

블루베리 열수 추출물의 근아세포의 근분화에 미치는 영향

최영수^{1,2#}, 김은미^{2#}, 최선경¹, 이웅희³, 한효상^{4*}, 김기광^{1*}

1 : 충남대학교 생화학과, 2 : 안전성평가연구소 예측독성연구본부
3 : 충남대학교 생물공학연구소, 4 : 중부대학교 보건행정학과

Investigation of the effect of Blueberry hydrothermal extracts on myoblast differentiation

Youngsoo Choi^{1#}, Eunmi Kim^{2#}, Sunkyung Choi¹, Woonghee Lee³
Hyosang Han^{4*}, Keekwang. Kim^{1*}

1 : Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
2 : Department of Predictive Toxicology, Korea Institute of Toxicology, Daejeon 34114, Korea
3 : Institute of Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
4 : Department of Health Administration, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea

ABSTRACT

Objectives : At present, aging-related degenerative muscle diseases are considered a serious problem. However, the effects on muscles regarding the efficacy of blueberry have not been studied. In this study, we tried to find out the correlation between blueberry and muscle.

Methods : 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) assay was performed to confirm the antioxidant efficacy of blueberry hydrothermal extract. To determine the effect of blueberry hydrothermal extracts (BHE) on myoblast activity, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay was performed. To confirm the effect of blueberry hydrothermal extracts on the differentiation of myoblast into myotubes, protein expression levels of myosin heavy chain 3 (Myh3) and paired box 3/7 (pax3/7) were confirmed by immunoblot analysis. In addition, immunofluorescence microscopy was performed to confirm the effect on myotube formation of blueberry hydrothermal extracts.

Results : Antioxidative efficacy and low toxicity were confirmed through ABTS assay and MTS assay of blueberry extract for myoblasts. As a result of immunoblot analysis and immunofluorescence analysis, the decrease in myogenic marker Pax3/7 was not confirmed, but myotubes The specific expression inhibitory activity of the forming protein Myh3 was confirmed. Through this, it was confirmed that the blueberry extract has a negative activity against myoblast differentiation.

Conclusion : This experiment confirmed that blueberry hydrothermal extract has excellent antioxidant efficacy and negative results in inhibiting the differentiation and proliferation of myoblast. This requires deep study of certain ingredients and requires reassessment of the dietary intake of blueberries.

Key words : Blueberry, myoblast, muscle differentiation, Sarcopenia

*Corresponding author : Kee Kwang Kim, Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.
· Tel : +82-42-821-5485 · E-mail : kimkk@cnu.ac.kr

Hyo Sang Han, Department of Health Administration, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea.
· Tel : +82-41-750-6292 · E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr

#First author : Young-Soo Choi and Eun-Mi Kim, Department of Predictive Toxicology, Korea Institute of Toxicology, 141 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34114, Korea.

· Tel : +82-42-610-8263 · Fax : +82-42-610-8157 · E-mail : yeong318soo@gmail.com, eunmi.kim@kitox.re.kr
· Received : 01 April 2020 · Revised : 15 May 2020 · Accepted : 25 May 2020

I. 서론

블루베리(*Vaccinium* spp.)는 진달래과(Ericaceae) 산앵두 나무속(*Vaccinium*)에 속하는 관목성 식물로 전세계적으로 400여종이 있으며, 히말라야, 뉴기니, 남아프리카의 안데안까지 세계적으로 자생한다^{1,2)}. 주요 블루베리로 *Vaccinium corymbosum* L. (highbush blueberry), *V. ashei* Reade (rabbiteye blueberry; syn. *V. virgatum* Ait.), *V. angustifolium* Ait. (lowbush blueberry)이 있으며, 우리나라에서는 내한성, 저온요구도와 같은 과실의 품질이 뛰어난 *Vaccinium corymbosum* L. (highbush blueberry)이 주로 재배되고 있다³⁾.

블루베리는 임상에서 근육회복 시간 단축, 뇌신경의 신호 전달 촉진, 시력 회복 유도, 면역력 증강, 심혈관계 질환 예방, 항산화 등에 효능이 있어 주목 받는 천연물으로써 각광받고 있다. 블루베리에는 세포의 산화 유리기를 억제하는 flavonoid 성분인 anthocyanin이 함유되어 있으며 포도의 30배 이상 함유되어 항산화 작용을 한다⁴⁻¹⁰⁾. 또한 pterostilbene 성분이 풍부하게 함유되어 있어 항균작용, 대장의 염증 억제, 항염작용을 하며, 면역력 강화에 필요한 아연 역시 풍부해서 장정작용을 하여 대장 기능 향상에 도움을 준다^{7,11-14)}. 블루베리 100g에 하루 권장 섭취량의 비타민K는 24%, 비타민C는 16%, 비타민E는 3%, 비타민A는 1%가 들어 있으며, 티아민, 리보플라빈, 니아친, 엽산 등 비타민B군에 속한 비타민도 1~3% 들어 있다^{15,16)}. 철분과 칼륨은 블루베리 100g에 각각 하루 권장 섭취량의 2%가 들어있고, 구리는 3%, 망간은 17%가 들어 있다¹⁵⁻¹⁸⁾. 이 외에도 칼슘, 마그네슘, 인이 각각 1% 들어 있다¹⁵⁻¹⁸⁾. 블루베리의 약리 작용으로는 항산화 작용⁷⁾, 항균활성^{11,12)}, 콜레스테롤 감소²¹⁾, 항암예방¹⁰⁾, 신경관손상 완화³³⁾, 항염작용¹⁹⁾, 혈관 질환 및 당뇨병 개선 부분^{7,10,22,33)} 등의 여러 연구들이 보고되었다.

신체에서 근육은 몸을 지탱하는 중요 요소이며 관절의 결합과 동적인 작용의 중요한 역할을 담당하고 뼈와 함께 체형을 조화롭게 유지시킨다. 또한 근육의 일부는 자체적으로 호르몬을 분비하고, 근골격에 칼슘 저장을 도와 골밀도의 증가를 유도하여 골다공증을 예방하기도 한다. 근육 형성(myogenesis)은 근아세포(myoblast)의 분화의 진행을 통해 최종적으로 두꺼운 근섬유 다발을 이루는 것을 말한다.^{15,16)} 근아세포는 위성세포(satellite cell)의 Pax3/7 유전자의 발현 조절을 통해 MyoD, MyoG, Myh3 등의 근육의 전사인자들을 차례대로 발현시키며 근분화 과정을 완성한다²³⁻²⁵⁾. 이 과정에서 근아세포는 긴 관모양의 근세포(myocyte)가 되며, 이 근세포들은 서로 세포 융합을 하여 다핵성의 기다란 근관세포(myotube)로 분화하고, 근섬유 다발의 발달을 통해 근육 형성을 이루게 된다²³⁻²⁸⁾. 자극이 없는 평소 근아세포는 근육의 기저막(Basal lamina)과 근섬유 결막 사이에 위치한 satellite cell 상태로 존재하며, 근육의 손상, 근위축병(muscular dystrophy), 산화적 스트레스 등에 노출되어 자극을 받게 된다면, 이 손상된 근육을 재생시키기 위해 satellite cell은 자가 분열, 단백질 합성 유도, 근아세포로의 발달을 진행한다^{30,42,45)}. 이와 같이 근아세포의 발달과 분화는 근육의 재생, 배아 상태의 근형성, 골격근의 기능 유지, 노화로 인한 근퇴화 등에서 중요한 역할을 수행한

다²⁶⁻²⁸⁾. 퇴행성 근육 질환의 재생과 치료를 위한 근아세포의 분화와 증식, 또한 *In vivo*에서의 배양 조건 확립 등은 관련 연구에서 그 필요성이 더욱 증가하고 있다.²³⁻²⁷⁾ 근감소증은 근육 내에 근섬유들이 지방으로의 변화되거나 섬유성결합조직(fibrillar connective tissue)가 형성되어 근육이 충분하지 못하게 되어 골격근과 근력 감소가 나타나는 질환이다.³⁹⁻⁴⁵⁾ 그 원인으로는 활성산소(Reactive oxygen species)에 의한 산화적 스트레스, 호르몬 변화, 운동량의 감소, 염증성 사이토카인의 변화, 단백질 섭취 감소 등이 있지만 가장 큰 이유는 노화에 의해 발생한다^{31,32)}. 노령화가 계속 진행되면서 근감소증이 유발된 환자들의 가장 큰 불편함은 근 기능의 상실로 인해 신체적인 장애를 유발하거나, 산화적 스트레스로 근 손상을 야기하여 최종적으로 다양한 합병증에 노출되는 것이다.³²⁾ 근감소증은 현재 마땅한 치료제가 없으며, 물리적 운동은 필수적으로 병행 된다. 하지만 이마저도 수행할 수 없는 환자들이 대부분이므로 이 질병의 진행도를 늦추거나 긍정적인 효과를 줄 수 있는 치료제 연구와 개발은 피할 수 없는 부분이다. 이미 블루베리 추출물의 구성 물질인 anthocyanin, pterostilbene, 비타민 등의 항염증, 항암예방, 항균작용, 항산화 등의 효과에 대해 연구들이 수행되고 있다^{7-14,31,32,41-45)}.

이에 본 연구는 블루베리 열수 추출물 (blueberry hydrothermal extract, BHE)을 이용하여 근세포의 분화와 증식에 미치는 영향과 근아세포의 분화와 활성화에 있어서 유의미한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 블루베리는 한약 제약 회사 (Jeong-Seong Drugstore, Korea)로부터 2019년 9월에 구매 (NO:2019-0910)하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고, 약재는 ultrasonic cleaner를 이용하여 불순물을 제거하여 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 Dulbecco's modified Eagle medium (Welgene, Korea), Ham's F-10 medium (Welgene, Korea), calf serum (Hyclone, USA), horse serum (Gibco, USA), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Welgene, Korea), filter paper (Advantec No.2, Japan), DPBS (Corning, USA), Versene (Gibco, USA), potassium persulfate (Sigma, USA), ABTS (Sigma, USA), MTS solution (Promega, USA), anti-Myh3 (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-Pax-3/7 (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-GAPDH (Meridian life Science/Meridian Bioscience, USA), Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Abcam, USA), Alexa Fluor 488-conjugated goat antibody against rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific), 4',6-diamidino-2-

phenylindole (DAPI; Thermo-Fisher Scientific, USA) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (Thermo Fisher Scientific), filter paper (Advantec No. 2, Japan), waterbath (Haake, Germany), automatic non-pressure pot (DaeWoong, Korea), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), 동결건조기 (IlshineBioBase, Korea), ultrasonic cleaner (Branson, USA), LSM 880 with Airyscan confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss, Germany), microplate reader (Molecular Devices SpectraMax ABS plus, USA) 등이다.

2. 방법

1) 블루베리 열수추출물 제조

블루베리 25 g을 정확히 측정 후, 환류추출기에 3차 증류수 1,000 ml과 함께 가열하였으며 추출물이 끓는 시점으로부터 약 2 시간 후 얻어진 추출액을 Filter paper (Advantec No. 2, Japan)를 사용하여 감압 여과하였다. 그 뒤 여과액을 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)로 농축하고 동결건조하여 얻은 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 블루베리 6 g, 수득율 24%였다.

2) 세포 배양

근아세포(myoblast)는 생후 3일 된 C57BL/6의 뒷다리 골격근에서 분리하여 배양한 것으로 실험에 사용하였다. 이후 근아세포의 증식은 Ham's F-10 medium에 10% Calf serum, 1% antibiotic antimycotic (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin), 2.5 µg/ml fibroblast growth factor (FGF)를 첨가한 growth medium에서 실시하였다. 근아세포 분화는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, WELGENE, Korea)에 1% fetal bovine serum (FBS, WELGENE, Korea)과 1% antibiotic antimycotic (WELGENE, Korea; 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin)를 첨가한 differentiation medium에서 표준 세포 배양 방법인 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

3) 항산화 효능 평가

항산화 효능은 블루베리 농도 (0.02, 0.2, 2 mg/ml)와 resveratrol 농도 (25, 50, 100 µM)에서 ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) assay를 이용하여 측정하였다. ABTS (sigma, USA) 7 mM 용액과 Potassium persulfate (sigma, USA) 2.4 mM 용액을 같은 부피로 혼합하여 차광한 상태로 실온에서 24 시간 동안 반응시켜 free radical 상태의 ABTS solution을 만들어 주었다. 이후 96 well plate에 ABTS free radical 용액 80 µl 넣고, sterile D.W로 dilution 후 흡광도를 microplate reader로 734 nm에서 측정하였을 때 측정값이 0.7 부근이 되도록 ABTS working solution을 만들었다. 만들어진 ABTS working solution 80 µl 와 sample 20 µl를 96 well plate의 각 well에 넣고 실온에서 5 분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 734 nm의 흡광도를 측정하였다. 얻은 측정값을 이

용하여 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 시료 처리시 흡광도를 다음의 식에 따라 항산화 효능을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{sampleblank}}}{A_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

4) 세포 독성 평가

블루베리 추출물이 근아세포 활성도에 미치는 영향을 측정하기 위해 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay를 수행하였다. 근아세포를 96 well plate에 3,000 cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양한 뒤 각각의 well에 농도별 블루베리 추출물을 처리하고 36시간 동안 배양하였다. 그 후 MTS 시약 (Promega, USA) 20 µl을 넣어준 뒤 microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA)를 이용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

세포 활성도 (%)

$$= \left\{ \frac{\text{시료첨가군의 흡광도} - \text{시료자체의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right\} \times 100$$

5) 면역 블롯 분석

PBS로 세척한 근아세포를 Laemmli Sample Buffer를 포함하는 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100]로 단백질을 추출하였다. 그 뒤 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였다. 분리한 단백질 sample을 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 후 비특이적 항체 결합을 방지하기 위해 blocking buffer (5% non fat dry milk in PBST)에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 primary antibody (anti-Pax-3/7 (Santa cruz biotechnology, USA), anti-Myh3 (Santa cruz biotechnology, USA), anti-GAPDH (Meridian Life Science, USA))를 4°C에서 12시간 동안 처리하고 PBST로 세척하였다. 마지막으로 Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody에 결합한 뒤 Super Signal system (Thermo Fisher Scientific, USA)으로 단백질을 검출하였다.

6) 면역 형광 분석

Immunofluorescence microscopy를 실시하기 위해 Chamber slide에 myblast를 분주하였다. 세포에 시료를 정해진 시간과 농도로 처리하였고 이후 4% paraformaldehyde로 실온에서 10분 동안 고정시키고 0.5% Triton X-100이 포함된 PBS에서 15분 동안 처리하였다. 비특이적인 항체 결합 반응을 방지하기 위해 blocking buffer (PBS, 5% goat serum, 0.1% BSA, 0.05% Tween 20)를 실온에서 1시간 동안 처리한 후 primary

antibody인 anti - Myh3를 blocking buffer에 1:250으로 희석하여 4°C에서 overnight하여 반응시켰다. Secondary antibody로 Mouse IgG Alexa Fluor 488-conjugated goat antibody(Thermo Fisher scientific, USA)를 사용하였고 45분간 실온에서 반응시켰다. 세포핵은 DAPI로 staining 실시하였으며, LSM 510 Live Configuration Vario Two VRGB confocal laser-scanning microscope(Carl Zeiss, Germany)를 통해 면역 형광 이미지를 얻은 후 분석하였다.

7) 자료 분석 및 통계 처리

대조군에 관한 실험군의 유의성은 Student's t-test를 이용하여 $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. 블루베리 추출물의 항산화 효능 평가

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay의 수행을 통해 블루베리 추출물의 ROS 제거 효능을 확인하였다. 항산화 활성이 잘 알려진 resveratrol을 양성 대조군 (positive control)로 사용하여 25, 50, 100 μM 에서 각각 $63.6 \pm 1.11\%$, $83.5 \pm 2.13\%$, $95.3 \pm 1.62\%$ 의 항산화 활성을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과를 통해 실험 과정의 신뢰성을 확보할 수 있었다. 블루베리 추출물은 0.02 mg/ml에서 $14.7 \pm 1.52\%$, 0.2 mg/ml에서 $19.6 \pm 0.60\%$, 2 mg/ml에서 $86.9 \pm 0.20\%$ 로 농도 의존적 ABTS radical 소거능을 확인할 수 있었으며, 이 결과를 통해 블루베리 추출물은 우수한 항산화 효능을 보유한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

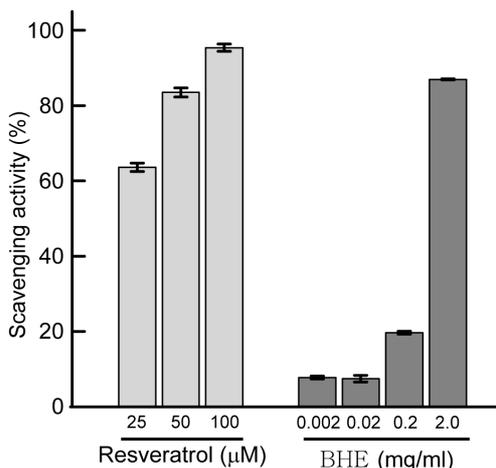


Fig. 1. Free radical scavenging activities of the resveratrol and BHE by ABTS assay. n=3 (biological replicates). Average \pm S.E.M.

2. 블루베리 추출물의 근아세포 (myoblast)에 대한 세포독성 평가

블루베리 추출물의 근분화 과정에서의 영향을 확인하기 위하여 블루베리 추출물 처리 최적 농도를 근아세포 (myoblast)에

대한 세포활성도 측정을 MTS assay 수행을 통해 확인하였다. 블루베리 추출물을 근아세포에 36시간 동안 처리한 후 측정된 세포 활성도 결과는 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $97.9 \pm 2.49\%$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $97.0 \pm 2.91\%$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $93.4 \pm 4.99\%$, 800 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $95.7 \pm 5.89\%$, 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $91.9 \pm 3.67\%$ 이었다. 이러한 결과는 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 블루베리 추출물의 처리는 근아세포의 활성도에 대한 영향이 없음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

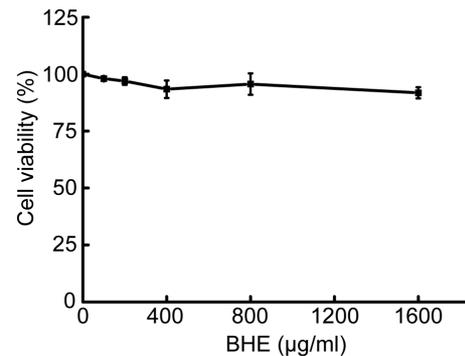


Fig. 2. Cytotoxicity of BHE on myoblasts. Myoblasts were treated with indicated concentrations of BHE for 24 h. Cell viability was measured by MTS assay. n=3 (biological replicates). Average \pm S.E.M.

3. 근아세포 (myoblast)의 분화에 블루베리 추출물이 미치는 영향

앞선 실험에서 블루베리 추출물의 높은 항산화 효능과 세포활성도 실험 결과를 토대로 블루베리 추출물의 근아세포 (myoblast)의 근관세포 (myotube)로의 분화 과정에 있어서의 활성을 확인하고자 Pax3/7과 Myh3 단백질의 발현을 면역 블롯을 실시하였다. 근아세포 (myoblast)를 분화 배양 조건에서 48시간 동안 분화를 유도하였으며, 이 과정에 블루베리 추출물을 처리하지 않은 대조군과 농도별로 블루베리 추출물을 처리한 실험군을 면역 블롯 분석을 통하여 근분화 관련 단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과 농도별 블루베리 추출물 처리에 의한 Pax3/7의 발현량은 변화가 관찰되지 않았으나, 근관형성에 있어서 가장 중요한 단백질로 알려진 Myh3의 발현량은 대조군에 비해 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 82%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 43%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 39%로 현저한 농도 의존적 감소가 확인되었다(Fig. 3).

4. 블루베리 추출물의 근관세포 (myotube) 형성에 미치는 영향

블루베리 추출물의 Myh3 단백질 발현 억제 활성에 대한 결과를 토대로 근관세포 (myotube) 형성 억제 기능 검증을 시각화하기 위해 면역형광법 (immunofluorescence microscopy)을 이용하여 블루베리 추출물을 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리하여 48시간 배양하였다. 그 결과 블루베리 추출물 없이 분화를 진행한 대조군 근관세포 (myotube)의 형성에서는 예상대로 현저한 Myh3의 단백질 발현 증가 및 근관세포 (myotube)의

특징인 세포융합을 통한 다핵성 (multi-nucleation) 세포가 확인되었고, 실험군은 블루베리 추출물 처리에 의해 Myh3의 단백질 발현이 현저히 감소되었을 뿐만 아니라 다핵성 근관세포 (myotube)의 형성이 현저한 저해가 확인되어 근원세포의 근분화를 유도하지 못 하는 것을 확인하였다 (Fig. 4).

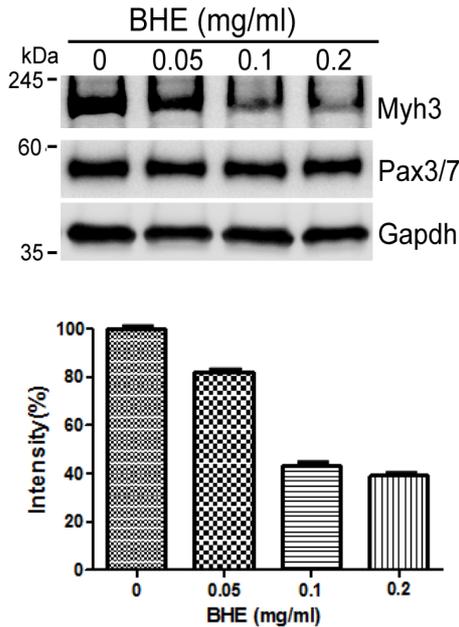


Fig. 2. Cytotoxicity of BHE on myoblasts. Myoblasts were treated with indicated concentrations of BHE for 24 h. Cell viability was measured by MTS assay. n=3 (biological replicates). Average \pm S.E.M.

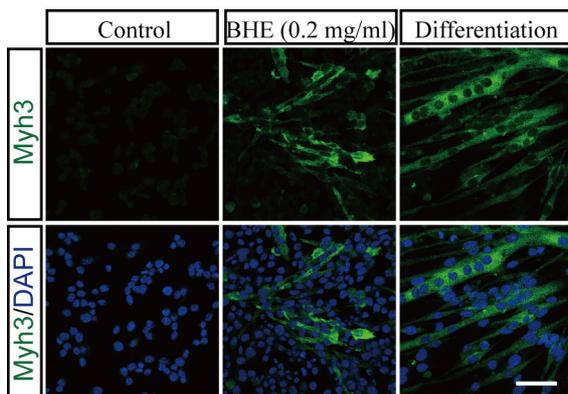


Fig. 4. Effect of BHE on the myotube formation. Myoblasts were cultured in differentiation media (D.M) with 200 μ g/ml BHE for 48 h, and subjected to immunofluorescence microscopy. Myh3 (green) was proved in the immunofluorescence image. DAPI (blue) was used for nuclear staining. Scale bar, 50 μ m.

IV. 고 찰

근감소증(Sarcopenia)은 에너지의 원천이라 불리는 근육의 양과 근력이 감소하는 질환이다. 원인으로는 활성 산소에 의한 스트레스, 호르몬 변화, 염증성 사이토카인의 변화, 단백질 섭취 감소, 운동량 감소 등이 있지만 가장 큰 이유는 노화에

의해 발생한다^{32,42)}. 근육량의 감소를 섬유질이 대체하게 되고 이 후 얻는 당뇨 등 다양한 합병증으로 사망에 이를 수 있다. 실제로 The Framingham Heart Study에서 398명의 노인 중 72-102세를 대상으로 2년간 1 kg/m² 씩 근육량이 감소될 때 마다 사망의 위험이 약 2배정도 증가한다고 연구되었다. 또한 현재 근감소증은 80세 이상의 노인중 약 50%에서 유발되고 있다^{31,32)}. 현재 근감소증에 대해 적절한 치료제가 없으며, 해결 방법으로는 단백질 섭취와 운동량의 증가가 제시되었다. 하지만 노령의 환자들은 이미 신체적인 부분의 결함을 갖고 있어 운동량의 증가는 매우 어려운 실정으로 이처럼 대부분 물리적인 요법이 힘든 환자들을 위해 이 질병의 진행도를 늦추거나 긍정적인 효과를 주는 다양한 후보 물질들에 대한 연구와 검증, 치료제 개발은 매우 필수적이다.

블루베리에 들어 있는 delphinidin, cyanidin, petunidin, malvidin, paeonidin의 5가지 anthocyanidin과 malvidin 배당체(galactose, glucose, arabinose)가 블루베리의 주요 성분이며, 또한 15가지 종류의 안토시아닌이 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 블루베리 100 g당 함유된 안토시아닌은 로부시쉬에 188 mg, 하이부시에 100 mg, 래빗아이에 210 mg이 함유되어 있다³⁹⁾. 이들은 강력한 항산화작용으로 혈관과 장기 등에 손상을 입히는 활성산소를 제거한다^{7,20)}. 또한 chlorogenic acid, quercetin는 cholesterol 흡수를 막고, potassium이 체내 과도한 sodium을 배출시키는 것을 조절하여 심혈관질환을 예방해준다^{7,10,21)}. Anthocyanin, kaempferol 등 flavonoid 성분은 뇌신경 세포의 신호전달을 촉진시키고, 신경 재생을 자극하여 기억력 향상에 도움을 준다^{8,9)}. Anthocyanin은 항산화작용을 하며, 망막의 로돕신 재합성을 활성화하여 시력 회복을 유도한다³³⁾. β -Carotene, lutein, zeaxanthin 등 carotenoid 성분은 식물영양소 성분으로 항산화작용을 이용해 세포를 보호하고 면역력을 강화해 퇴행성 질환, 암, 노화 등의 질병을 예방하고, 장 속 독성 물질을 흡착하여 배출하는 장정작용에도 탁월하다^{7,13,14)}. Proanthocyanidin은 방광과 비뇨기관에 존재하는 박테리아의 서식을 억제한다^{11,12)}. 이처럼 다양한 유효 성분을 함유하는 블루베리 열수추출물이 근아세포 (myoblast)의 분화와 발달에 미치는 영향을 통해 근감소증 (Sarcopenia)의 치료 분야에 대한 연구가 필요하다.

생물체내에서 생성되는 산소의 화합물인 활성산소 (Reactive oxygen species)는 세포 내 신호 전달 경로 과정의 단백질 합성과 분해과정에서 산화력이 강한 산소로 알려져 있다³⁵⁾. 이러한 활성산소에 의한 산화적 스트레스는 DNA와 세포를 공격해 세포사멸을 일으켜 근육량의 소실, 피부 노화, 염증반응, 신장 질환, 동맥경화증 등 각종 질환의 원인으로 알려져 있다³⁰⁾. 따라서 이러한 ROS에 의한 질병의 예방을 위해서는 ROS 경감 효능을 가지고 있는 항산화 물질의 연구가 매우 중요하다. 이러한 산화적 스트레스에 미치는 영향을 확인하기 위하여 블루베리 추출물의 ROS 제거 효능을 ABTS assay를 통하여 실시하였다. ROS 제거 효과가 잘 알려진 resveratrol을 양성 대조군 (positive control)로 사용하였으며, 블루베리 추출물 처리 결과는 0.02 mg/ml에서 14.7 \pm 1.52%, 0.2 mg/ml에서 19.6 \pm 0.60%, 2 mg/ml에서 86.9 \pm 0.20%로 농도 의존적인 ABTS radical 소거능을 확인할 수 있었으며, 이 결과를 통해 블루베리 추출물은 우수한 항산화 효능을 보유한 것을 확인하였다.

블루베리 추출물이 근분화와 성장에 미치는 영향을 확인하기 이전에 블루베리 추출물 처리 최적 농도를 알기 위해 근아세포 (myoblast)에 대한 세포독성 평가는 살아있는 세포의 정량적 측정이 가능한 MTS assay 수행을 통해 확인하였다. 근육의 발생과 분화에 있어 중요한 세포인 근아세포 (myoblast)에 블루베리 추출물을 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 36시간 동안 처리한 후 세포활성도의 측정 결과는 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 까지 $91.9 \pm 3.67\%$ 의 활성도를 나타내 근아세포 (myoblast)의 생존률에 미치는 부정적 영향이 없음을 확인하였다.

근육의 분화에 있어 근아세포 (myoblast)로부터 관상형의 기다란 근세포 (myocyte)를 지나 근관세포 (myotube)가 되기까지 다양한 전사인자들이 발현하고 감소한다^{23,27,28}. 대표적인 근육의 전사인자는 MyoD, MyoG, Myh3, Myf5, myogenin 등이 있으며, 이들은 근분화시 Pax3/7의 발현이 감소하면서 근육은 증식하고 MyoD, MyoG, Myh3 등의 유전자들이 차례대로 발현하여 다핵성 기다란 근관세포 (myotube)인 근세포 (myocyte)에서 Myh3가 가장 많이 발현되어 분화가 완료된다.³⁶⁾³⁷⁾ 또한 이 전사인자들은 골격근 외측 근섬유와 기저막 사이에 위치하는 위성세포 (satellite cell)는 Pax3/7를 통해 근육 전사인자 발현을 조절하며, 근육의 손상시 세포 분열하여 근육의 재생을 실시한다^{23)–28)}. 이처럼 근분화에 있어서 Pax3/7, Myh3은 중요한 마커로써 사용된다^{23)–28)}. 블루베리 추출물의 높은 항산화 효능과 세포활성도 실험 결과를 토대로 48시간 동안 근아세포 (myoblast)의 근분화를 유도하여 Pax3/7과 Myh3 단백질의 발현을 확인하기 위해 면역 블롯을 실시하였을 때, 농도별 블루베리 추출물 처리에 의한 Pax3/7의 발현량은 변화가 관찰되지 않았으나, 근관세포 (myotube)의 형성에 있어서 가장 중요한 단백질로 알려진 Myh3의 발현량은 대조군 (control)에 비해 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 82%, 43%, 39%로 현저한 농도 의존적 감소를 보였다. 이러한 결과는 블루베리 추출물이 근분화 과정에서 Myh3 특이적 발현 억제 활성의 갖고 있고, 블루베리 추출물이 근아세포 (myoblast)의 근관세포 (myotube)로의 근분화 과정에 부정적 활성을 가지고 있을 가능성을 확인하였다.

근아세포의 분화를 통한 근관 형성에 있어서 Myh3 단백질의 발현은 매우 중요하며, 근아세포의 근분화 과정에 있어서 가장 널리 사용되는 중요한 마커로도 알려져 있다. 또한 세포가 융합한 다핵성의 형태와 그 두께를 판단하여 근관으로의 분화 정도를 판단하는 기준이 된다^{26,27,28)}. 근분화를 확인하는 기준은 세포의 융합인 다핵성의 형태와 그 두께를 판단하여 근관세포 (myotube)로의 분화 정도를 판단한다²⁶⁾. 블루베리 추출물의 Myh3 단백질 발현 억제 활성을 시각화하기 위해 면역형광법 (immunofluorescence microscopy)을 이용하였으며, 근아세포 (myoblast)의 분화유도는 분화배양 조건에서 블루베리 추출물의 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 48시간 처리하여 배양하였다. 그 결과 블루베리 추출물 없이 분화를 진행한 대조군 (control)에서 근관세포 (myotube)의 형성은 Myh3의 단백질 발현 증가 및 근관세포 (myotube)의 특징인 세포융합을 통한 다핵성 (multi-nucleation) 세포가 확인되었다. 하지만 블루베리 추출물을 처리하여 분화를 진행한 실험군은 Myh3의 단백질 발현이 현저히 감소되었을 뿐만 아니라 다핵성의 근관세포

(myotube)의 형성이 현저하게 감소되는 것을 확인하였다.

이러한 결과들은 블루베리 추출물이 근분화 억제 효과를 가지고 있을 가능성을 말해준다. 그러므로 근감소증에서의 블루베리 추출물은 결과적으로 근아세포 (myoblast)의 분화와 근관세포 (myotube)의 형성을 억제하여 근육의 감소를 촉진시킬 수 있으므로 근감소증의 예방과 치료에 있어 블루베리의 섭취는 이 질병에서 부정적인 영향을 끼칠 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서 블루베리 열수 추출물의 항산화 효능, 근아세포 (myoblast)의 세포활성도와 면역 블롯 분석을 통하여 블루베리 열수 추출물의 처리에 의한 근아세포 (myoblast)의 근분화 마커 단백질의 발현 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Resveratrol 대비 블루베리 열수 추출물의 농도 의존적 ROS 제거능을 ABTS assay를 통해 항산화 효능을 확인하였다.
2. MTS assay를 통하여 근아세포 (myoblast)에 블루베리 열수 추출물의 처리하여 수행한 결과 농도에 관계 없이 세포생존률의 변화는 없었으며, 이를 통해 블루베리 열수 추출물이 근아세포 (myoblast)의 증식과 세포활성도 변화에 영향이 없음을 확인하였다.
3. 근아세포 (myoblast)의 근분화 단백질의 발현을 확인하기 위해 면역 블롯 분석법을 실시한 결과 Pax3/7의 감소는 확인할 수 없었으며 근관세포 형성 단백질인 Myh3의 특이적 발현 억제 활성을 확인하였다.
4. 면역 블롯 분석의 결과를 토대로 면역형광법을 수행하여 시각화한 결과 근아세포 (myoblast)의 분화에 있어서 분화배양액에서 블루베리 열수 추출물과 함께 48시간 동안 처리한 실험군이 블루베리 열수 추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해 Myh3의 현저한 감소와 긴 다핵성의 근관세포 (myotube)의 형성을 관찰할 수 없음을 확인하였다.

이상의 결론을 통합하여, 향후 어떠한 블루베리 열수 추출물의 특정 성분이 노화, 활성산소제거, 근육의 분화와 합성과정에서의 억제와 근감소증에 대해 유의미한 영향을 주는 것인지에 대하여 깊은 연구가 필요하며, 본 실험의 결과는 블루베리의 섭취가 근분화에 부정적인 영향을 미친다는 가능성을 보여주는 바이다.

감사의 글

이 논문은 충남대학교 자체연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Choi MH, Shin HJ. Anti-oxidative and anti-elnogenesis effects of buleberry extract. *Kor J Aesthet Cosmetol*. 2015 ; 13(2) : 261-6.
- Retamales JB, Hancock JF. *Blueberries*. Wallingford: CABI Publishing. 2012 : 51-67.
- Westwood MN. *Temperate-zone pomology*. Portland: Timber Press. 1993 ; 100-1.
- Wolfe KL, Kang X, He, X, Dong M, Zhang Q, Liu RH. Cellular antioxidant activity of common fruits. *J Agric Food Chem*. 2008 ; 56 : 8418-26.
- McLeay Y, Barnes MJ, Mundel, T. Effect of New Zealand blueberry consumption on recovery from eccentric exercise-induced muscle damage. *J Int Soc Sports Nutr*. 2012 ; 9(1):19.
- Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J Agric Food Chem*. 2010 ; 58(7) : 3996-4000.
- Riso P, Dorothy KZ, Cristian DB, Daniela M, Jonica C, Peter M, Renata DM. Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *Eur J Nutr*. 2013 ; 52(3) : 946-61.
- Whyte AR, Schafer G, Williams CM. Cognitive effects following acute wild blueberry supplementation in 7-to 10-year-old children. *Eur J Nutr*. 2016 ; 55(6) : 2151-62.
- Miller MG, Hamilton DA, Joseph JA, Shukitt-Hale B. Dietary blueberry improves cognition among older adults in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr*. 2018 ; 57(3) : 1169-80.
- Neto CC. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2007 ;51(6) : 652-64.
- Sun XH, Zhou TT, Wei CH, Lan WQ, Zhao Y, Ying J, Pan YJ, Wu VCH. Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. *Food Control*. 2018 ; 94 : 155-61.
- Park YJ, Ronita B, Robert DP, Chen JJ. Antibacterial activities of blueberry and muscadine phenolic extracts. *JFS*. 2011 ; 76(2) : M101-5.
- Guglielmetti S, Fracassetti D, Taverniti V, Del Bo' C, Vendrame S, Klimis-Zacas D, Arioli S, Riso P, Porrini M. Differential modulation of human intestinal bifidobacterium populations after consumption of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink. *J Agric Food Chem*. 2013 ; 61(34) : 8134-40.
- Valentina T, Daniela F, Cristian DB, Claudia L, Mario M, Dorothy KZ, Patrizia R, Simone G. Immunomodulatory effect of a wild blueberry anthocyanin-rich extract in human Caco-2 intestinal cells. *J. Agric. Food Chem*. 2014 ; 62(33) : 8346-51.
- Bushway RJ, Mc Gann DF, Cook WP, Bushway AA. Mineral and vitamin content of lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *JFS*. 1983 ; 46(6) : 1878-1878.
- Trenerry VC. The application of capillary electrophoresis to the analysis of vitamins in food and beverages. *Electrophoresis*. 2001 ; 22(8) : 1468-78.
- Rodarte A, Eichholz I, Rohn S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*. 2008 ; 109(3) : 564-572
- Cho WJ, Song BS, Lee JY, Kim JK, Kim JH, Yoon YH, Choi JI, Kim GS, Lee JW. Composition analysis of various blueberries produced in Korea and manufacture of blueberry jam by response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2010 ; 39(2) : 319-23.
- Rimando AM, Nagmani R, Feller DR, Yokoyama W. Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor α -isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *J Agric Food Chem*. 2005 ; 53(9) : 3403-7.
- Ghosh D, Konishi T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007 ; 16(2) : 200-8.
- Choi MH, Jeon YJ, Shin HJ. Anthocyanin analysis of pressure-extracted Korean blueberry juice and in vitro anti-inflammatory in RAW267. 4 Cell line. *KSBB Journal*. 2015 ; 30(4) : 191-6.
- Min S, Hayley L, Andrew JM, Xiao S. Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation. *Journal of Functional Foods*. 2017 ; 30 : 16-29.
- Konigsberg IR. Clonal analysis of myogenesis. *Science*. 1963 ; 140(3573) : 1273-84.
- Mintz B, Baker WW. Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocitrate dehydrogenase synthesis. *PNAS*. 1967 ; 58(2) : 592-8.
- Chen E. *Current Topics in Membranes*. Cambridge: ELSEVIER Academic Press INC. 2011 : 235-58.
- Shinn-Thomas JH, Mohler WA. New insights into the mechanisms and roles of cell-cell fusion. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011 ; 289 : 149-209.

27. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Bio Chem*, 2002 ; 277(51) : 49831-40.
28. Henningsen J, Rigbolt KT, Blagoev B, Pedersen BK, Kratchmarova I. Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. *mol cell proteomics*, 2010 ; 9(11) : 2482-96.
29. Yoon, BR, Kim YH, Lee JS, Honh HD, Rhee YK, Cho CW, Kim YC, Lee OH. Protective effect of ferments of hot-water extract mixture from rhodiola sachalinensis and red ginseng on oxidative stress-induced C2C12 myoblast. *KJFCS*, 2013 ; 26(3) : 485-91.
30. Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *Clin Geriatr Med*, 2011 ; 27(3) : 337-9.
31. William JE. Skeletal muscle loss: Cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am J Clin Nutr* 2010 ; 91 : 1123S-7S.
32. Marcell TJ. Sarcopenia: causes, consequences, and preventions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2003 ; 58(10) : M911-6.
33. Balagopal P, Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS. Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am J Physiol*, 1997 ; 273(4) : E790-800.
34. Volpi E, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB, Wolfe RR. Basal muscle amino acid kinetics and protein synthesis in healthy young and older men. *JAMA*, 2001 ; 86(10) : 1206-12.
35. Brzoska E, Przewozniak M, Grabowska I, Janczyk-Ilach K, Moraczewski J. Pax3 and Pax7 expression during myoblast differentiation in vitro and fast and slow muscle regeneration in vivo. *Cell Biol Int*, 2009 ; 33(4) : 483-92.
36. Stern-Straeter J, Bonaterra GA, Kassner SS, Zügel S, Höormann K, Kinscherf R, Goessler UR. Characterization of human myoblast differentiation for tissue-engineering purposes by quantitative gene expression analysis. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011 ; 5(8) : e197-206.
37. Visser M, Harris TB, Langlois J, Hannan MT, Roubenoff R, Felson DT, Wilson PW, Kiel DP. Body fat and skeletal muscle mass in relation to physical disability in very old men and women of the framingham heart study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1998 ; 53(3) : M214-21.
38. Roubenoff R, Parise H, Payette HA, Abad LW, D'Agostino R, Jacques PF, Wilson PW, Dinarello CA, Harris TB. Cytokines, insulin-like growth factor 1, sarcopenia, and mortality in very old community-dwelling men and women: the Framingham Heart Study. *Am J Med*, 2003 ; 115(6) : 429-35.
39. Bornsek SM, Ziberna L, Polak T, Vanzo A, Ulrich NP, Abram V, Tramer F. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry*, 2012 ; 134(4) : 1878-1884.
40. Jun HI, Jang SW, Oh HH, Jeong DY, Song GS. Antioxidant activity and anthocyanin analysis of blueberry with different extraction conditions. *KJFN*, 2019 ; 48(11) : 1223-32.
41. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007 ; 8(10) : 813-24.
42. Miano JM. Mammalian smooth muscle differentiation: origins, markers and transcriptional control. *Results Probl Cell Differ*, 2002 ; 38 : 39-59.
43. Timon Seeger CC, Ioannis Karakikes, Joseph C. Cardiac electrophysiology : from cell to bedside. Cambridge: ELSEVIER Academic Press INC, 2018 : 284-92.