

한우의 등심과 사태조직 유래 근육위성세포의 성장단계별 유전발현 차이 분석

Transcriptomic Analysis of the Difference of Bovine Satellite Cell Between *Longissimus dorsi* and *Semimembranosus* on Hanwoo Muscle Tissues

김휘재

H. J. Kim
CJ제일제당
융합기술연구소1
hj.kim136@cj.net

강동훈

D. H. Kang
한국농수산대학
한우학과2
kkongchi24@naver.com

박보혜

B. H. Park
한국농수산대학
한우학과2
wodls9441@gmail.com

이원영

W. Y. Lee
한국농수산대학
한우학과2
leewy81@korea.kr

최지환

J. H. Choi
한국농수산대학
한우학과2
jchoe@korea.kr

정기용 *

K. Y. Chung*
한국농수산대학
한우학과2
cky95@korea.kr

Abstrat

The skeletal muscle development of Hanwoo steer has been processed in the prenatal and postnatal periods. Bovine satellite cell located in perimysium of muscle tissues has differentially distributed in peripheral tissues. The study of postnatal development of satellite cells can help understand the genetic and functional regulation of meat characteristics. Factors affecting muscle size increase are related to the accumulation of DNA or synthesis of RNA proteins. In this study, we observed muscle development and differentiation after culturing bovine satellite cells derived from longissimus dorsi and semimembranosus regions of Hanwoo muscle tissue. In addition, RNA sequencing data were analyzed for differentially expressed genes (DEG) involved in intracellular muscle development and growth. The DEG of the two muscle tissues were compared according to 1day, 2day, 4day, and 7day. The overall gene expression level was confirmed by the heat map. Gene Ontology (GO) classification method was used to compare the expression level of gene groups affecting LD and SM development. The histology of GO was consistent with the time-cause change of LD and SM cell morphology. SM showed more active skeletal muscle development than LD. Even within the same time, SM expressed more genes than LD, thus synthesizing more muscle fibers

Key words : Hanwoo, Muscle satellite cells, RNA sequencing, Myogenesis

*교신저자

1 Institute of Integrated Technology, CJ Blosson Park

2 Department of Beef Science, Korea National College of Agriculture & Fisheries

I. 서론

한우산업은 1990년대 이후 수입육과 차별화하기 위해 고급육을 지향하고 있다. 지속적인 개량과 고급육 사양기술의 개선으로 거세한우의 육질 등급은 향상되어 육질1++등급 이상 출현율은 19년 대비 10.1% 이 향상되었다 (KAPE, 2020). 하지만 고급육 생산을 위한 사료비 증가에 따른 두당 생산비 증가로 효율적인 사양방법과 육량증가 기술 개발이 요구되고 있다. 소의 도체 조성은 체중이 증가함에 따라 지방 비중이 증가하는 반면에 근육과 뼈의 비중은 감소한다고 보고되었다 (Berg and Butterfield 1986). 축산물의 주요 생산물은 동물의 근육이며, 그 근육의 크기와 육질에 따라서 농가의 소득의 규모가 결정된다. 선행 연구에 의하면, 근육 크기 증가에 영향을 미치는 DNA 축적은 근섬유 사이에 존재하는 근위성세포의 증식과 발달과 연관이 있다 (Johnson and chung 2007). 근위성세포의 수는 출생 시 그 수가 가장 많이 존재한다고 보고되는데, 근위성세포군은 동물의 연령이 많아질수록 전체 세포 수가 감소하는 것으로 알려져 있다. 근위성세포 핵 수는 신생 동물 근육 핵의 30% 정도 차지하고, 성숙한 동물에서는 근육 핵이 2~10%로 근위성세포의 수가 줄어들었다 (Gibson and Schultz *et al.*, 1983; white *et al.*, 2010; Rajesh *et al.*, 2011). 돼지의 경우에 근육의 부위별 유전자 발현에 대한 특징으로 비교를 해봤을 때, 형태나 근섬유 유형은 비슷하나 근육조직에 따라 확연하게 차이를 보이는 것을 알 수 있다 (Herault *et al.*, 2014). 따라서 성장단계별 소의 근육성장 기작을 정확히 이해하기 위해서는 세포수준의 근육발달 기전을 기능분석을 통해서 밝혀야 한다. 본 연구는 한우의 근육내 유전자군 발현기전 분석을 위해 등심(LD)과 사태(SM) 조직의 근위성세포를 분

리하여 배양조건에서의 근섬유 유형을 분석하고, 근육 비대와의 연관성을 확인하여 한우의 근위성 세포와 근육 성장과의 상관관계를 밝혀내고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 채취

세포배양에 사용된 시료는 0~3개월령의 폐사한 한우 송아지 3마리를 이용하였으며, 등급판정부위인 제13번 흉추와 제1번 요추 사이의 등심 (Longissimus dorsi, LD)과 사태부위 (Semimembranosus muscle, SM)의 근육을 200g 정도 채취하여 1X Phosphate Bufferd Saline (PBS) + 3X antibody 시약에 보존한 채로 실험실로 이동하였다. 이후 clean bench 내에서 muscle satellite cell을 분리하는 실험을 수행하였다.

2. 근위성세포 분리

세포 추출 과정은 채취 된 근육조직(LD, SM)을 scissors (Solco, Korea)를 이용하여 세절하였으며, pronase가 첨가 된 earle's balanced salts를 이용하여 근육조직 사이에 존재하는 bovine satellite cells (BSCs)을 추출했다. 추출 된 BSCs를 75 flask에 분주하여 FBS (Fatal Bovine Serum) in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배양액에 배양하였다.

3. 근위성세포 배양 및 분화

BSCs를 최대한으로 증식시키기 위해 2일 간격

으로 새로운 10% FBS in DMEM 배양액으로 교체하였으며, 75 flask에 BSCs가 60~70% 증식했을 때 계대배양을 하면서 6 well plate로 옮겨주었다. 분화는 각 well에 60~70% 정도 증식했을 때, 3% HS (Horse serum) in DMEM 배양액으로 교체하여 분화 자극을 주었다. 이후 BSCs를 배양하면서 시간에 따른 근육 분화의 형태학적 변화를 관찰하였다.

4. 근위성세포 면역형광염색

형태학적으로 관찰한 BSCs의 6 well plate에 존재하는 LD와 SM을 1 Day, 2 Day, 4 Day, 7 Day로 성장단계별에 따라 면역형광염색을 진행하였다. 6 well에 존재하는 배양액을 제거 후 PBS를 이용하여 세척하였다. 6 well에 4% paraformaldehyde를 이용하여 BSCs를 상온에서 10분간 고정과정을 진행하였다. Permeabilization을 하기 위해 0.1% Triton X-100을 6 well에 분주한 뒤 상온에서 10분 incubate 하였다. Mixed serum(donkey, rabbit, goat) 10% + BSA 1% + 22.52 mg/mL glycine in PBST (PBS+ 0.1% Tween 20) 분주하여 blocking을 진행하였다. 1/200로 희석한 Myosin Light Chain 2 Primary antibody in PBST를 분주하였으며, 1/2000로 희석된 secondary antibody를 실온의 어두운 환경에서 각 1시간 동안 incubate 하였다. Hoechst 33258를 1/1000로 희석하여 분주하고 1분간 어두운 환경에서 incubate 한 뒤, PBS를 이용하여 세척 후 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

5. 근위성세포 면적측정

LD와 SM을 성장단계별에 따라 형태학적 발달

을 알아보기 위해 myotube의 면적을 측정하였다. 근위성세포 면적 측정은 분화 자극을 준 후 myotube가 형성되기 시작한 시점인 3 Day부터 측정을 하였으며, myotube가 최대한으로 이루지는 시점인 7 Day까지 측정하였다. 측정 방법은 면역형광염색된 시료를 형광현미경을 이용하여 사진을 촬영하였으며, 현미경 배율에 맞는 scale bar의 크기를 이용하여 image J 프로그램으로 사진 내 myotube 면적을 환산하여 측정하였다.

6. RNA 추출 및 cDNA 합성

한우의 LD와 SM의 근위성세포를 6 well plate에 배양한 뒤, 1 Day, 2 Day, 4 Day, 7 Day 시점에서 trizol reagent를 500 μ l 분주하여 cell을 용해시켰다. 새로운 micro tube에 옮긴 뒤 chloroform 100 μ l를 첨가하여 15초 동안 vortexing 하였다. 혼합용액을 원심분리기를 이용해 12000 rpm에 15분간 원심분리하여 상층액만 새로운 tube에 옮겼다. 상층액이 들어있는 micro tube에 RNA를 침전시키는 isopropanol을 100 μ l 첨가했다. Pellet이 생긴 것을 확인 후 상층액을 제거하였으며, 70% ethanol로 세척하였다. Ethanol을 제거 후 건조 시켰으며, diethylpyrocarbonate (DEPC)를 첨가하였다. Nanodrop을 이용하여 RNA 농도를 측정한 후 cDNA synthesis kits (ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover, TOYOBO)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

7. RNA sequencing

BSCs가 분화하는 시간 흐름에 따라서 1 Day, 2 Day, 4 Day, 7 Day로 나누어 RNA expression

정보를 얻었다. 먼저 합성된 cDNA의 유전자 발현량을 등심과 사태근육, 각 일자 별, 샘플 별로 총 24개의 샘플을 Illumina® TruSeq™을 이용하여 측정했다. Reference genome (*Bos Taurus* Ensembl UMD3.1)을 기반으로 FastQC v0.10.0 (Andrews 2010)를 이용하여 RNA sequencing data의 품질검사를 수행하였다. Data를 Filtering 하기 위해 Trimmomatic v0.33 (Bolger *et al.* 2014)를 통해 bad quality를 가진 bases를 제거하였다. TopHat v2.0.11 (Bowtie2 version 2.1.0)를 이용하여 RNA-Seq reads를 정렬한 다음 mapping 결과를 분석하여 exon 사이의 접합을 확인하였다 (Langmead and Salzberg, 2012). Cufflinks v2.1.1는 transcripts를 모으고, 이들의 발현량을 추정하고, 정렬된 RNA-Seq를 받아들여서 Cuffmerge, Cuffdiff을 통해 RNA sequencing data를 산출하였다 (Trapnell *et al.*, 2012).

8. 통계분석

전체 유전자의 카테고리화를 위하여 Gene Ontology (GO)를 이용하여 분석을 진행했다. Goseq 1.22.0 (Young *et al.*, 2010)을 이용하여 cellular component, molecular function, biological process 3가지 카테고리로 분류하여 분석하였다 (Gene Ontology Consortium, 2008). 해당 Gene의 기능과 chromosome의 위치 등을 AmiGO2를 통해 확인하였다(Carbon, S. *et al.*, 2008). 해당 Gene의 발현량은 R x64 3.6.2와 SAS® 9.3 University Edition software를 이용하여 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 한우 근육위성세포의 발달단계별 형태학적 분석

한우 송아지의 등심과 사태 부분 근육 시료를 채취하고, 근위성세포를 분리한 뒤 배양하면서 근섬유 형성과정을 시간대 별로 형태학적 관찰하였다. 근육세포 plating 24시간 뒤 washing 단계를 거친후, 75 flask 바닥에 plating 된 BSCs은 각각 독립된 세포로 존재하는 것을 확인할 수 있다. 분리 3일 후, 근육 위성 세포가 증식하여 세포가 군집을 형성한 것을 확인할 수 있었다. 75 Flask에서 증식과정을 거치고, 6 well로 2×10^4 cells/well로 passage를 했다. 6 well에 평균적으로 60~70%까지 배양한 뒤 분화자극을 주는 3% Horse serum (HS)을 처리했다. 분화자극 1 Day에서는 세포가 바닥에 나열되어 존재하는 것을 볼 수 있다 (Fig. 1, A). 분화 자극 4Day에서는 되는 시점에서 BSCs끼리 작은 fiber를 형성하는 모습을 확인할 수 있었다 (Fig. 1, C). 분화 자극 7 Day에서는 바닥에 붙어서 작은 fiber들이 fusion되어 4 Day보다 더 큰 섬유를 형성하는 것을 확인했다 (Fig. 1, D). 분화 자극 후 7일이 되는 시점에서는 근육섬유들이 바닥에서 떨어지면서 입체적인 구조의 근섬유를 형성하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1, D).

형성된 근섬유의 발달을 정확히 알아보기 위해 3, 4, 7일의 근섬유 크기를 수치화 하였다. Fig. 2는 붉게 염색된 근섬유를 image J 프로그램을 이용하여 측정한 사진이다. 근위성세포의 근섬유가 형성되기 시작하는 시점인 3일차(Fig. 2, A)부터 4일차(Fig. 2, B), 7일차(Fig. 2, C)까지 근섬유 면적을 scale bar 크기를 대입하여 측정하였다.

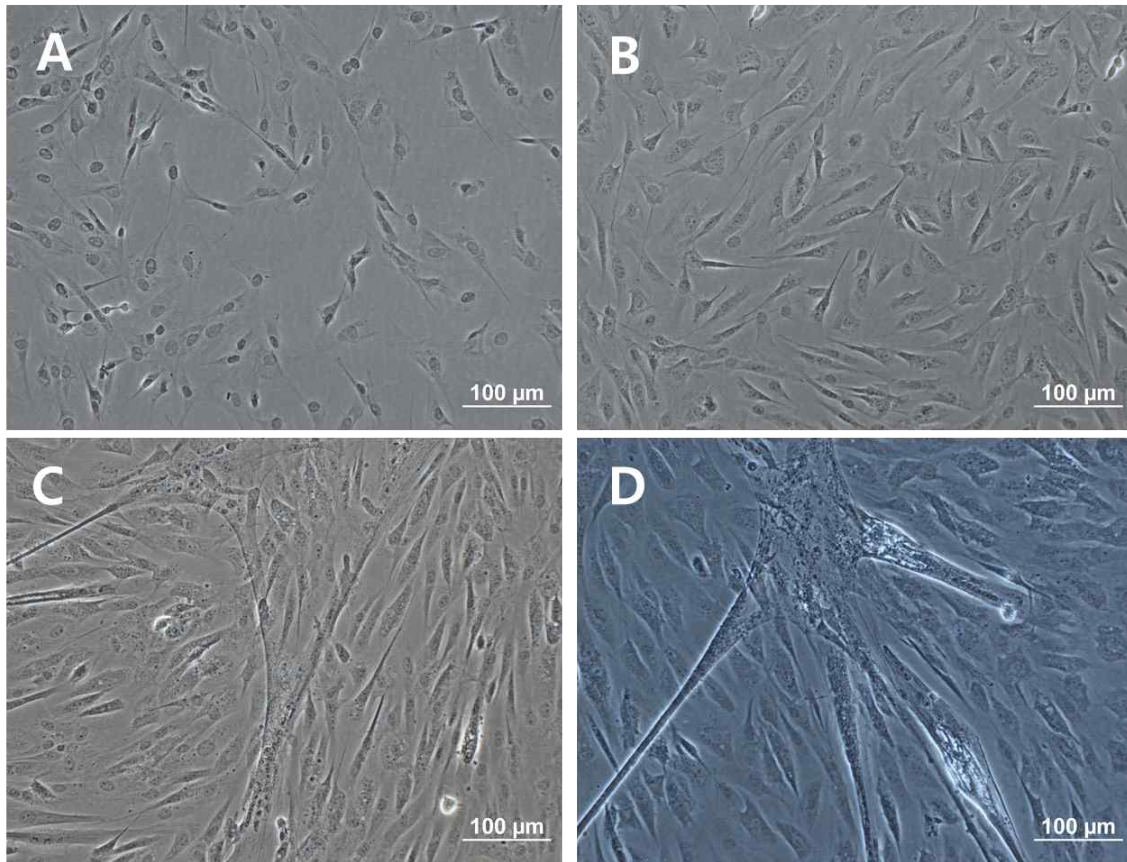


Fig. 1. Phase contrast image of BSC during differentiaion in Hanwoo muscle tissues on days 1, 2, 4, and 7



Fig. 2. Myotube area of BSC on days 3, 4 and 7 in Hanwoo SM and LD tissues

Fig. 3에 근위성세포의 형태학적 발달을 수치로 환산하여 비교하였다. 등심과 사태 근위성세포의 조직간의 근섬유 발달 차이가 나타났고 ($p<0.01$), 등심유래 근위성세포의 분화속도가 더 높게 나타났다. 시간 흐름에 따라 발달은 4일후가 가장 높은 근섬유 분포가 나타났고 7일에는 감소하는 것으로 보인다($p<0.01$). 세포의 근섬유 크기는 20X의 현미경 이미지를 무작위 5곳을 선정하여 평균으로 평가하였다. 선행연구에 따르면 등심과 사태 근육 유래 세포 모두 시간에 따른 크기 증가폭이 적정시간 후 감소하는 것으로 나타났다 (de las Heras-Saldana *et al.*, 2019). 선행연구

와 유사하게 본 연구에서도 한우의 근육유래 근위성세포의 근섬유 발달은 분화처리후 4일 이후에는 감소하는 것으로 나타났다. 근위성세포는 성장호르몬 또는 급격한 근육의 손상에 영향을 받아 증식이 이루어진다(Johnson *et al.*, 2012). In vitro 시스템에서 동일한 seeding rate(2×10^4 cells/well)으로 배양된 한우 등심과 사태유래 근위성 세포의 시간에 따른 분화는 4일 이후로 포물선을 그리며 감소하여 배양시스템에서의 근위성세포의 형태학적 변화는 4일째가 가장 높은 분화도를 나타내었다.

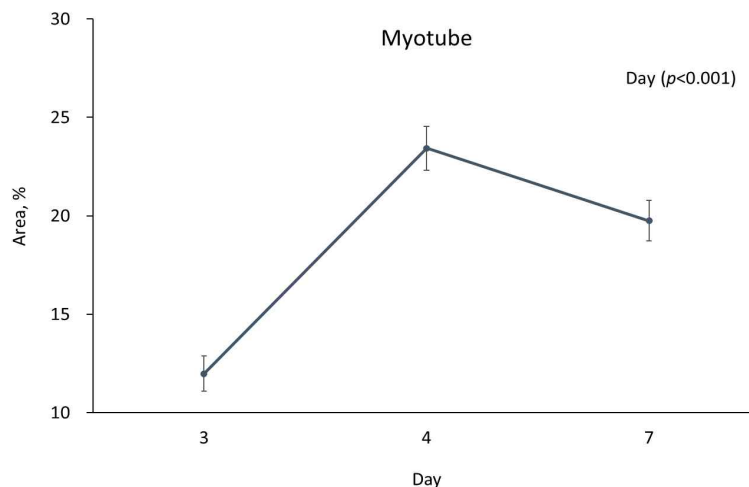


Fig. 3. Myotube area of BSC on days 3, 4 and 7 in Hanwoo muscle tissues

2. 등심과 사태 근위성세포의 발달단계별 면역형광염색 분석

등심과 사태 근위성세포의 분화의 시간 흐름에 따른 변화를 면역형광염색 방법을 통해 확인하였다 (Fig. 4), (Fig. 5) 두 조직의 근위성세포에 분화 자극을 준 뒤, 1 Day, 2 Day, 4 Day, 7 Day로 염색을 진행하였으며, 근육 섬유의 형성 정도

를 확인하기 위한 지표로 Myosin Light Chain 2 (MLC2)를 이용하였다. MLC2는 근육 수축성 단백질 유전자로 알려져 있다(Lee *et al.*, 1988). 특정 MLC2 mRNA 발현은 심근발달 후반에 심실 영역에서 발견 된다고 알려져 있다 (O'Brien *et al.*, 1993). 이처럼 근육 발달 후반부의 근섬유내에서 주로 발견되는 MLC2 mRNA 발현을 통해 근섬유형성을 확인하였다. 근섬유는 붉은색으로

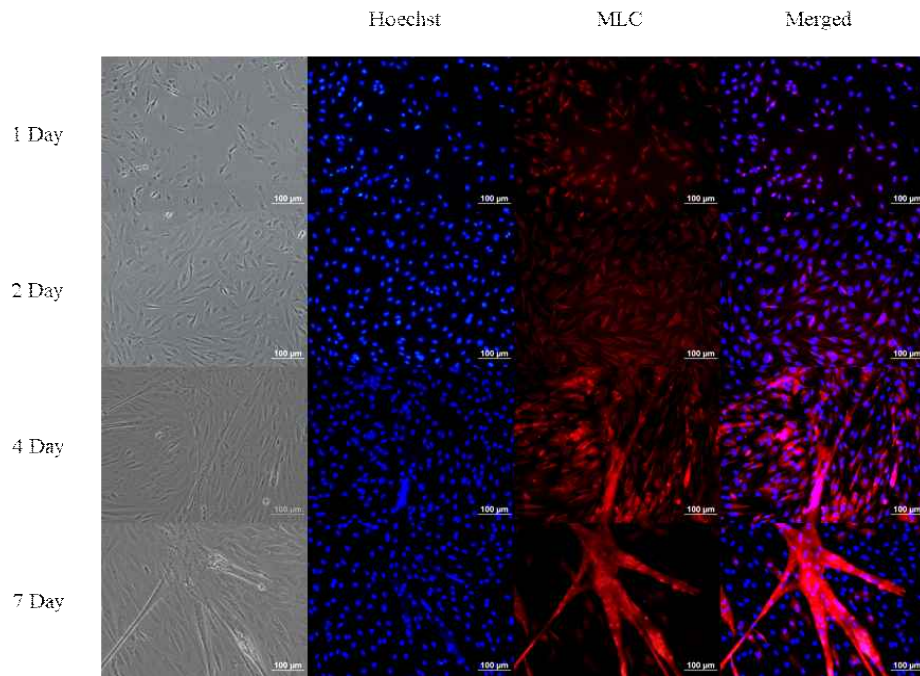


Fig. 4. Immunohistochemistry of BSC during differentiation in Hanwoo *Longissimus dorsi* tissue on days 1, 2, 4, and 7

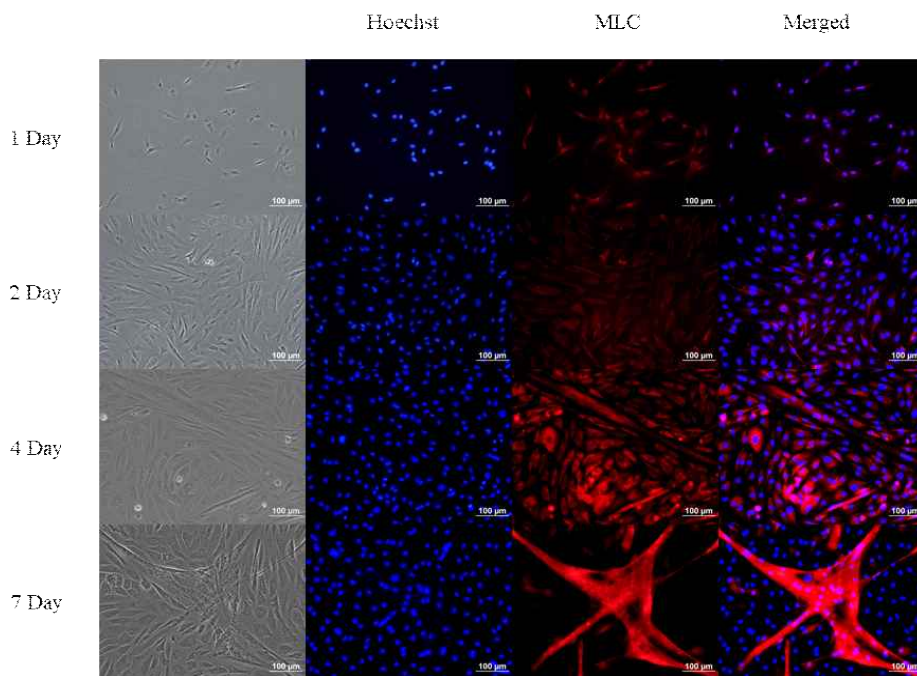


Fig. 5. Immunohistochemistry of BSC during differentiation in Hanwoo *Semimembranosus* tissue on days 1, 2, 4, and 7

염색 되었으며, 핵은 푸른색으로 염색 되었다. 등심과 사태 근육 모두 1, 2 Day에는 핵 주위에서 MLC2 가 발현 되는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 근육 위성 세포들이 분화자극을 받아서 섬유를 형성하기 위해 근섬유의 구성 요소중 하나인 MLC2가 발현이 되는 것을 의미한다. 4 Day에는 섬유가 형성된 곳에 MLC2가 집중적으로 발현되는 것을 확인 할 수 있다. 세포질 뿐만 아니라 근 섬유가 형성되어 형태가 선명하게 보이는 것을 확인하였다. 일부 섬유는 작은 타원형을 가지고 있는데, 각 BSCs에서 섬유를 형성하는 단백질들이 상호작용 하는 것을 알 수 있었다. 그리고 7 Day에서는 근섬유가 굵게 형성되어있는 것을 확인 할 수 있는데, 섬유가 형성된 지점에 MLC2가 발현하는 것을 보아 붉게 발현되는 부분이 근섬유를 형성했음을 알 수 있었다.

4. RNA sequencing

Reference genome (*Bos taurus* UMD3.1)을 기반으로 등심과 사태 유래 근위성세포의 RNA sequencing data를 FASTQC를 이용하여 Properly paired gene quality를 확인 했을 때, 68~84%

정도 mapping이 된 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 6). 각 샘플의 결과가 다른 이유는 해당 개체의 유전적인 차이나 Day에 따른 차이가 있을 수 있으므로, FASTQC를 이용하여 quality를 확인한 후 reference genome에서 확인된 유전자에 대한 정보만을 이용하여 분석을 진행하였다. 분석한 샘플의 정보를 확인하면, *Longissimus dorsi* (LD) 와 *Semimembranosus muscle* (SM)으로 구분되었다. 그리고 분화자극 이후의 Day point, 해당 개체 인식 번호 (3, 4, 5)로 구분하여 properly paired genes percentage를 비교하였다. Illumina® TruSeq™ 을 통해서 확인한 Gene의 수가 총 24616개였으며, 확인된 transcripts의 수는 26740개였다. Table 1에서 LD와 SM 각 Day별 탐지된 유전자 수를 확인 할 수 있었다. 시간이 지날수록 발현되는 유전자의 수가 많아지는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 SM이 LD에 비해서 더욱 많은 수의 유전자를 발현하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 7). BSCs가 분화자극을 받은 이후, 근섬유를 형성하는 과정에서 관여하는 유전자의 수가 다른 것을 알 수 있었다. 분화자극 초기에는 적은 수의 유전자가 관여하고, 실제 근섬유를 형성한 이후에는 BSCs에 많은 수의 유전자가 관여하는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 1. Summary of transcriptomic number of genes expressed by days

Item	LD ¹				SM ²			
	1Day	2Day	4Day	7Day	1Day	2Day	4Day	7Day
Sample numbers	15542	15674	15745	15788	15694	15764	15857	16049

¹ LD : *Longissimus dorsi*

² SM : *Semimembranosus muscle*

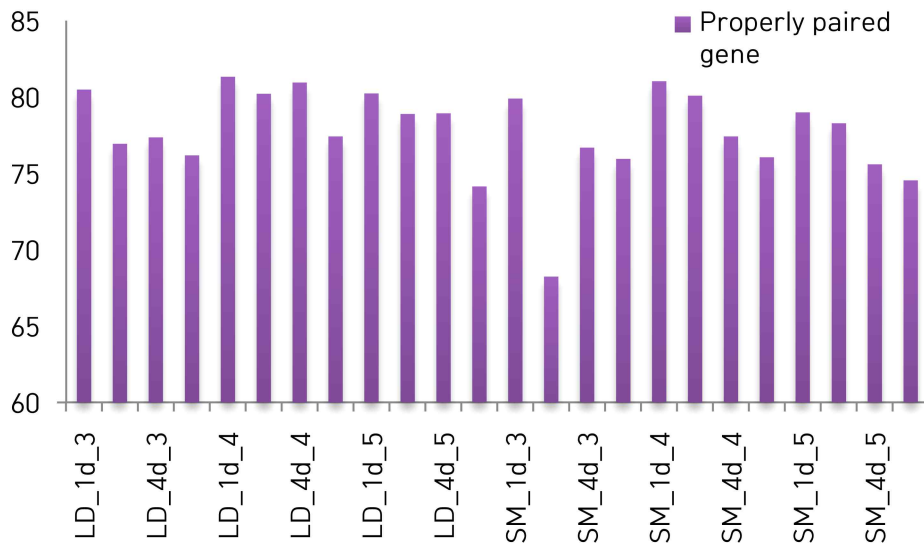


Fig. 6. Properly paired genes percentage of BSC isolated from Hanwoo LD and SM muscle

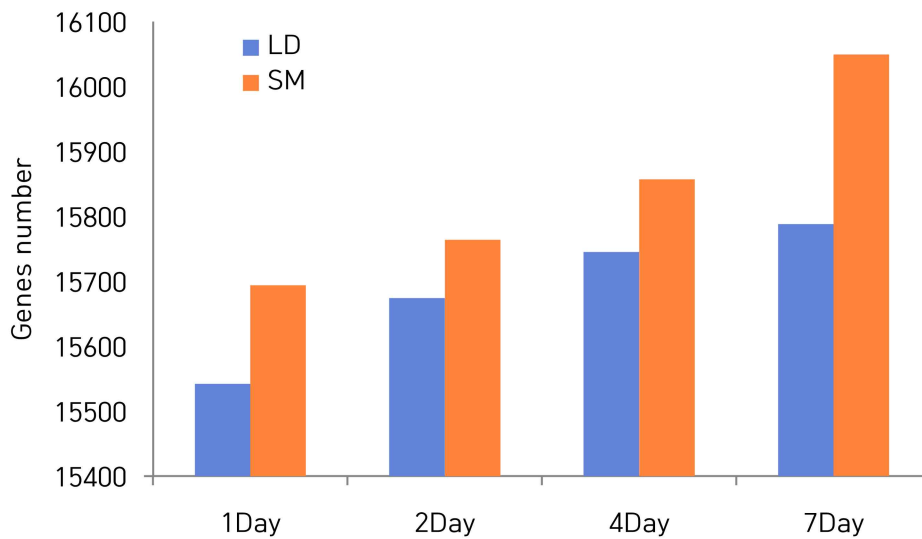


Fig. 7. Transcriptomic numbers of LD and SM BSC cultured by days

5. Heat map

LD와 SM에서 발현된 유전자들의 전체적인 발현 경향을 확인하기 위해서 Heatmap을 이용하였

다(Fig. 8). Log₂ Fold Change cut은 10으로 하고, Log₂ P value cut은 0.00001로 하였다. 세로축은 발현된 유전자들을 GO 카테고리 따라 분류하였다. 가로축은 각 샘플의 GO 카테고리에 따른 발현 수준을 3개의 반복 샘플의 평균 따라 분

류하였다. 총 24616개의 유전자 중, 453개의 유전자가 선별되었다. 분류된 샘플을 살펴보면, LD, SM 의 각 1, 2, 7 Day가 같은 카테고리로 분류되었다. 특이하게도 LD 4Day가 조직별 1, 2Day와 가까운 특징으로 분류되었으며, SM 4Day가 조직별 7 Day와 가까운 카테고리 분류되었다 (Fig. 6). 이는 LD와 SM의 발현 경향이 각 Day에 따라서 다른 유전자 발현이 일어난다는 것을 알 수 있었다. 각각의 클러스터를 살펴보면 1, 2 Day에서는 nucleus, cytoplasm, membrane 등, 세포의 구성요소들과 연관된 GO 카테고리 많이 발현되었고, 근육의 기본 구성요소인 actin, myosin, thin filament, troponin 등의 GO 카

테고리가 많이 발현되는 것을 알 수 있었다. 4, 7 Day에서는 myosin complex, skeletal muscle contraction, troponin complex, skeletal muscle tissue development 등, 근섬유와 연관된 GO 카테고리가 많이 발현되는 것을 알 수 있었다. 특이하게도 SM 7Day에서는 1, 2 Day에 많이 발현되는 유전자들을 확인 할 수 있었다. 이는 현미경으로 SM 7 Day를 관찰 했을 때, 형성된 섬유가 입체적인 구조를 가지면서 well 바닥에서 떨어진 뒤, 바닥에 남아있던 muscle satellite cells이 추가적으로 증식을 하면서 일어나는 현상으로 보여진다. 이는 LD에 비해서 SM의 근육 발달이 더 빠르게 진행된다는 것을 알 수 있었다.

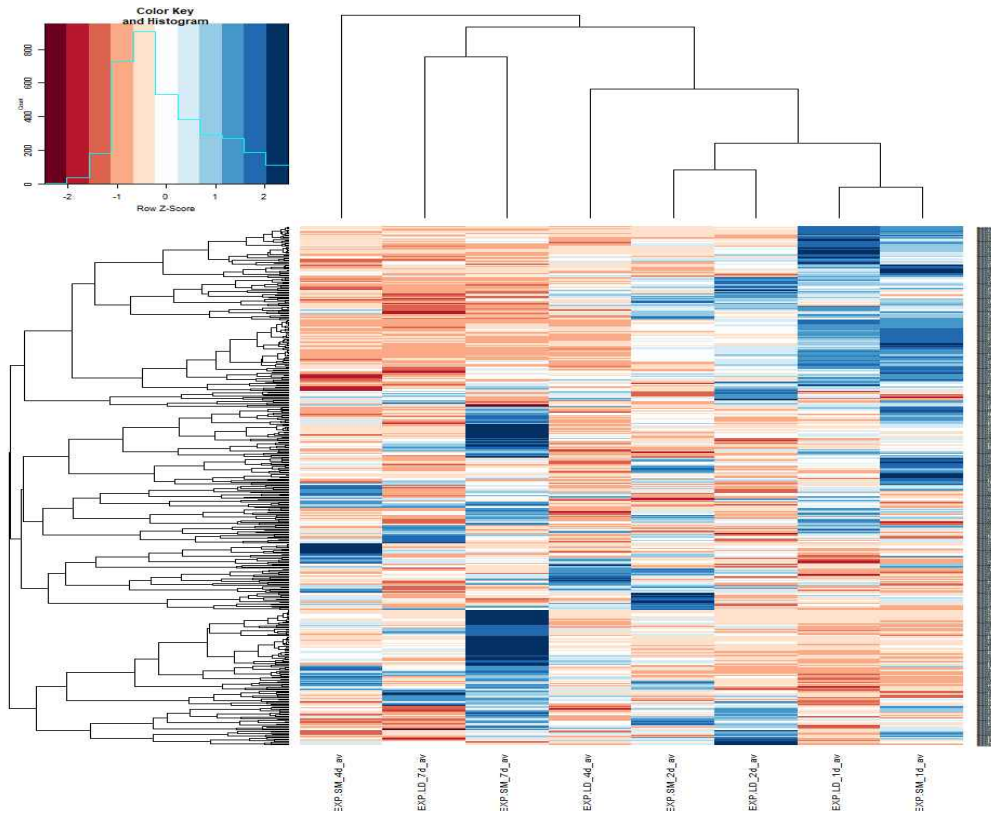


Fig. 8. Heat map with the number of GO genes between contrast of LD and SM tissues vs days 1, 4, and 7

IV. 적요

한우의 성장단계별 부위 근육발달을 이해하는 것은 도체를 개선에 따른 소득증대와 증체율 증가에 따른 생산효율 향상에 긍정적인 영향을 미친다. 본 연구에서는 한우의 등심과 사태 유래 근육위성세포를 분리 후 세포단위의 발달 및 분화를 비교하여 transcriptome 단위의 작용기전을 제시하였다. 한우의 부위별 근육 유래 근육위성세포의 근섬유의 양은 4일에 가장 높게 나타났고 이후 감소하였다. 한우의 근육위성세포의 발달 단계에 따라 발현되는 총 전사체 유전자의 종류는 사태근육 위성세포에서 높게 나타났다. 등심과 사태 근육 유래 위성세포의 발달단계에 따라 유의적인 차등 유전자 453개를 찾아냈고 이를 이용한 기능유전체 분석이 필요하다. 등심과 사태유래 근육위성세포를 이용한 동일조건 분화 비교에서 사태유래 근육위성세포의 분화 시 myosin complex, skeletal muscle contraction, troponin complex, skeletal muscle tissue development 와 같은 근섬유 형성관련 유전자의 발현이 높게 나타나는 것으로 보아 같은 개체의 근육조직에서도 부위별로 차등 발달이 되고 있다는 것을 알 수 있다. 기존 연구에서는 근육의 성장에 대한 이해를 위해 사양과 영양관련 시험이 많이 이루어졌다. 향후 세포단위의 연구들이 많이 이루어져 작용기작에 대한 생물정보 자료를 추가로 적용한다면 한우의 정밀사양을 적용할수 있는 바탕이 마련될 것이다. 또한 근육위성세포의 연구는 추후 동물실험 윤리제도 강화에 따른 비동물 전임상 screening 시험 활용과 대체단백질 산업의 주요 이슈인 배양육 소재 개발 연구와 같이 축산시험연구의 지속적인 확장성에 많은 영향을 미칠 것으로 생각된다.

V. 참고문헌

1. 축산물품질평가원. (2020). 축산물등급판정통계 연보.
2. Berg, R. T. and Butterfield, R. M. (1968). Growth Patterns of Bovine Muscle, Fat and Bone. *Journal of Animal Science*. 27(3): 611-619.
3. Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C. J., Shu, S., Marshall, B., Lewis, S. (2008). AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics*, 25(2):288-289.
4. de las Heras-Saldana, Sara., Chung, K. Y., Lee, S. H. and Gondro. C. (2019). Gene expression on Hanwoo satellite cell differentiation in longissimus dorsi and semimembranosus. *BMC genomics* 20:156
5. Gibson, M. C. and Schultz, E. (1983). Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle & nerve*, 6(8):574-580.
6. Herault, F., Vincent, A., Dameron, O., Le Roy, P., Cherel, P. and Damon, M. (2014). The longissimus and semimembranosus muscles display marked differences in their gene expression profiles in pig. *PLoS one*. 9(5):e96491.
7. Johnson, B. J. and Chung, K. Y. (2007). Alterations in the physiology of growth of cattle with growth-enhancing compounds. *Veterinary Clinics in Food Animal Practice* 23:321-332.
8. Johnson, B. J., Smith, S. B. and Chung, K. Y. (2014). Historical overview of the effect of β -adrenergic agonists on beef cattle

- production. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 27:757-766.
9. Lee, H. R., Henderson, S. A., Reynolds, R., Dunnmon, P., Yuan, D. and Chien, K. R. (1988). Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *Journal of Biological Chemistry*. 263(15):7352-7358.
10. O'Brien, T. X., Lee, K. J. and Chien, K. R. (1993). Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(11):5157-5161.
11. Rajesh, R. V., Jang, E. J., Choi, I. H., Heo, K. N., Yoon, D. H., Kim, T. H. and Lee, H. J. (2011). Proteomic analysis of bovine muscle satellite cells during myogenic differentiation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 24(9):1288-1302.
12. White, R. B., Biérinx, A. S., Gnocchi, V. F. and Zammit, P. S. (2010). Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC developmental biology*. 10(1):21.

논문접수일 : 2021년 5월 4일
논문수정일 : 2021년 6월 14일
게재확정일 : 2021년 6월 17일