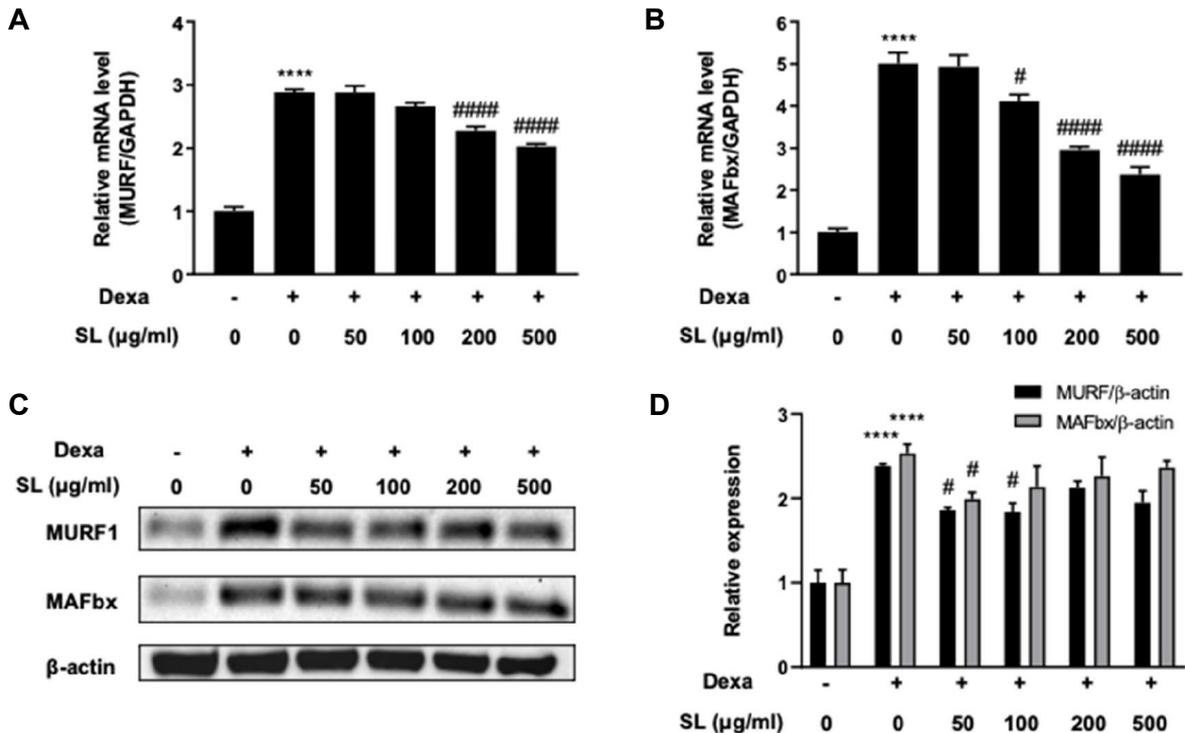


Fig. 2. SL-mediated attenuation of muscle atrophy regulatory proteins. (A-B) The expression levels of MuRF1 and MAFbx, key ubiquitin ligases involved in muscle atrophy, were quantified by qPCR in C2C12 myotubes treated with SL in the presence of Dexa. Results were normalized to a reference gene and are shown relative to the untreated control. (C) Western blot analysis presents the protein expressions of MuRF1 and MAFbx following treatment with SL and Dexa. (D) Densitometric quantification of the Western blot signals is depicted in bar graph format, indicating changes in protein levels after treatments. Statistical annotations are as follows: *****p*<0.0001 compared to control group (CTL); #*p*<0.05, ####*p*<0.0001 compared to the Dexa-alone treated group.

술린 부족과 같은 조건에서 볼 수 있으며, 이들은 종종 근위축을 촉진하는 호르몬인 혈중 글루코코르티코이드 수치의 증가와 관련되어 있다[16]. 텍사메타손에 의해 유발된 근위축 마우스 모델은 고정, 탈신경, 또는 불용성 위축 모델과는 다르게, 인간의 근감소증(sarcopenia)에서 나타나는 이형 근섬유 감소와 유사한 근섬유 유형의 변화를 유발하는 것으로 보고되고 있다[26]. 본 연구는 선행 연구를 기반으로 텍사메타손으로 유도된 근위축 마우스 모델을 이용하여 SL의 근위축 억제 효과를 평가하였다 [12]. 연구 결과, SL 투여군은 텍사메타손에 의한 체중 감소를 경감시키는 효과를 보여주었으며, 이는 투여된 두 가지 농도(250 및 500 µg/ml)에서 모두 관찰되었다(Fig. 3A). 실험 종료 시점에서 측정된 비복근의 무게는 텍사메타손 처리군에 비해 SL 투여군에서 유의미한 증가를 보였다(Fig. 3B). 전경골근의 무게도 SL 처리에 의한 근육량 보존 효과를 나타내며, 이는 비복근에서 관찰된 보호 효과와 유사하다(Fig. 3C). 이러한 결과는 SL이 텍사메타손 유도 체중 감소 및 근위축에 대한 유효한 보호 효과를 가짐을 보여준다.

근위축 마우스 모델에서 SL의 근 섬유 보호 효과

근감소증은 일반적으로 근섬유의 수와 크기가 감소하면서 근육량의 손실을 가져온다. 이러한 근육의 형태학적 변화를 평가하기 위해, 비복근과 전경골근에서 근섬유의 단면을 면역형광염색 후 형광 현미경으로 관찰하였다. 100배 확대로 촬영된 이미지를 통해, SL 처리한 쥐의 근섬유 단면적(CSA)이 텍사메타손 단독 처리군에 비해 유의미하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 또한, SL 처리군에서는 근섬유의 크기 변화와 분포가 텍사메타손 처리군보다 더 넓은 범위에 걸쳐 나타났다(Fig. 4B). 이러

한 결과는 SL이 근위축을 방지하고 근섬유의 크기를 유지하는데 효과적일 수 있음을 나타낸다. 더 나아가, 이러한 결과는 SL이 생체 내에서 근위축에 대응하여 근섬유의 구조적 무결성을 보존하는데 중요한 역할을 할 가능성이 있음을 시사한다.

근위축 마우스 모델에서 SL의 근 기능 보호 효과

SL이 근육 기능에 미치는 영향을 조사하기 위해, 텍사메타손으로 유도된 근위축이 있는 마우스에 SL을 처리하고 근 기능을 평가하였다. 먼저, 그립 강도 테스트 결과, SL 처리군은 텍사메타손을 처리하지 않은 대조군에 비해 평균 최대 힘이 유의미하게 증가했으며, 이는 SL이 근력을 향상시킬 수 있음을 시사한다(Fig. 5A). 텍사메타손 유도 근위축 마우스 모델로 시행한 트레드밀 운동 시 지칠 때까지 걸리는 시간(time to exhaustion)을 비교한 실험에서, SL을 처리한 마우스는 텍사메타손만 처리한 마우스에 비해 지구력이 향상되었으며, 피로에 이르는 시간이 더 길었다(Fig. 5B). 이러한 결과들은 SL이 근력과 지구력을 포함한 근육 기능의 개선에 긍정적인 영향을 미칠 수 있음을 나타내며, 근감소증을 포함한 근육 관련 질환을 가진 환자들에게 SL이 유망한 치료 옵션이 될 수 있음을 제시한다.

근위축 마우스 모델에서 SL의 MAFbx 발현 조절

끝으로 SL이 마우스 골격근의 근위축 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 비복근과 전경골근의 MuRF1 및 MAFbx 단백질 수준을 웨스턴 블롯을 통해 측정된 결과, SL 처리군에서 텍사메타손 단독 처리군에 비해 MAFbx의 발현이 유의하게 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 6A, 6B).

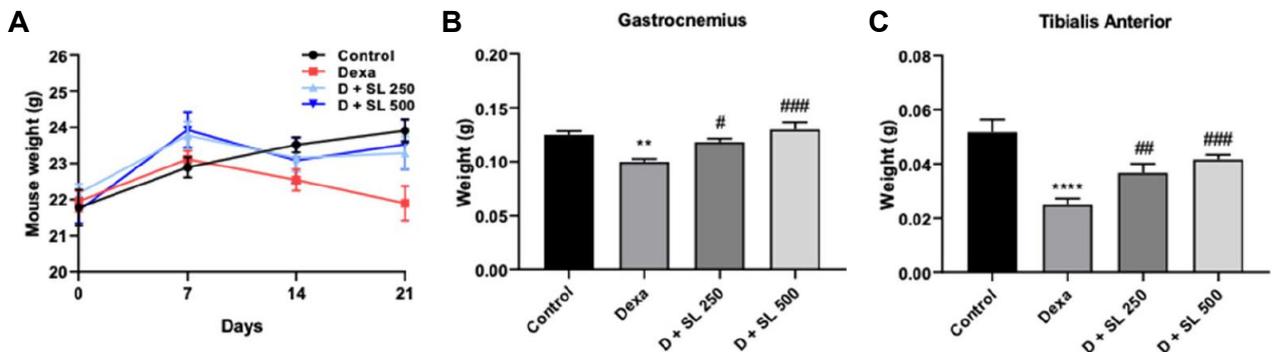


Fig. 3. SL attenuates Dexamethasone-induced weight loss and muscle wasting in a mouse model. (A) Graphical representation of body weight alterations in mice experiencing Dexamethasone-induced weight loss, treated with SL at concentrations of 250 and 500 µg/ml. The results depict SL's capacity to alleviate Dexamethasone's impact on weight reduction throughout the course of the study. (B) The gastrocnemius muscle (GA) weight measured at study completion suggests that SL conserved muscle mass in contrast to the Dexamethasone-only treated group. (C) Similarly, the tibialis anterior muscle (TA) mass evaluation demonstrates SL's protective effect on muscle mass, analogous to that observed in the GA. Statistical significance is denoted as ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs. control group (CTL); # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$, #### $p < 0.0001$ vs. the Dexamethasone-only treated group.

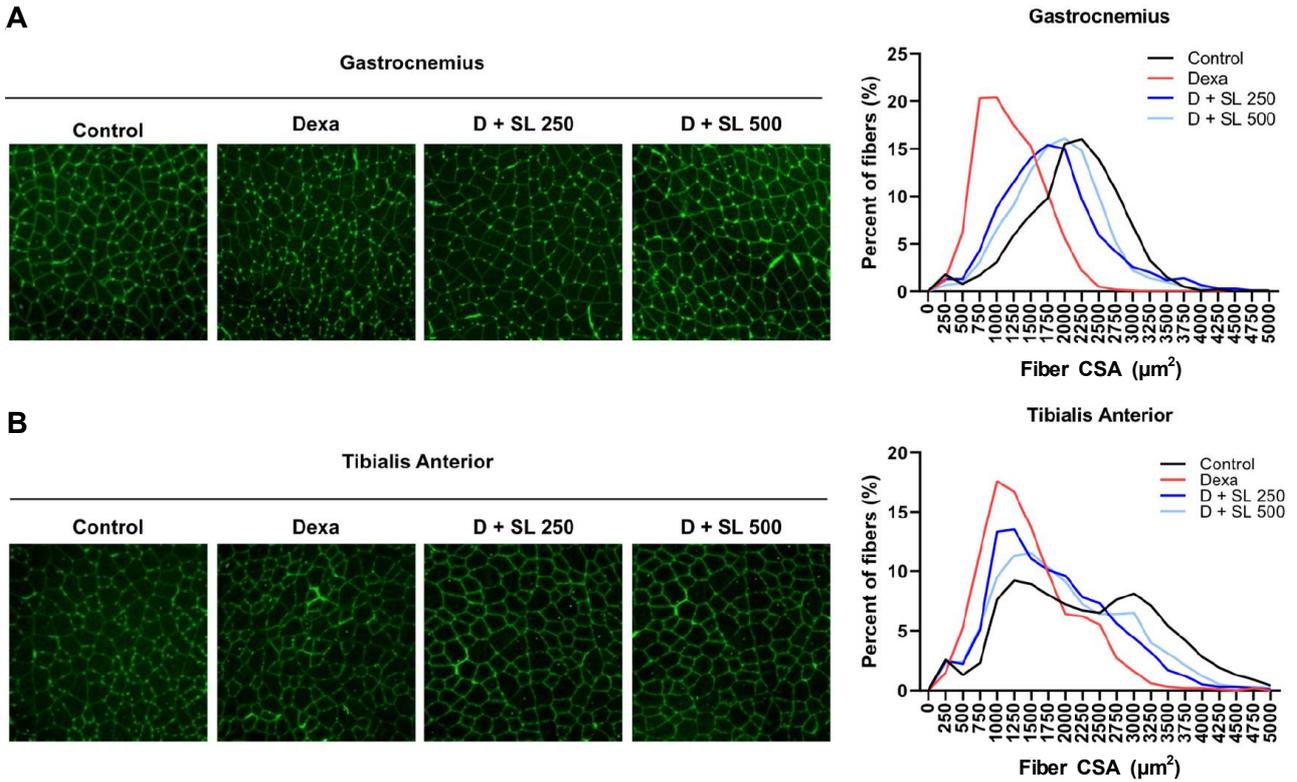


Fig. 4. SL prevents Dexa-induced muscle atrophy in mice. (A) Immunofluorescence staining of GA muscle fiber cross sections using fluorescence microscopy. Images were taken at 100× magnification. The graph on the right shows the cross-sectional area (CSA) distribution of GA muscle fibers. (B) Similar immunofluorescence staining of TA muscle fiber cross sections. The graph on the right presents CSA measurements of TA muscle showing changes in muscle fiber size under various treatment conditions.

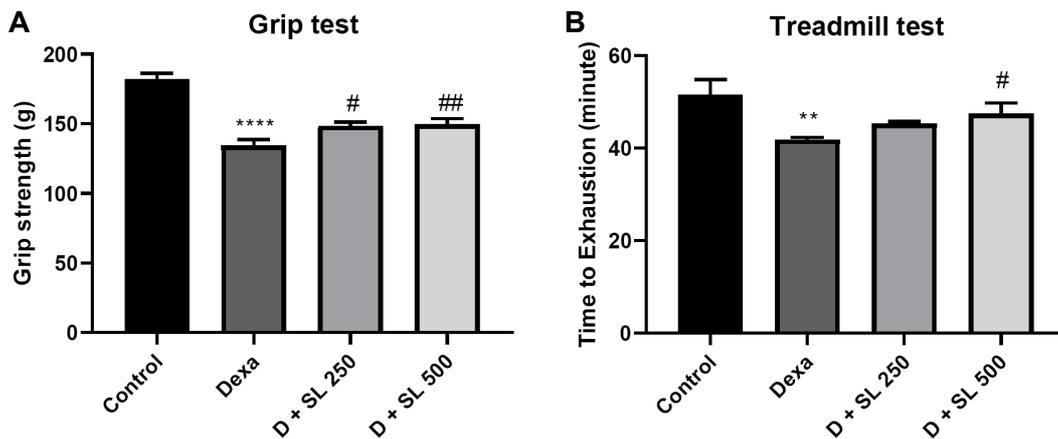


Fig. 5. Enhancement of muscular strength and endurance by SL in an atrophy mouse model. (A) Results of the grip strength test in mice conducted to evaluate muscle function after SL treatment. Bars represent the average maximum force produced by mice in each group. (B) Results of a treadmill endurance test measuring physical stamina of SL-treated mice. Bars show the total time (in minutes) the mouse ran before reaching fatigue. Statistical significance is indicated as follows: ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs. CTL; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Dexa alone group.

결론적으로, SL이 *in vitro* 및 *in vivo* 근위축 모델 모두에서 MAFbx의 발현을 억제함으로써 텍사메타손에 의해 유발된 근위축을 보호하는 효능을 가진다는 것을 입증하였

다. 이는 SL이 근육 세포 내의 단백질 분해 경로를 조절함으로써 근섬유의 손실을 방지할 수 있는 메커니즘을 가질 가능성을 시사한다[15, 23]. 또한, SL은 근육의 회복 및

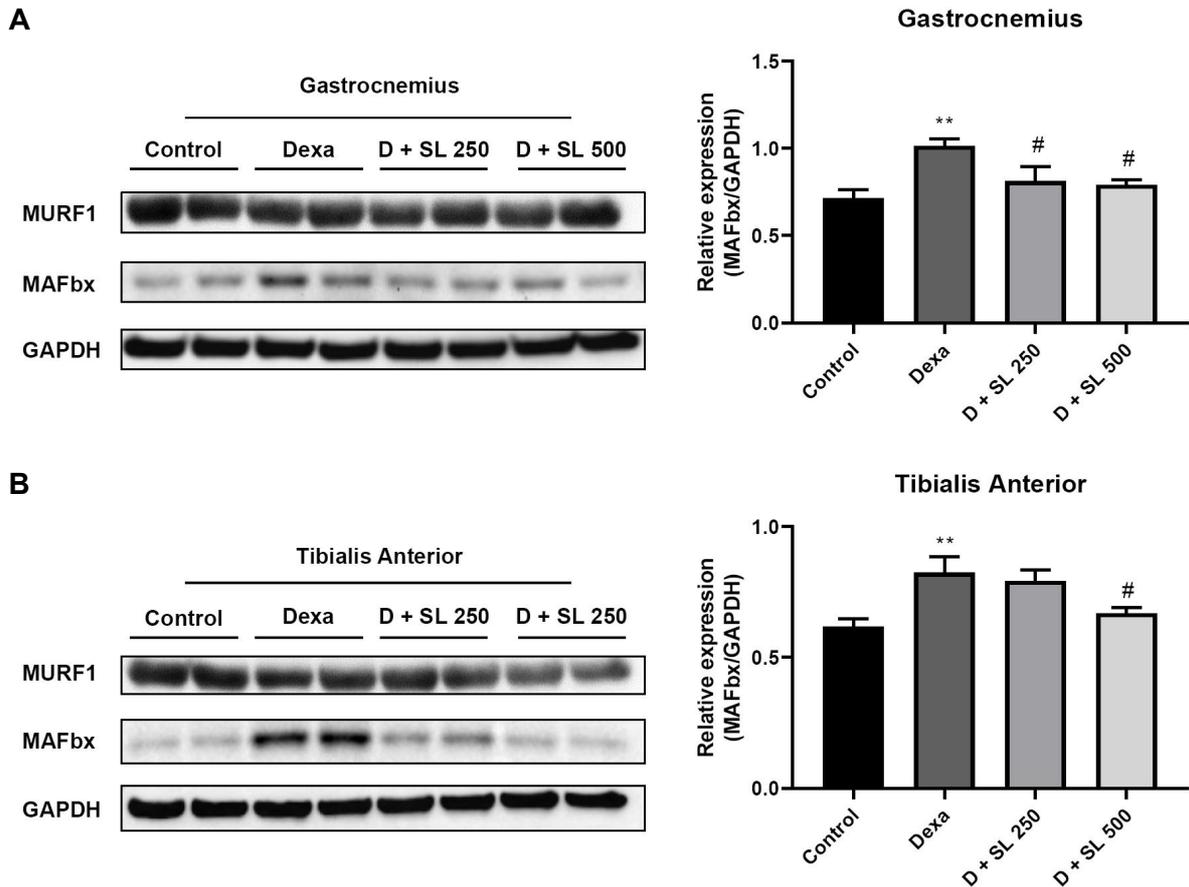


Fig. 6. Inhibition of MAFbx expression by SL in skeletal muscle atrophy. (A) Representative western blot bands for MuRF1 and MAFbx proteins in gastrocnemius muscle, with densitometric analysis shown on the right. Treatment with SL demonstrates decreased expression levels of MAFbx. (B) Similar western blot analysis for tibialis anterior muscle, with densitometric quantification to the right. Across both muscle types, SL treatment is associated with a reduction in atrophy-associated protein expression, indicating its potential protective effect against Dexa-induced muscle atrophy. Data are normalized to a loading control. Statistical significance is indicated as follows: ** $p < 0.01$ vs. CTL; # $p < 0.05$ vs. the Dexa-only group.

재생에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이는 근육 소모성 질환의 치료뿐만 아니라 예방에 있어서도 SL의 활용 가능성을 보여준다[3, 11]. 이러한 발견은 근육 질환 치료 전략을 개발하는 데 있어 SL을 중심으로 한 접근 방식에 중요한 정보를 제공하며, 근육 소모 방지 및 회복 촉진에 SL이 어떻게 기여할 수 있는지에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(ATIS 과제번호: PJ014 155042023)의 지원으로 수행된 결과입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest

with the contents of this article.

References

1. 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.
2. Bonetto, A., Andersson, D. C. and Waning, D. L. 2015. Assessment of muscle mass and strength in mice. *Bone Key Rep.* **4**, 732.
3. Chargé, S. B. and Rudnicki, M. A. 2003. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* **84**, 209-238.
4. Cleasby, M. E., Jamieson, P. M. and Atherton, P. J. 2016. Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links be-

- tween common co-morbidities. *J. Endocrinol.* **229**, R67-81.
5. 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.
 6. Ferrucci, L., Guralnik, J. M., Studenski, S., Fried, L. P., Cutler, G. B., Jr, Walston, J. D; Interventions on Frailty Working Group. 2004. Designing randomized, controlled trials aimed at preventing or delaying functional decline and disability in frail, older persons: a consensus report. *J. Am. Geriatr. Soc.* **52**, 625-634.
 7. Fielding, R. A., Vellas, B., Evans, W. J., Bhasin, S., Morley, J. E., Newman, A. B., Abellan van Kan, G., Andrieu, S., Bauer, J., Breuille, D., Cederholm, T., Chandler, J., De Meynard, C., Donini, L., Harris, T., Kannt, A., Keime Guibert, F., Onder, G., Papanicolaou, D., Rolland, Y., Rooks, D., Sieber, C., Souhami, E., Verlaan, S. and Zamboni, M. 2011. Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **12**, 249-256.
 8. 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.
 9. Glass, D. J. 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1974-1984.
 10. Goodman, C. A., Frey, J. W., Mabrey, D. M., Jacobs, B. L., Lincoln, H. C., You, J. S. and Hornberger, T. A. 2011. The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. *J. Physiol.* **589**, 5485-5501.
 11. Grounds, M. D. 2002. Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-1 signalling. *Biogerontology* **3**, 19-24.
 12. Hah, Y. S., Lee, W. K., Lee, S., Kim, E. J., Lee, J. H., Lee, S. J., Ji, Y. H., Kim, S. G., Lee, H. H., Hong, S. Y. and Yoo, J. I. 2022. β -Sitosterol attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy via regulating FoxO1-dependent signaling in C2C12 cell and mice model. *Nutrients* **14**, 2894.
 13. 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.
 14. Ibebunjo, 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., Brachet, S., Gutzwiller, S., Ma, Q., Markovits, J., Broome, M., Steinkrauss, M., Skuba, E., Galarneau, 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.
 15. Lecker, S. H., Goldberg, A. L. and Mitch, W. E. 2006. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1807-1819.
 16. 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.
 17. Lee, J. C., Kim, H. R., Kim, J. and Jang, Y. S. 2022. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6490-6496.
 18. Li, H., Yoon, J. H., Won, H. J., Ji, H. S., Yuk, H. J., Park, K. H., Park, H. Y. and Jeong, T. S. 2017. Isotrifoliol inhibits pro-inflammatory mediators by suppression of TLR/NF- κ B and TLR/MAPK signaling in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Int. Immunopharmacol.* **45**, 110-119.
 19. Massaccesi, L., Goi, G., Tringali, C., Barassi, A., Venerando, B. and Papini, N. 2016. Dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy increases O-GlcNAcylation in C2C12 cells. *J. Cell. Biochem.* **117**, 1833-1842.
 20. Meng, S. J. and Yu, L. J. 2010. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1509-1526.
 21. Pagano, A. F., Briocche, 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.
 22. Rosenberg, I. H. 2011. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *Clin. Geriatr. Med.* **27**, 337-339.
 23. Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S. H. and Goldberg, A. L. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**, 399-412.
 24. Sayer, A. A. and Cruz-Jentoft, A. 2022. Sarcopenia definition, diagnosis and treatment: consensus is growing. *Age Ageing* **51**, afac220.
 25. Schakman, O., Kalista, S., Barbé, C., Loumaye, A. and Thissen, J. P. 2013. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2163-2172.
 26. 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
 27. Wilkinson, D. J., Piasecki, M. and Atherton, P. J. 2018. The age-related loss of skeletal muscle mass and function: Measurement and physiology of muscle fibre atrophy and muscle fibre loss in humans. *Ageing Res. Rev.* **47**, 123-132.

초록 : 콩잎 추출물의 근위축 개선 효과최혜영¹ · 하영술² · 지영호³ · 하준영⁴ · 배환희⁴ · 이동열⁵ · 정원민⁵ · 정동규⁵ · 유준일³ · 김상곤^{5*}¹경상국립대학교병원 영상의학과, ²경상국립대학교 의과대학 의과학연구원, ³경상국립대학교병원 의생명연구원, ⁴인하대학교병원 정형외과학교실, ⁵농촌진흥청 국립식량과학원, ⁵(재)경남항노화연구원

골격근량과 근력의 점진적인 감소를 특징으로 하는 근감소증은 고령화 인구에서 중요한 문제이다. 본 연구는 콩잎 추출물(Soybean Leaf extracts, SL)의 텍사메타손으로 유도된 근위축에 대한 치료적 가능성을 세포 및 동물 모델에서 조사하였다. 세포 실험 결과, SL은 C2C12 근섬유의 형태, 밀도 및 크기가 보존되어 통계적으로 유의미한 수준으로 텍사메타손에 의해 유발된 근위축을 완화하는 것으로 나타났다. 또한, SL 처리는 주요 근육 위축 조절 인자인 muscle RING-finger protein-1 (MuRF1)과 muscle atrophy F-box (MAFbx)의 발현을 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 유의하게 하향 조절하였다. 마우스 모델에서 SL 투여는 특히 텍사메타손으로 인한 체중 감소와 근육 소모를 상쇄하여 비복근과 전경골근의 근육량을 보존하는 것으로 나타났다. 기능적으로도 SL을 투여한 마우스는 악력과 트레드밀 지구력이 향상되어 근육 성능이 개선되었다. 또한 SL은 골격근에서 근위축 관련 단백질인 MAFbx의 발현을 억제하여 텍사메타손 유도 근위축에 대한 보호 역할을 보여주었다. 이러한 연구 결과를 종합해 볼 때 SL은 근감소증과 같은 근육 소모 질환을 개선할 수 있는 유망한 천연 치료제가 될 수 있음을 시사한다.