



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

골격근세포에서 필버톤의  
근육노화 예방 및 개선 효과 연구

Effects of Filbertone  
on Muscle aging Prevention and Improvement  
in Skeletal Muscle Myocytes

울산대학교 대학원

식품영양학과

정수민

골격근세포에서 필버톤의  
근육노화 예방 및 개선 효과 연구

지도교수 안병용

이 논문을 이학석사학위논문으로 제출함

2024년 02월

울산대학교 대학원  
식품영양학과  
정수민

정수민의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원장                      유리나      (인)

심사위원                         안병용      (인)

심사위원                         장유미      (인)

울산대학교 대학원

2024 년 2 월

# 목 차

I 국문요약 .....	I
약어 표 .....	III
List of Table .....	IV
List of Figure .....	V
II 서론 .....	1
A. 필버톤 (Filbertone) .....	1
1. 헤이즐넛과 필버톤 .....	1
2. 필버톤의 생리활성 .....	1
B. 골격근 (Skeletal muscle) .....	3
1. 골격근 .....	3
2. 골격근의 재생 .....	3
C. 근육에서의 노화 (Aging in Muscle) .....	4
1. 근육의 노화 .....	4
2. 근육노화의 임상적 특징 .....	4
3. 근육노화 개선 소재 연구동향 .....	5
D. 근육노화를 일으키는 분자 메커니즘 .....	6
1. 세포노화 .....	6
2. 산화적 스트레스 및 미토콘드리아 기능 이상 .....	8
3. 단백질 합성 및 분해의 불균형 .....	8
E. 스트레스인자 .....	10
1. 독소루비신(Doxorubicin) .....	10
2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Hydrogen peroxide) .....	12
III 실험재료 .....	13
A. 시약 .....	13
B. 기기 .....	13
IV 실험방법 .....	15
A. C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> 세포 배양 및 Filbertone 처리 .....	15
1. 세포배양 및 분화 .....	15
2. 필버톤 처리 .....	15
3. 노화스트레스 유도 .....	15
B. 필버톤의 세포생존력 (Cell viability) 측정 .....	17
1. Methylthiazol Tetrazolium Assay (MTT assay) .....	17
C. 세포실험을 통한 근육노화 예방 및 개선기전 연구 .....	17
1. Western blot 단백질 정량 .....	17

2. RT-qPCR .....	19
3. Senescence associated $\beta$ -galactosidase staining .....	20
D. 통계분석 .....	21
V 결과 .....	22
A. 노화유도 세포모델에서 노화인자의 노화 유도 수준 .....	22
1. 독소루비신 처리 모델의 세포 노화유도 수준 확인 .....	22
2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 처리 모델의 세포 노화유도 수준 확인 .....	24
B. 필버튼의 세포생존력(Cell viability) 측정 .....	26
C. 노화유도 세포모델에서 필버튼의 세포노화 예방 효과 .....	28
1. 독소루비신 .....	28
2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	34
D. 노화유도 세포모델에서 필버튼의 근육관련인자 개선 효과 ...	40
1. 독소루비신 .....	40
2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	45
VI 고찰 .....	50
VII 결론 .....	53
VIII 참고문헌 .....	55
ABSTRACT .....	60
감사의 글 .....	61

## I. 국문요약

**연구 배경 :** 세포에서의 노화는 신체 내의 여러 가지 대사에 영향을 미친다. 특히 근육세포의 노화는 근아세포(myoblast)에서 근관세포(myotube)로의 분화를 억제시켜 근력과 근육량의 감소를 야기한다. 근육의 노화는 신체활동의 감소 및 근골격계 질환과 연관이 있으며, 특히 당뇨병, 고혈압, 심혈관질환과 같은 대사성 질환과도 연관성이 있다고 보고되어진다. 헤이즐넛의 향미 성분인 필버톤(Filbertone)은 비만 및 대사 질환 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 알려져 있으나, 노화 및 근육세포에 미치는 영향에 대해서는 아직 연구되어진 바가 없다.

**연구 목적 :** 본 연구에서는 필버톤이 Doxorubicin과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 스트레스 유도된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 근관세포에서 노화관련인자 및 근육분화인자에 영향을 미침을 통하여 노화근육의 개선에 효과가 있음을 조사하고자 하였다.

**연구 방법:** C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 근아세포를 근관세포로 분화시킨 후, 정상그룹, 스트레스 유도그룹, 스트레스유도+필버톤그룹으로 나누어 각각 처리하여 배양 후 실험을 진행하였다. 세포에 필버톤 처리 후 MTT assay를 통해 세포생존력평가, β-galactosidase staining을 통해 노화관련마커 측정, 세포의 단백질, RNA를 분리하여 노화관련인자, 근육관련인자의 발현 정도를 Western blot과 RT-qPCR 으로 측정하였다.

**연구 결과:** 독소루비신(Dox) 및 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 스트레스를 유도한 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 골격근세포에 필버톤을 처리한 결과 정상그룹과 필버톤 그룹에서 세포에 독성이 없고, 스트레스유도그룹에 필버톤을 처리 시 노화관련인자의 발현 감소 및 근육관련인자의 개선을 관찰 할 수 있다.

**결론:** 위의 결과를 토대로 노화유도된 골격근세포에서 필버톤을 처리 시, 노화관련인자 발현의 감소에 따라 근육관련인자는 개선된다. 이는 필버톤이 골격근 세포의 노화 예방에 도움을 주어 근육노화의 개선에 효과가 있을 것으로 사료된다.

## Abbreviation table

Akt : protein kinase B

AMPK : adenosine monophosphate-activated protein kinase

APS: Ammonium persulfate

CDK1 : Cyclin-dependent kinase 1

CDK2 : Cyclin-dependent kinase 2

CDK4 : Cyclin-dependent kinase 4

CDK6 : Cyclin-dependent kinase 6

E2F : Transcription factor E2F

FBS : Fetal Bovine Serum

FIL : Filbertone

FoxO : Forkhead box O

HS : Horse Serum

MAFbx/Atrogin-1 : a muscle-specific F-box protein

mTOR : mammalian target of rapamycin

MuRF1 : muscle RING finger protein-1

PBS : Phosphate buffered saline

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

RB : Retinoblastoma

ROS : reactive oxygen species

SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype

SDS: Sodium dodecyl sulfate

T-TBS : Tween 20 – Tris buffered saline

## List of Table

Table 1 Antibody information for Western blot ..... 18

Table 2 Mouse Primer sequence used for RT-qPCR analysis ..... 20

## List of Figure

Figure 1	Hazelnut ( <i>Corylus avellana</i> L.) and Chemical structure of Filbertone	2
Figure 2	The steps of myogenic differentiation	3
Figure 3	Cellular senescence mechanism mediated by p53	7
Figure 4	Mechanism of muscle atrophy mediated by MuRF1 and Atrogin-1	9
Figure 5	Doxorubicin-induced mechanism of Myotube atrophy	11
Figure 6	Illustration of Fenton reaction	12
Figure 7	Myoblast Differentiation, Filbertone Prevention & Senescence Induction Process	16
Figure 8	Doxorubicin-induced Cellular senescence in C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes	23
Figure 9	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced Cellular senescence in C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes.	25
Figure 10	Cytotoxic effects of Filbertone on C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes.	27
Figure 11	Effect of Filbertone on Cellular Senescence related protein level in Doxorubicin treated C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes.	29
Figure 12	Effect of Filbertone on Cellular Senescence related gene expression in	

doxorubicin treated C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes. ....	31
Figure 13 Effect of Filbertone on Senescence Associated $\beta$ - galactosidase in Doxorubicin treated C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes. ....	33
Figure 14 Effect of Filbertone on Cellular Senescence related genes expression in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treated C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes. ....	35
Figure 15 Effect of Filbertone on Senescence Associated $\beta$ - galactosidase in Doxorubicin treated C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes. ....	37
Figure 16 Effect of Filbertone on Senescence Associated $\beta$ - galactosidase in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treated C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes. ....	39
Figure 17 Effect of Filbertone on Myogenesis related protein level in Doxorubicin treated C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes. ....	41
Figure 18 Effect of Filbertone on Muscle atrophy related protein level in Doxorubicin treated C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes. ....	42
Figure 19. Effect of Filbertone on Myogenesis related genes expression in Doxorubicin treated C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes. ....	44
Figure 20. Effect of Filbertone on Myogenesis related protein level in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treated C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes. ....	46
Fig 21. Effect of Filbertone on myogenesis related gene expression in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treated C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myotubes. ....	48

## II. 서론

### A. 필버톤 (Filbertone)

#### 1. 헤이즐넛과 필버톤

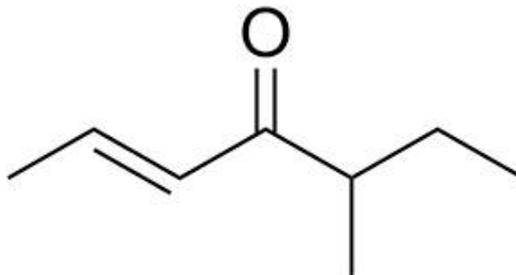
헤이즐넛 (*Corylus avellana* L.)은 지방산, 단백질, 탄수화물, 식이섬유 및 마그네슘, 칼슘 등의 무기질의 영양소와 항산화 효과가 있는 폴리페놀 등 다양한 성분으로 구성되어있다. (Ra et al 2021). 헤이즐넛의 영양 생리학적 연구에 따르면 고 콜레스테롤 혈증 환자에 헤이즐넛을 섭취 시 심혈관 질환의 생체 지표인 총 콜레스테롤 및 중성지방, 체내 염증질환 지표 감소한다고 보고되어진다. (Alasalvar et al. 2012) 필버톤(5-methyl-hept-2-en-4-one)은 헤이즐넛의 주요 향미 성분이다. 과일 및 감귤 향으로 향수제조에 널리 쓰이며, 미국 향료 및 추출물 제조협회 (Flavor and Extract Manufacturers Association, FEMA)에서 안전한 성분으로 인증 받은 바가 있다. (Yu et al. 2021) 필버톤은 헤이즐넛의 유효 성분임에도 불구하고 필버톤의 생리활성에 관한 연구는 아직 부족한 실정이다.

#### 2. 필버톤의 생리활성

이전까지 필버톤은 헤이즐넛의 상품적 품질에 관한 연구가 많이 진행 되어 왔으나, 최근 들어 필버톤의 생리활성에 관한 연구들이 보고되어진다. 현재 까지 보고 된 필버톤의 생리활성은 체중 및 내장지방 감소, 혈당 감소 (Moon et al. 2019), 비만으로 유도 된 시상하부 염증 방지 (Gong et al. 2020), 신경 퇴행성 질환관련 인자 감소 (Park et al. 2023) 등 비만, 퇴행성질환 등 다양한 만성질환의 개선을 유도하는 것으로 알려졌다. 그러나 필버톤이 노화 및 근육 관련인자에 관여하여 근육노화를 개선 및 예방 할 수 있다는 보고되어 있지 않다. 본 연구에서는 필버톤이 스트레스 유도 된 골격근 세포에서 스트레스 인자들을 완화하고 근육관련인자들을 개선함을 통해 근육노화의 예방에 도움을 줄 것을 시사한다.



Hazelnut, *Corylus avellana* L.



Filbertone (5-Methyl-2-hepten-4-one,  $C_8H_{14}O$ )

Figure 1. Hazelnut (*Corylus avellana* L.)  
and Chemical structure of Filbertone

## B. 골격근 (Skeletal muscle)

### 1. 골격근

골격근(Skeletal muscle)은 신체 내에서 가장 많은 비중을 차지하는 조직으로 체중의 40-50%를 차지하며 전체 단백질의 50~75%를 포함한다. (Frotera et al., 2015) 골격근의 질량 (Skeltal muscle mass)은 단백질의 합성과 분해의 균형에 따라 조절된다. 이는 노화나 부상, 질병에 의하여 불균형을 야기할 수 있다. (Musarò.,2020)

### 2. 골격근의 재생

부상 및 손상을 입은 골격근은 재생 할 수 있는 능력을 가진다. 근육줄기세포는 빠르게 증식하여 myoblast의 상태가 되며, myoblast의 활성화는 myogenin, myoD와 같은 근원성 단백질들의 발현을 통해 myotube로의 분화를 유도한다. (Jang, Baik., 2013)

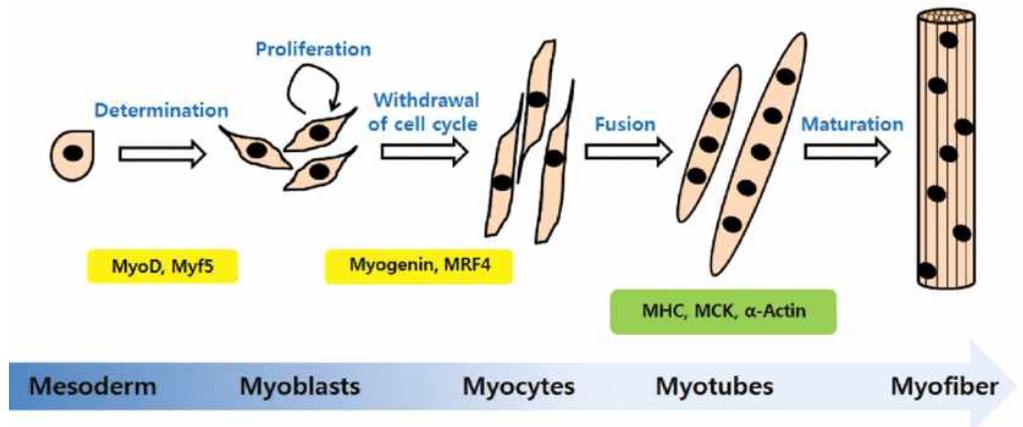


Figure 2. The steps of Myogenic differentiation

Jang, Y.-N. and E. Baik (2013). "JAK-STAT pathway and myogenic differentiation." JAK-STAT 2: e23282.

## C. 근육에서의 노화

### 1. 근육의 노화

인구의 급격한 성장과 함께 인구의 고령화는 세계적으로 주목을 받고 있는 인구 이슈이다. 2022년 기준으로 우리나라 총 인구의 15.7%인 65세 이상 인구는 점차 늘어나 50년 후인 2070년에는 약 46%에 육박 할 것으로 예상된다. 노인인구의 수는 평균수명과 관련이 되는데, 평균수명이 증가함과 달리 건강수명은 상대적으로 적게 늘어나 건강하지 않은 상태로 보내는 노년이 길어지게 되었다. (Woo, 2023) 근육이 노화 될 시 가장 흔히 발병하는 근감소증은 Rosenberg 등에 의해 1989년 처음 연구되어졌으며, 이는 노인성 질환의 대표적 질병이다. (He et al. 2021) 30세 이상부터는 매년 골격근량이 1%씩 감소하며 65세 이상에서는 급격히 감소한다. 노화 됨에 따라 근육은 질량의 감소뿐 아니라 힘, 기능의 저하도 일어나는데, 이러한 근육량과 근기능의 감소를 근감소증 (Sarcopenia)이라 한다. (Heo et al. 2017) Rosenberg에 의해 근감소증의 개념이 처음 등장 할 시에는 노화에 따른 근육량의 감소의 측면만 소개 되었으나, 최근에는 근육량의 감소 및 근력의 감소, 신체 수행력의 감소를 포함한다. (Cruz-Jentoft et al., 2010)

### 2. 근육 노화의 임상적 특징

근육이 노화 할 시 임상적으로 가장 크게 보이는 근감소증은 신체의 허약, 근육 기능의 장애를 수반하여 낙상 및 골절, 고혈압, 당뇨, 심혈관질환 등의 주요 만성질환 발명과 그로 인한 사망의 위험이 커지는 것으로 알려져 있다 (Kang et al., 2020) 신체 수행능력 외에 골격근은 섭취한 포도당 2/3를 인슐린 내로 흡수하여 에너지원으로 사용한다. (Seo et al 2016). 근감소증과 비만을 동반 할 시 상승작용을 하여 심혈관계 질환, 대사이상을 높이는 연구가 보고되어진다. (Choi., 2016) 이에 따라 근감소증에 의한 반복적인 낙상으로 골절위험은 3배, 고혈압은 2.5배, 대사증후군은 2.6배, 심혈관질환은 2.3배 발병 할 확률이 높은 것으로 알려져 있다. (Jung et al., 2016). 근감소증은 2016년 미국 질병통제예방센터(CDC)에 의해 최초로 질병코드(M62.84)를 부여 받으며 질병으로 인정받았다. 2018년 일본, 2021년 대한민국이 질병코드

(M62.5)를 부여하였다.(Chen et al., 2019) 특히 2025년 초 고령 사회를 앞두고 있는 시점에서 근감소증 노인환자의 증가는 의료비 및 장기요양 비용을 급증하게 하는 중요한 사회문제로 대두되고 있다.(Jung et al., 2023) 국민건강영양조사를 기반으로 파악한 근감소증 유병률은 20-39세 연령군이 19.2%, 40-64세 연령군 29.1%, 65세 이상 연령군은 42.3%으로 노년인구와 더불어 청장년층에서도 중요한 건강문제로 대두 됨을 알 수 있다. 근육 노화로 인한 근감소증은 현재 치료제가 없어 예방과 관리가 중요하다. 이를 중재하는 요법으로는 운동, 영양요법, 건강관리 등이 주를 이루고 있다. (Kang et al., 2022)

### 3. 노화근육 개선 소재 연구동향

많은 연구에서 노화근육 개선을 위한 소재 개발에 주목하고 있다. 주로 식이 단백질을 대상으로 진행되어왔으며 최근에는 천연 추출물의 근육 형성 효과와 근육노화 및 근감소증 개선과 치료제로서의 이용 가치를 확인하기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 단백질 외의 급원을 통한 식품소재에서 근감소증 개선소재 연구로는 홍삼의 ginsenoside Rg1을 흰 쥐에게 4 주간 투여 시 gripstrength 를 유의하게 증가시켰다는 연구가 있었으며 (Seo et al., 2018), 오미자 추출물의 항염, 항산화 효과 및 근생성과 골생성 효과를 규명하여 오미자 추출물이 노화로 인한 근감소증과 골다공증 예방에 도움을 줄 수 있음을 확인한 연구가 있다.(Yi et al., 2019) Lactobacillus casei Shirota (LcS)를 SAMP8 마우스에 경구 투여 하였을 때, 장-근육 축 (gut-muscle axis) 기전에 의하여 노인성 근감소증의 완화 및 예방 효과를 확인한 연구가 있다. (Huang et al., 2022) 단백질의 섭취와 근감소증 간의 연관성 연구로는 영양불량이 있고 노쇠한 노인을 대상으로 무작위대조임상시험을 시행하여 12주간의 단백질 보충제 섭취가 근육과 신체기능 개선 효과에 미치는 영향을 1일 체중 1kg당 1.5g의 단백질 섭취 시 근력 향상, 보행속도 향상뿐만 아니라 다양한 노쇠예방에 가장 높은 효과를 나타내어 적절한 단백질 보충제 섭취가 노인성 근감소 및 노쇠 예방에 도움이 될 수 있음을 제시하였고 (Hwang et al., 2018), 이에 따라 대두단백, 유청단백질에 관하여 식품소재들이 연구되어지고 있다.

## D. 근육노화를 일으키는 분자 메커니즘

### 1. 세포노화 (Cellular Senescence)

세포의 노화란 건강한 세포의 한정된 복제능력으로 인한 영구적으로 세포 분열이 중단되는 상태로 Hayflick과 Moorfield에 의해 1961년 섬유아세포의 배양을 통해 세포 복제의 횟수가 유한함을 확인하며 실험실에서 기술되었다. (Di micco et al., 2021) 세포 노화의 원인으로는 텔로미어의 길이가 짧아짐, DNA 손상, 미토콘드리아 기능 저하 등의 내부요인과 화학요법, 산화적 스트레스 등 외부 요인에 있다. 노화가 미치는 여러 가지 영향 중 하나는 골격근의 감소이다. (Sherr et al., 2015) p53-pRb 경로는 노화 세포의 주요 조절인자이다. p53은 종양억제유전자로 세포주기에 관여하여 암세포에서는 암세포를 억제하며 정상세포에서는 세포를 노화시킨다. Rb 단백질의 인산화는 전사인자인 E2F의 방출을 유도하여 세포 주기를 촉진시킨다. Rb 단백질의 인산화 감소는 E2F의 불활성화를 유도하여 DNA 합성과 세포 주기를 G1 시기에서 정지를 유도한다. Rb 단백질의 인산화 감소는 인산화 저해 단백질인 p16과 종양억제유전자인 p53을 통해 전사되는 p21에 의한 cyclin과 cyclin-dependent kinase (CDK) 복합체 활성의 감소를 통해 이루어진다. (Park., 2003) 이는 근아세포에서 근원세포로의 분화과정을 저지하여 근육위성세포의 기능저하를 일으켜 근육의 노화 및 근감소증을 일으킨다. (Kang et al., 2020)

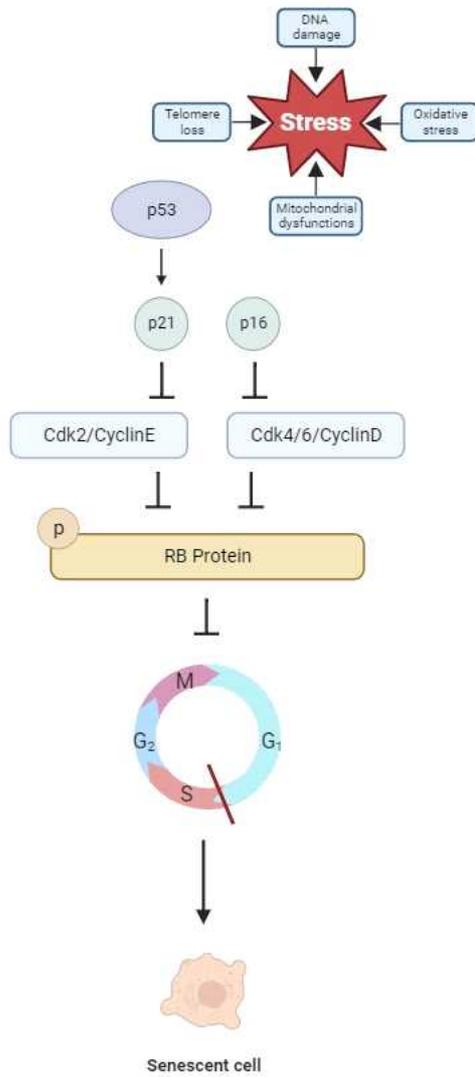


Fig. 3 Cellular senescence mechanism mediated by p53

## 2. 산화적 스트레스 및 미토콘드리아 기능 이상

산화적 스트레스는 산화와 환원의 균형에 이상이 생긴 것을 말한다. 정상적인 생리상태에서는 발생한 ROS를 제거하여 ROS의 균형을 유지한다.(Dene et al.,2019) 고령화 된 골격 근육과 함께 적혈구 환원 호모시스테인 균형유지가 약화되면 단백질, 지질, DNA의 산화 같은 세포 구성요소의 점진적인 산화를 야기한다. (Friguet et al.,2015) 골격근에서 ROS의 축적은 근육에 염증을 일으켜 근기능을 감소 시킬 수 있다. (Lian et al.,2022) 미토콘드리아의 호흡체계를 이해하는 것이 중요하며, 특히 골격근은 미토콘드리아가 풍부한 기관으로, 미토콘드리아의 기능 저하는 ROS의 누적을 가속화하며 근육 노화 및 노인성 근감소증을 유발할 수 있다 (Park.,2003; Daina et al.,2019).

## 3. 단백질 합성 및 분해의 불균형

근육은 신체 내 가장 많은 단백질을 저장하는 기관이다. 근육 내의 단백질과 단백질 대사의 감소는 근육량이 감소하는 골격근 위축을 발생하게 한다. (Kawakami et al.,2020) 이러한 이유로 근 위축은 단백질 대사의 이상으로 단백질 합성과 분해의 이상이 발생하여 단백질 균형이 깨질 시 발생한다. 세포수준에서 주된 골격근 위축 인자는 MuRF1과 Atrogin-1이 있다. 노화 시 세포 내에서 분비 되는 SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) 가 증가할 시 당질 코르티코이드 수용기와 FoxO 전사인자가 MuRF1과 Atrogin-1의 발현을 증가시켜 골격근 위축을 유발한다. 또한 p13K / Akt 의 활성화로 mTOR에 자극이 올 시 S6K, 4E-BP1의 인산화 작용을 통해 단백질 대사가 촉진된다. 위의 신호들은 골격근 위축의 세포대사, 세포성장, 세포생명에 중요한 역할을 한다. (Kang et al.,2020)

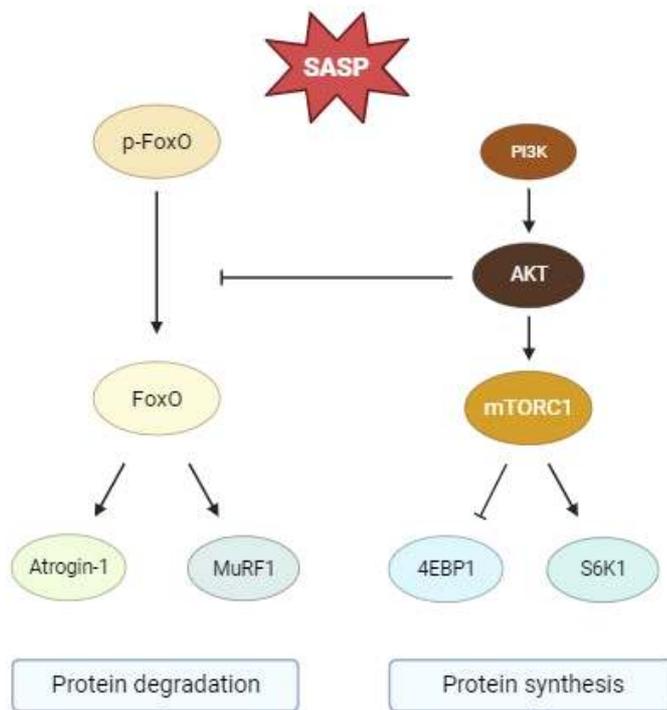


Fig 4. Mechanism of muscle atrophy mediated by MuRF1 and Atrogin-1

## E. 스트레스인자

### 1. 독소루비신 (Doxorubicin)

#### (1) 항암제로서 독소루비신

독소루비신은 anthracycline 계열의 항생제로 급성 백혈병, 림프종 및 종양의 치료에 효과를 주는 항암제이다. (Park et al., 2003) 암세포에 노화를 일으켜 사멸을 유도하는 방법의 화학요법으로 항암효과를 낸다. 그러나 정상세포에도 같은 역할을 하여 정상세포 또한 노화를 일으킬 수 있다. (Bientinesi et al., 2022) 이에 따른 부작용으로는 심한 골수 억제, 탈모, 구강궤양 등이 일어나며 특히 장기적으로는 울혈성 심부전을 야기 할 수 있는 약물이다. (Park et al 2003) 또한 치료를 받는 암 환자의 골격근소모에 관여한다고 보고되어진다 (Gilliam et al., 2012)

#### (2) 세포에 노화를 일으키는 기전

독소루비신(Dox)는 세포 내의 DNA 손상, 산화 스트레스, 텔로미어의 단축 등으로 세포에 스트레스를 일으켜 궁극적으로 노화에 이르게 한다. (Hong et al., 1992) 독소루비신 투여 환자에게서 확인한 근 감소가 보임을 임상적으로 규명한 보고가 있으며(Bonifati et al., 2000) 이를 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 골격근세포에서 분자적으로 규명한 연구에 따르면 독소루비신 미토콘드리아 내막에 높은 친화력을 가지며, 이는 미토콘드리아가 풍부한 심장 및 골격근에서 ROS를 증가시켜 이들을 산화 시킨다. 이는 근육 단백질 분해 인자인 Atrogin-1/MAFbx 와 MuRF1을 상승시킨다고 보고한다. (Gilliam et al., 2012) 독소루비신에 의한 근육 단백질 분해 인자의 상승작용은 근위축(Muscle atrophy)을 일으켜 근감소증에 기여 한다고 사료되어진다.

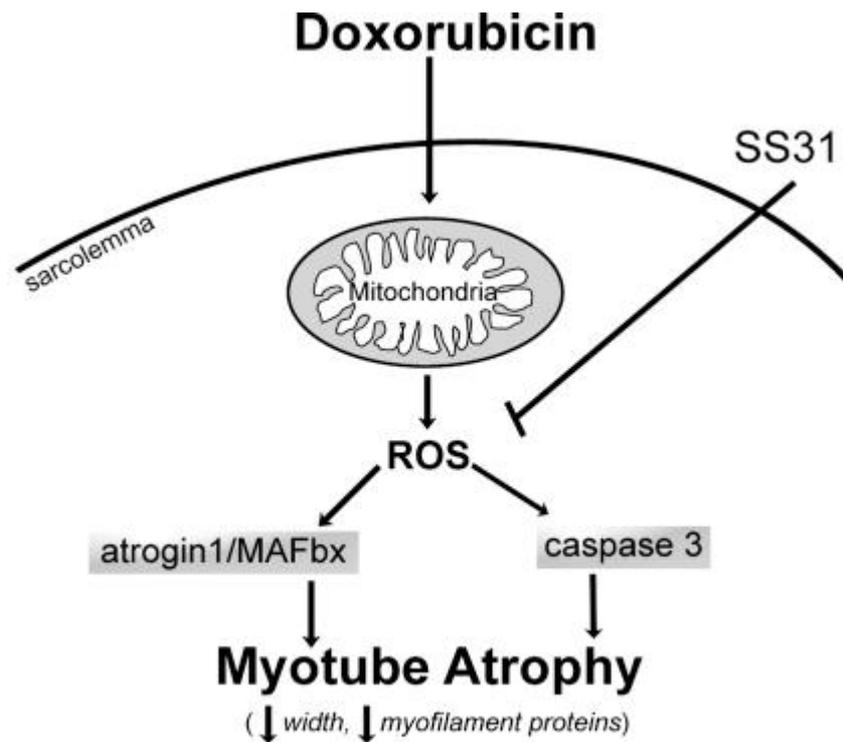


Fig 5. Doxorubicin-induced mechanism of Myotube atrophy

Gilliam LA et al. Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes. Am J Physiol Cell Physiol. 2012 Jan 1;302(1):C195-202.

## 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hydrogen peroxide)

### (1) 세포에 노화를 일으키는 기전

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 세포막 내 유입을 통해 세포 내 ROS를 증가시킨다. ROS는 정상적인 세포 내 활성에서 생성되나, 생성과 제거의 항산화 반응의 불균형으로 세포 내에서 증가 시 세포를 손상시켜 세포의 노화나 질병의 핵심원인이 된다. (Kang et al., 2020) Fenton 반응에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 철(Fe)이 만나면 수산화라디칼을 ( $\cdot\text{OH}$ ) 형성하게 되는데 (Rawi et al., 2020), 특히 골격근의 미오글로빈과 미토콘드리아 내에는 신체 내 철의 10~15%를 포함하며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 수산화라디칼을 형성하기에 용이하다. (Dargelos et al., 2015) 비정상적으로 증가된 ROS는 근육세포의 기능 장애를 유발하여 단백질, 지질 등의 거대분자의 손상을 일으켜 세포의 사멸까지 이르게 한다. (Choi., 2015)

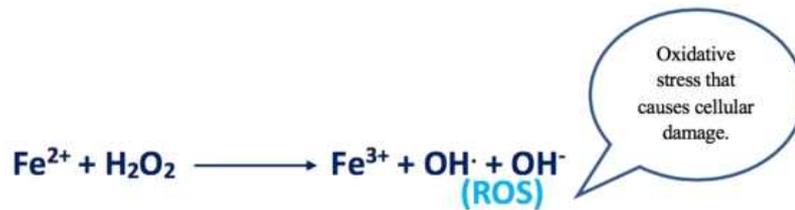


Fig 6. Illustration of Fenton reaction

Al-Rawi, N., B. Anwer, A. Uthman, I. Saad, N. Al-Rawi and N. Al-Rawi (2020). "Magnetism in drug delivery: The marvels of iron oxides and substituted ferrites nanoparticles." Saudi Pharmaceutical Journal.

### III. 실험 재료

#### A. 시약

본 연구에서 사용 된

Filbertone(5-Methyl-2-hepten-4-one, 98%)(#W376108), Ammonium Persulfate(#246814), N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine (TEMED)(#T9281), Ponceau S(#81462), TWEEN 20(#P1379), Protease inhibitor(#P3840), Phosphatase inhibitor(#P0044)는 Sigma-Aldrich(Burlington, MA, USA)에서 구입하였다. High glucose-Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), Penicillin-Streptomycin (P/S) Horse serum (HS), DPBS은 Welgene (Gyungsan, Korea)에서 구입하였다.  $\beta$ -galactosidase staining kit(#9860S)는 Cell signalling (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)(#L11939.03), BCA protein assay kit(#23227), RIPA lysis buffer(#89900)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 30% Acrylamide-bis solution(#1610156)는 Bio-rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다. Skim milk powder (#232100) BD Difco™ (Franklin, NJ, USA)에서 구입하였다. ECL은 Cyanagen (Bologna BO, Italy)에서 Westar Antares (#XLS142)를 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO), 99.8% Ethanol은 Samchun (Seoul, Korea)에서 구입하였다. Trizol은 Invitrogen (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 10X M-MLV buffer 및 M-MLV Reverse Transcriptase (#M1705), dNTP Mix (#U1515), RNase inhibitor, Random primer(#C1181)는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. TB Green® Premix Ex Taq™ II (#RR820)는 Takara (Shiga, Japan)에서 구입하였다.

#### B. 기기

Fusion Solo S (VILVER, France)

PowerPac™ 300 (Bio-rad, Hercules, CA, USA)

Refrigerated centrifuge (Labogene, Korea)

Sonicator (Sonics, Newtown, CT, USA)

Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Winooski, VT, USA)

Takara Thermal Cycler Dice (TaKaRa Bio Inc, Shiga, Japan)

Thermal Cycler Dice® TP 850 (TAKARA, Shiga, Japan)

## IV. 실험 방법

### A. C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포 배양 및 Filbertone 처리

#### 1. 세포 배양 및 분화

실험에 사용된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblast는 DMEM (WELGENE, Gyeongsan, Korea) 배지에 100  $\emptyset$  dish에서 10% FBS(WELCENE, Gyeongsan, Korea) 및 1% Penicillin/Streptomycin (WELGENE, Gyeongsan, Korea)를 첨가한 성장배지를 사용하여 37 °C에서 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 3일 간격으로 계대 배양하였다. 실험을 위하여 12 well plate에  $1.0 \times 10^5$ /well을 seeding 하여 세포를 배양하였다.

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblast를 Myotube로 분화시키기 위해 각 well 면적의 90-100%로 자랐을 때에 2% horse serum 및 1% Penicillin/Streptomycin (WELGENE, Gyeongsan, Korea) 이 첨가된 DMEM 분화배지를 처리하였다. 분화배지는 2일마다 교체하여 3-4일 간 분화를 유도하였다.

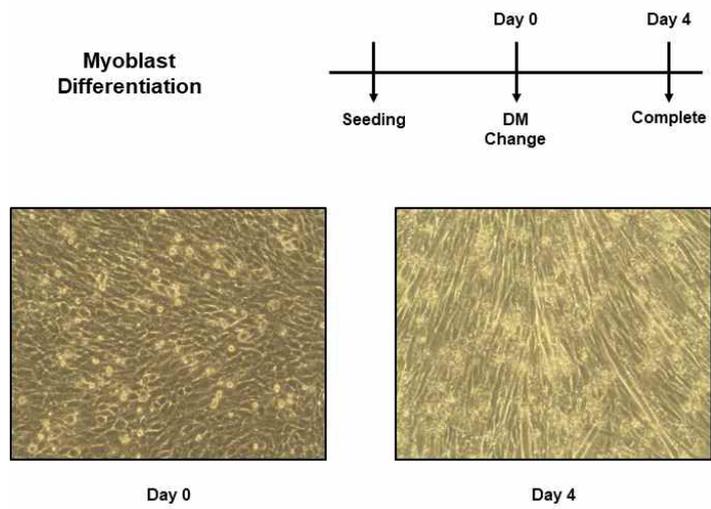
#### 2. 필버톤 처리

Myotubet에 Filbertone(Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)을 각 농도별로 (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) 37°C에서 24h 처리하였다. 세포에 처리한 Filbetone은 DMSO에 1000 X Stock (25mM, 50mM, 100mM)으로 제작 후 -20°C에서 냉동보관하여 사용하였다.

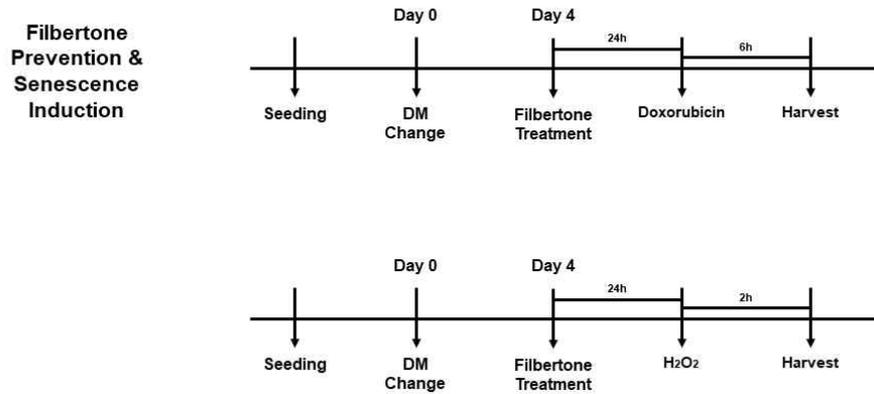
#### 3. 노화스트레스 유도

Filbertone을 전처리한 Myotubet에 독소루비신(Dox) 1  $\mu$ M 6h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750  $\mu$ M 2h의 스트레스 물질을 처리하여 세포에 노화를 유도하였다. 세포에 처리한 독소루비신은 DMSO에 1000 X Stock(1mM)으로 제작 후 -20°C에서 냉동보관하여 사용하였다.

(a)



(b)



\*DM :Differentiation Media

Fig 7. Myoblast Differentiation,  
Filbertone Prevention and Senescence Induction process

## B. 필버톤의 세포생존력 (Cell viability) 측정

### 1. Methylthiazol Tetrazolium Assay (MTT assay)

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblast를 Myotube로 분화시킨 후 25 μM, 50 μM, 100 μM 필버톤(Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. MTT solution (Thermo fisher, Waltham, USA)를 100 μL 첨가하여 1시간 배양 후 시약을 제거하고 DMSO를 100 μL 첨가하여 5분간 shaking으로 Formazan을 녹인 후 Microplate reader (Biotek, Winooski, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다.

## C. 세포실험을 통한 근육노화 예방 및 개선기전 연구

### 1. Western blot 단백질 정량

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblast를 Myotube로 분화시킨 후 25 μM, 50 μM, 100 μM 필버톤 (Burlington, MA, USA)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 그룹에 따라 1 μM 독소루비신 6시간, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750 μM (JUNSEI, Tokyo, Japan) 2시간을 처리한 후 DPBS (WELGENE, Gyeongsan, Korea)로 2회 세척한 다음 Ice 상에서 1% protease inhibitor 및 1% phosphatase inhibitor가 포함된 RIPA buffer (Pierce, Wilthem, MA, USA) Well 당 200 μL로 용해하였다. 용해한 Cell을 Sonication 하여 세포에서 단백질을 추출하였다.

단백질 정량은 Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermofisher, Wilthem, MA, USA) 를 사용하여 BCA assay를 실시 하였다. Well 당 20 - 40 μg의 단백질을 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동 후 (100V, 2h) Nitro Cellulose membrane으로 옮기고(100V, 90min), 0.05% T-TBS에 희석한 5% skim milk (BD, Franklin Lakes, USA)로 1시간 동안 실온에서 blocking 후 15분간 세 번 세척 하였다. 1차 항체를 0.05% T-TBS에 희석하여 4° C 에서 Overnight 반응시킨 후 0.05% T-TBS로 5분 간 3회 세척하였다. 사용한 1차 항체 및 희석비율은 <Table 1>에 제시하였다. 1차 항체에 대한 2차 항체를 0.05% T-TBS에 희석한 5% Skim milk에 2000:1 비율로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨

후 다시 0.05% T-TBS로 15분 간 3회 세척하여 하여 Westar Antares (Cyanagen,Bologna,Italy)와 1분간 반응시키고 Evolution-Capt Edge software를 이용하여 정량 후 단백질 발현 변화를 분석하였다. Loading control은 beta-actin (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)을 사용하였다.

**Table 1. Antibody information for Western blot**

Protein target	Name of antibody	Manufacturer, Catalog No.	Dilution
p53	p53 antibody	Cell signalling, # 9282S	2000:1
Myogenin	Myogenin antibody	eBioscience, # 14-5643-82	2000:1
MuRF1	Murf1 antibody	Santacruz, # sc-514767	2000:1
$\beta$ -actin	$\beta$ -actin antibody	Sigma aldrich, # A5441	5000:1

## 2. RT-qPCR

- (1) C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblast를 Myotube로 분화시킨 후 25 μM, 50 μM, 100 μM 필버톤 (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 그룹에 따라 1 μM 독소루비신 (Burlington, MA, USA) 6시간, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750 μM (JUNSEI, Tokyo, Japan) 2시간을 처리한 후 DPBS (WELGENE, Gyeongsan, Korea)로 세척한 다음 Trizol (Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 이용하여 용해 한 후, 클로로포름(Chloroform, CHCl<sub>3</sub>)을 5:1 비율로 희석하여 1분 간 Vortexing 하였다. Ice에서 5분 간 incubation 후 12000 rpm에서 5분 간 원심분리 하여 상층액만 분리하고 동량의 아이소프로필 알콜 (Isopropyl alcohol, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O)을 넣어 20°C에서 Overnight 하였다. 4°C, 12000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 아이소프로필 알콜은 제거하여 가라앉은 RNA 펠렛만 분리하였다. 분리 된 RNA 펠렛은 70% 에탄올로 세척 되었으며, 4°C, 12000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 70% 에탄올 제거 후 5~10분 간 Air-dry 하였으며, 투명해진 RNA 펠렛을 Rnase-Free Water에 녹여 58°C에서 10분 간 완전히 용해하였다. 용해 된 RNA는 Bio-drop (Biochrom, Cambridge, UK)을 이용하여 정량 하였다.
- (2) cDNA는 150 μg/μL Random primer, MMLV-reverse transcriptase, 10X MMLV-buffer, Rnase inhibitor, 10mM dNTP (Promega, Wisconsin, USA)를 이용하여 1 μg의 RNA를 Takara Thermal Cycler Dice(TaKaRa Bio Inc, Shiga, Japan) 를 이용하여 37°C에서 1시간, 72°C 10분간 역전사 하였다.
- (3) PCR 증폭을 위한 primer set는 <Table 2>에 제시하였다. 역전사 한 cDNA에 TaKaRa Ex Taq (TaKaRa Bio Inc, Shiga, Japan)를 첨가한 뒤, TaKaRa Real-Time PCR 기기(TaKaRa Bio Inc, Shiga, Japan)을 이용하여 3step PCR 45 cycle을 진행하였다. (95°C 5sec, 57°C 10sec, 72°C 20sec) 증폭시킨 후 번들로 제공된 정량 software를 이용하여 분석하였다. Real time PCR로 증폭된 산물은 Comparative cycle threshold (Ct) 법을 이용하여 정량 하였으며 각각의 시료는 R1p10의 발현양으로 보정하였다.

Table 2. Mouse Primer sequence used for RT-qPCR analysis.

Gene	Primer sequence Forward (5'- 3')	Primer sequence Reverse (5'- 3')
Trp53	CTCCGAAGACTGGATGACTG	ACAGATCGTCCATGCAGTGAG
p21	TGTCTTGCACTCTGGTGTCTG	CAATCTGCGCTTGGAGTGAT
Myogenin	TGCCCAGTGAATGCAACTCC	TCCACCGTGATGCTGTCCA
MuRF1	TGTCTCACGTGTGAGGTGCCTA	CACCAGCATGGAGATGCAGTTAC
Rplp0	TGTGTGTCTGCAGATCGGGTAC	CTTTGGCGGGATTAGTCGAAG

### 3. Senescence associated $\beta$ -galactosidase staining

Myoblast를 Myotube로 분화시킨 후 100  $\mu$ M 필버톤 (Burlington, MA, USA) 을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 그룹에 따라 1  $\mu$ M 독소루비신을 24 시간, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 4시간처리하여 세포 내에 노화를 유발하였다. 1X PBS(Elpis, Daejeon, Korea)로 1회 세척한 다음 Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit (Cell signalling, #9860S) 내 포함 되어있는 Fixative Solution을 각 well 당 500  $\mu$ l 분주한 후 15분간 실온에서 incubation 하여 세포를 고정시켰다. 고정 후 1X PBS로 2회 세척한 다음 Kit 내의 protocol에 따라 조합 한  $\beta$ -galactostaining solution을 각 well 당 500  $\mu$ L 분주 후 37°C에서 overnight간 incubation 하였다. 염색 된 세포는 현미경에서 100배로 확대하여 관찰 하였다.

#### D. 통계분석

본 연구의 실험 Data는 세 번 진행하여 통계처리 되었으며, SD 값으로 오차를 내었다. 통계 분석은 두 집단 간의 비교는 t-test를 사용하였다. 세 실험군 간의 비교는 one-way ANOVA(analysis of variance)를 통해 Graphpad prism 5 (San Diego, CA, USA)를 이용하여 통계처리 하였다. 각 실험은 3번씩 진행하였고 유의하지 않은 결과는 NS 로 표시 하였으며, 유의한 결과의 p value는 다음과 같다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$  이다.

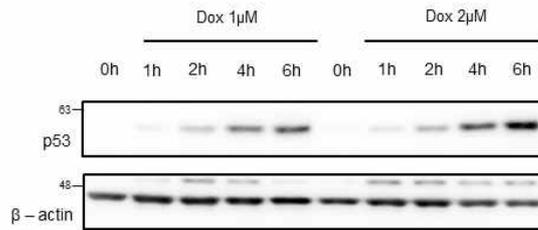
## V. 결과

### A. 노화유도 세포모델에서 노화인자의 노화 유도 수준

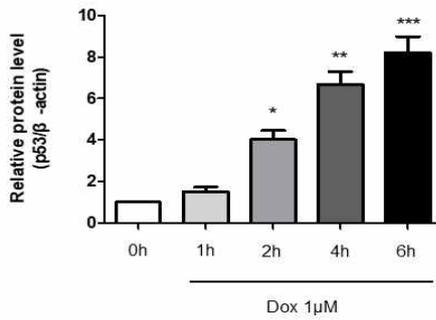
#### 1. 독소루비신 처리 모델의 세포 노화유도 수준 확인

Myotube로 분화된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에 1  $\mu$ M의 독소루비신(Dox), 2  $\mu$ M의 독소루비신을 0h, 1h, 2h, 4h, 6h의 시간별로 각각 처리한 후 노화 관련 인자를 분석한 결과는 Fig.4와 같다. Doxorubicin 처리에 의해 노화관련인자 p53이 Dox 1  $\mu$ M에서는 control (0h) 기준하여 0h, 1h, 2h, 4h, 6h 순으로 1.51배, 4.02배, 6.82배, 8.20배 증가한 것을 확인할 수 있다. Dox 2  $\mu$ M에서는 control (0h) 기준하여 0h, 1h, 2h, 4h, 6h 순으로 1.59배, 3.65배, 6.74배, 8.51배 증가한 것을 확인할 수 있다.

(a)



(b)



(c)

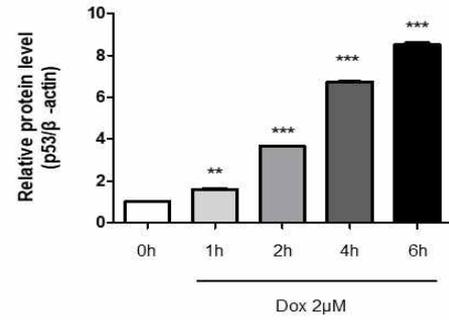


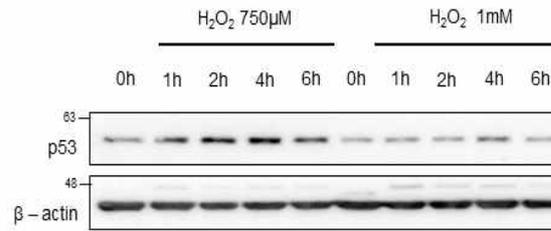
Fig 8. Doxorubicin-induced Cellular senescence in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes.

(a) Western blot analysis of senescence-related protein, (b) Protein expression was normalized to the  $\beta$ -actin level in each sample (n=3 per group) (c) Protein expression was normalized to the  $\beta$ -actin level in each sample (n=3 per group) Results are means  $\pm$  SD. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared to 0h by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test

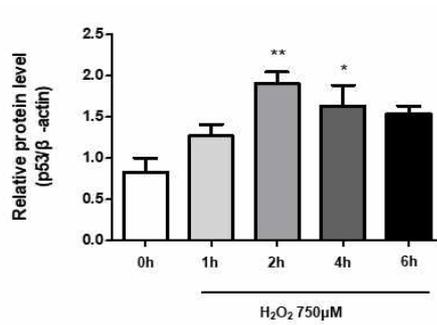
## 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 모델의 세포 노화유도 수준 확인

Myotube로 분화된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에 750 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0h, 1h, 2h, 4h, 6h의 시간별로 각각 처리한 후 노화 관련 인자를 분석한 결과는 Fig.5와 같다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 노화 관련인자 p53이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750 μM 처리그룹에서는 Veh(0h) 기준하여 0h, 1h, 2h, 4h, 6h 순으로 1.52배, 2.28배, 1.96배, 2.01배 증가한 것을 확인할 수 있다. 1.5mM 에서는 Veh(0h) 기준하여 0h, 1h, 2h, 4h, 6h 순으로 1.2배, 1.27배, 1.62배, 1.41배 증가한 것을 확인할 수 있다. 특히 750 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2h, 4h 처리그룹에서 다른 처리 그룹들에 비해 유의하게 높은 발현을 보인다.

(a)



(b)



(c)

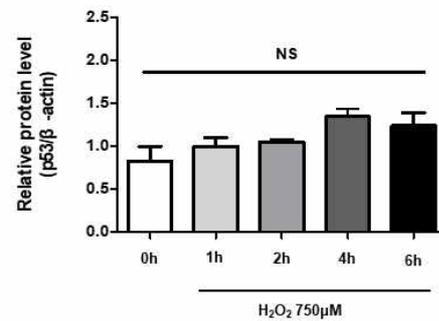


Fig 9. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Cellular senescence in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes.

(a) Western blot analysis of senescence-related protein (b) Protein expression was normalized to the  $\beta$ -actin level in each sample (n=3 per group). (c) Protein expression was normalized to the  $\beta$ -actin level in each sample (n=3 per group). Results are means  $\pm$  SD, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared with 0h by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test

## B. 필버톤의 세포생존력 (Cell viability) 측정

### 2. Methylthiazol Tetrazolium Assay (MTT assay)

Myotube로 분화된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에 DMSO를 처리한 Veh군, 25  $\mu$ M의 필버톤, 50  $\mu$ M의 필버톤, 100  $\mu$ M의 필버톤을 각각 24시간 처리한 후 MTT assay 법을 이용하여 세포활성도를 측정한 결과는 다음 Fig.7과 같다. DMSO 처리그룹을 100% 기준으로, 필버톤 25  $\mu$ M에서 108%, 필버톤 50  $\mu$ M에서 105%, 필버톤 100  $\mu$ M에서 91%의 결과를 보임으로 Veh군과 필버톤 처리군 간의 세포생존력에 차이가 없는 것으로 관찰 된다.

(a)

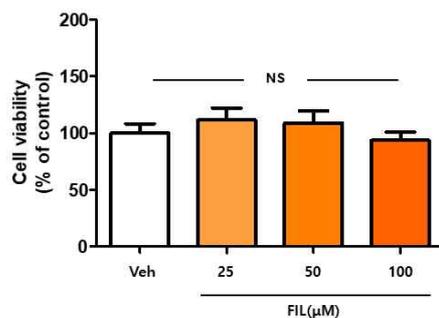


Fig 10. Cytotoxic effects of Filbertone on C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes.

(a) Cell viability was determined by MTT assay after treatment with Filbertone (25, 50, 100 μM) for 24h (n=3 per group). Results are means ± SD, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared with Veh by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test

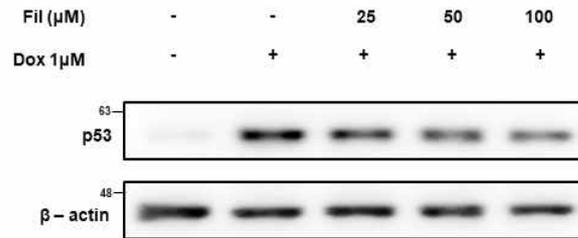
## C. 노화유도 세포모델에서 필버톤의 세포노화 예방 효과

### 1. 독소루비신

#### (1) Protein level

Myotube로 분화된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 의 필버톤을 24시간 동안 전 처리한 후 1  $\mu$ M의 독소루비신(Dox)를 6시간 처리하여 노화 관련 인자 발현을 분석한 결과는 Fig.11과 같다. p53 단백질 수준에서는 control 그룹인 Veh에 비하여 Dox 그룹에서 p53 항체가 13.6배 증가 하였고 필버톤을 25  $\mu$ M 처리한 그룹에서 0.78배, 50  $\mu$ M 처리 그룹에서 0,72배, 100  $\mu$ M로 처리 한 그룹에서 0.55배로 감소한 것을 관찰 할 수 있다. (Fig 11).

(a)



(b)

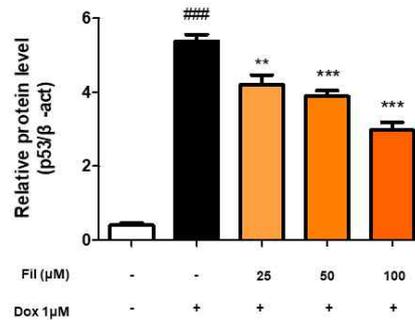


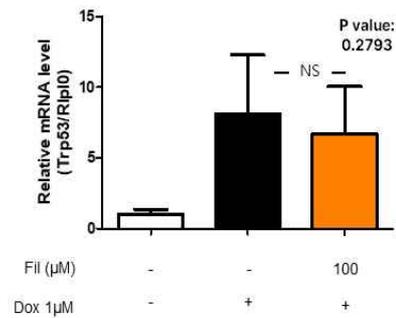
Fig 11. Effect of filbertone on Cellular Senescence related protein level in doxorubicin treated  $C_2C_{12}$  Myotubes.

$C_2C_{12}$  Myotubes was treated with doxorubicin  $1\mu\text{M}$ (6h) in the presence of filbertone (25,50,100 $\mu\text{M}$ ). (a) Western blot analysis of senescence-related protein (b) Protein expression was normalized to the  $\beta$ -actin level in each sample (n = 3 per group) were analyzed by 10% SDS-PAGE and western blotting. Results are means  $\pm$  SD, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.005$  compared to Veh. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$  compared to Dox by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

## (2) mRNA level

Myotube로 분화된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에 100  $\mu$ M의 필버톤을 24시간 동안 전 처리한 후 1  $\mu$ M의 독소루비신(Dox)를 6시간 처리하여 노화 관련 유전자 Trp53, Cdkn1a의 mRNA 발현을 분석한 결과는 Fig.12 과 같다. Trp53 mRNA 수준에서는 control 그룹인 Veh와 비교하여 Dox 그룹에서 Trp53이 8.13배 증가 하였고, 필버톤을 100  $\mu$ M 처리한 그룹에서 1.22배 감소한 것으로 관찰 되었다. Trp53의 하위 신호인 Cdkn1a mRNA 수준에서는 Control 그룹인 Veh와 비교하여 Dox 그룹에서 Trp53이 2.64배 증가 하였고, 필버톤을 100  $\mu$ M 처리한 그룹에서 2.96배 감소한 것으로 관찰 되었다. (Fig. 12)

(a) Trp53



(b) Cdkn1a

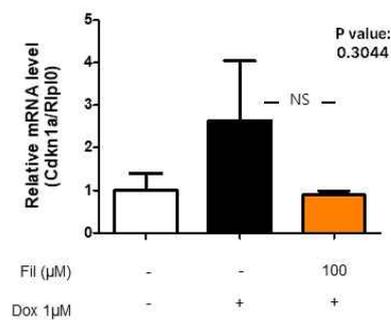


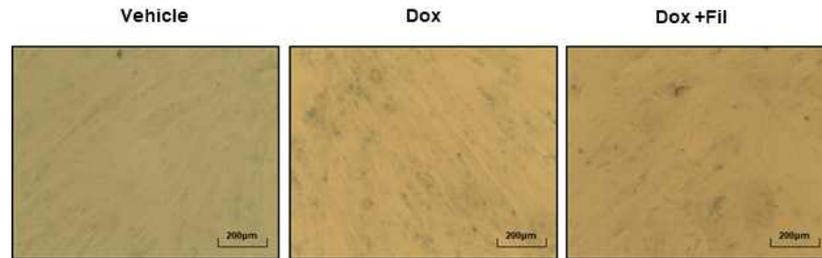
Fig 12. Effect of Filbertone on Cellular Senescence related gene expression in doxorubicin treated C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes.

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes was treated with doxorubicin 1µM(6h) in the presence of filbertone (100µM). (A) Trp53 and (B) Cdkn1a gene expression was normalized to the Rplp0 level in each sample (n = 3 per group). Results are means ± SD, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.005 compared to Veh. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared to Veh by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

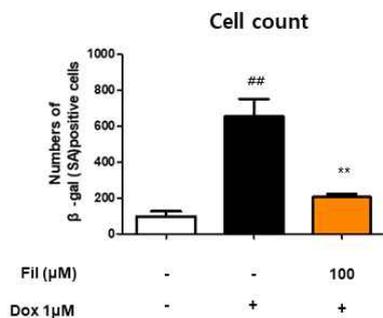
### (3) $\beta$ -galactosidase staining

Myotube로 분화된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에 100  $\mu$ M의 필버톤을 24시간 동안 전 처리한 후 1  $\mu$ M의 독소루비신(Dox)를 24시간 처리하여 노화 유도 된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotube에서 노화 관련  $\beta$ -galactosidase (Senescence associated  $\beta$ -galactosidase) 발현을 분석한 결과는 Fig.13 과 같다. 12well을 100배 확대하여 관찰한 부분에서 control 그룹인 Veh와 비교하여 Dox 그룹에서  $\beta$ -galactosidase가 발현한 세포 갯수가 Veh 그룹에서 98개, Dox 그룹에서 652개, Fil 그룹에서 204개로 Dox를 처리한 그룹에서 Veh 그룹에 비해 약 6.6배 노화 관련  $\beta$ -galactosidase 발현이 증가 하였으며, Filbertone을 전처리 후 Dox를 처리한 Fil 그룹에서는 Dox 그룹에 비해 3.19배 감소한 것을 확인 할 수 있다. 이를 총 Area 중 염색 된 부분만 % 값으로 표시한 %Area 값은 Veh 그룹 0.2%, Dox 그룹 1.62%, Fil 그룹 0.64%로 Dox 그룹과 비교 하였을 때 Fil 그룹에서 노화 관련  $\beta$ -galactosidase가 유의하게 감소 한 것을 확인 할 수 있다. (Fig. 13)

(a)



(b)



(c)

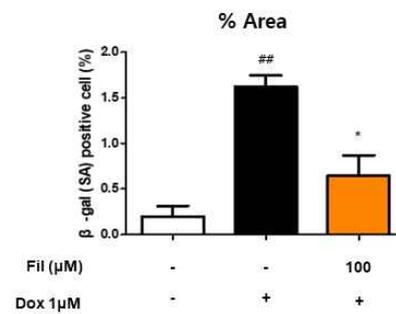


Fig 13. Effect of Filbertone on Senescence Associated  $\beta$ -galactosidase in doxorubicin treated  $C_2C_{12}$  Myotubes.

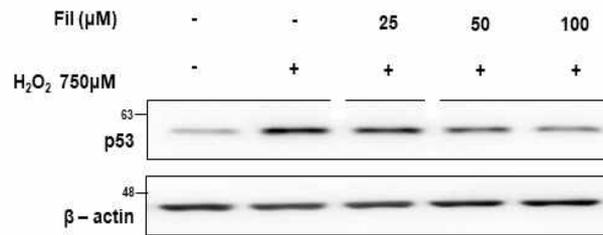
(a) Representative Morphologies of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) stained (bluish-green color)  $C_2C_{12}$  Myoblast with Veh, Doxorubicin  $1\mu\text{M}$ (24h), Doxorubicin  $1\mu\text{M}$  + Filbertone  $100\mu\text{M}$  (24h) (scale bar =  $100\mu\text{m}$ ), (b) SA- $\beta$ -gal quantification plots based on count of positive cells (c) SA- $\beta$ -gal quantification plots based on %area ( $n=3$  per group). Results are means  $\pm$  SD, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.005$  compared to Veh. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.005$  compared to Dox by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

## 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### (1) Protein level

Myotube로 분화된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에 25 μM, 50 μM, 100 μM,의 필버톤을 24시간 동안 전 처리한 후 750 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 를 2시간 처리하여 노화 관련 인자 발현을 분석한 결과는 Fig. 14과 같다. p53 단백질 수준에서는 control 그룹인 Veh와 비교하여 Dox 그룹에서 p53 항체가 3.89배 증가 하였고, 필버톤을 25 μM 처리한 그룹에서 3.44배, 50 μM 처리 한 그룹에서 2.94배, 100 μM 처리한 그룹에서 1.91배로 감소한 것으로 관찰 되었다. (Fig. 14)

(a)



(b)

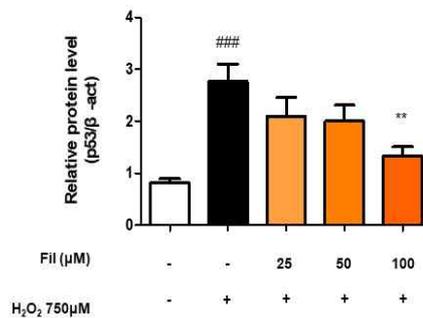


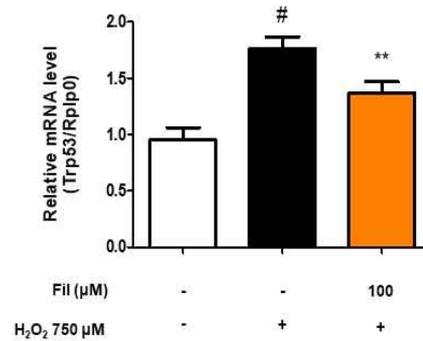
Fig 14. Effect of Filbertone on Cellular Senescence related protein level in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes.

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes was treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750 $\mu$ M(2h) in the presence of filbertone (25,50,100 $\mu$ M). (a) Western blot analysis of senescence-related protein (b) Protein expression was normalized to the  $\beta$ -actin level in each sample (n = 3 per group) were analyzed by 10% SDS-PAGE and western blotting. Results are means  $\pm$  SD, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.005 compared to Veh. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

## (2) mRNA level

Myotube로 분화된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에 100  $\mu$ M의 필버톤을 24시간 동안 전 처리한 후 750  $\mu$ M의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 2시간 처리하여 노화 관련 유전자 Trp53, Cdkn1a의 mRNA 발현을 분석한 결과는 Fig.15와 같다. Trp53 mRNA 수준에서는 control 그룹인 Veh와 비교하여 Dox 그룹에서 Trp53이 1,84배 증가 하였고, 필버톤을 100  $\mu$ M 처리한 그룹에서 1.29배로 유의하게 감소한 것으로 관찰 되었다. 다만 Trp53의 하위 신호인 Cdkn1a mRNA 수준에서는 이와 같은 경향성을 띄지 않는 것으로 관찰 되었다.(Fig. 15)

(a) Trp53



(b) Cdkn1a

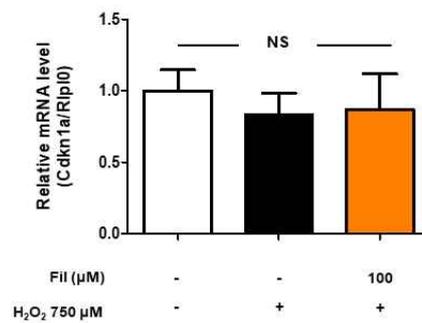


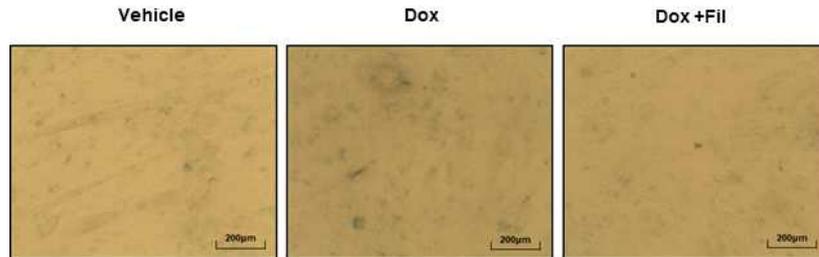
Fig 15. Effect of Filbertone on Cellular Senescence related genes expression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes.

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes was treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750µM(2h) in the presence of filbertone (100µM). (A) Trp53 and (B) Cdkn1a gene expression was normalized to the Rplp0 level in each sample (n = 3 per group). Results are means ± SD, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.005 compared to Veh. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

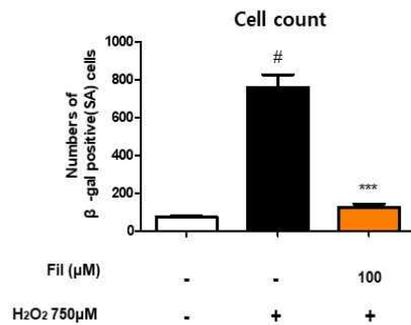
### (3) $\beta$ -galactosidase staining

Myotube로 분화된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에 100  $\mu$ M의 필버톤을 24시간 동안 전 처리한 후 750  $\mu$ M의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 4시간 처리하여 노화 유도 된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotube에서 노화 관련  $\beta$ -galactosidase (Senescence associated  $\beta$ -galactosidase) 발현을 분석한 결과는 Fig.16 과 같다. 12well을 100배 확대하여 관찰한 부분에서 control 그룹인 Veh와 비교하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그룹에서  $\beta$ -galactosidase가 발현한 세포 갯수가 Veh 그룹에서 76개, Dox 그룹에서 759개, Fil 그룹에서 125개로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 그룹에서 Veh 그룹에 비해 약 9.90배 노화 관련  $\beta$ -galactosidase 발현이 증가 하였으며, Filbertone을 전처리 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 Fil 그룹에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그룹에 비해 6.06배 감소한 것을 확인 할 수 있다. 이를 총 Area 중 염색 된 부분만 % 값으로 표시한 %Area 값은 Veh 그룹 0.14%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그룹 0.96%, Fil 그룹 0.17%로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그룹과 비교 하였을 때 Fil 그룹에서 노화 관련  $\beta$ -galactosidase가 유의하게 감소 한 것을 확인 할 수 있다. (Fig. 16)

(a)



(b)



(c)

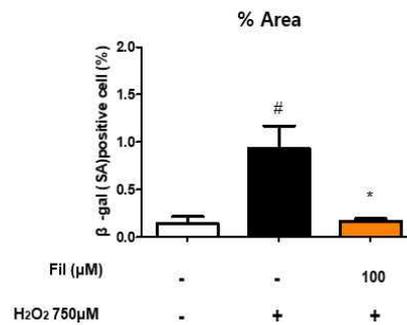


Fig 16. Effect of Filbertone on Senescence Associated  $\beta$ - galactosidase in  $H_2O_2$  treated  $C_2C_{12}$  Myotubes.

(a) Representative Morphologies of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) stained (bluish-green color)  $C_2C_{12}$  Myoblast with Veh,  $H_2O_2$  750 $\mu$ M(2h),  $H_2O_2$  750 $\mu$ M(2h) + Filbertone 100 $\mu$ M (24h) (scale bar = 100  $\mu$ m), (b) SA- $\beta$ -gal quantification plots based on count of positive cells (c) SA- $\beta$ -gal quantification plots based on %area (n=3 per group). Results are means  $\pm$  SD, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.005 compared to Veh. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared to  $H_2O_2$  by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

## D. 노화유도 세포모델에서 필버톤의 근육 관련 인자 개선 효과

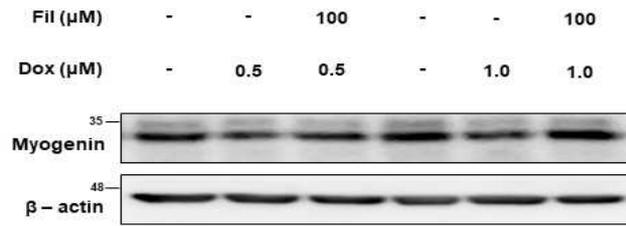
### 1. 독소루비신

#### (1) Protein level

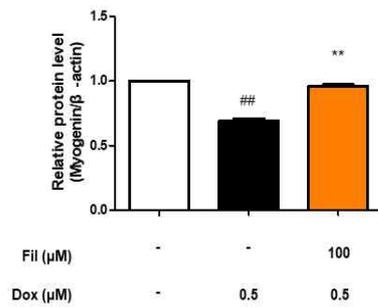
Myotube로 분화된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에 100  $\mu$ M,의 필버톤을 24시간 동안 전 처리한 후 0.5  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M의 Dox를 4시간 처리하여 근육 관련 인자 발현을 분석한 결과는 Fig.15과 같다. Myogenin 단백질 수준에서는 control 그룹인 Veh와 비교하여 Dox를 0.5  $\mu$ M 처리 한 그룹에서 myogenin이 0.68배로 감소하였고, 필버톤을 100  $\mu$ M 처리한 그룹에서 1.38배 증가하여 유의한 수준으로 회복 한 것이 관찰 되었다. control 그룹인 Veh와 비교하여 Dox를 1.0  $\mu$ M 처리 한 그룹에서 myogenin이 0.65배로 감소하였고, 필버톤을 100  $\mu$ M 처리한 그룹에서 1.47배 증가하여 유의한 수준으로 회복 한 것이 관찰 되었다. (Fig. 17)

또한 MuRF1 단백질 수준에서는 control 그룹인 Veh와 비교하여 Dox를 0.5  $\mu$ M 처리 한 그룹에서 MuRF1이 1.28배 증가하였고, 필버톤을 100  $\mu$ M 처리한 그룹에서 0.76배 감소하여 유의한 수준으로 감소한 것이 관찰 되었다. (Fig. 18)

(a)



(b)



(c)

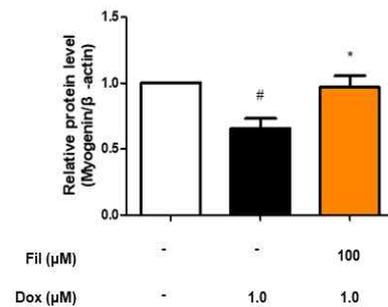
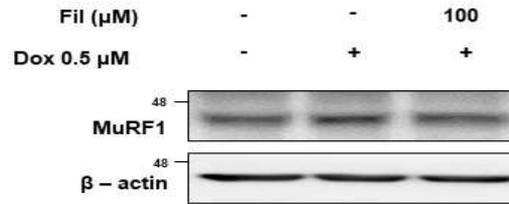


Fig 17. Effect of Filbertone on Myogenesis related protein level in Doxorubicin treated  $C_2C_{12}$  Myotubes.

$C_2C_{12}$  Myotubes was treated with doxorubicin  $1\mu\text{M}$  (6h) in the presence of filbertone (25,50,100 $\mu\text{M}$ ). (a)Western blot analysis of Myogenesis-related protein (Myogenin), (b)Protein expression was normalized to the  $\beta$ -actin level in each sample ( $n = 3$  per group). Results are means  $\pm$  SD, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.005$  compared to Veh. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$  compared to Dox by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

(a)



(b)

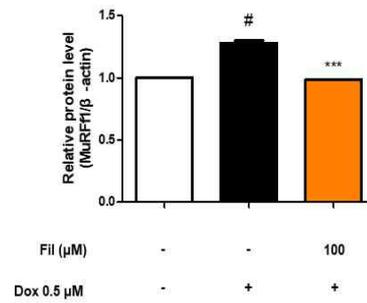


Fig 18. Effect of Filbertone on Muscle atrophy related protein level in Doxorubicin treated C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes.

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes was treated with doxorubicin 1 $\mu\text{M}$  (6h) in the presence of filbertone (25,50,100 $\mu\text{M}$ ). (a) Western blot analysis of Muscle atrophy-related protein (MuRF1), (b) Protein expression was normalized to the  $\beta$ -actin level in each sample (n = 3 per group). Results are means  $\pm$  SD, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.005 compared to Veh. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared to Dox by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

## (2) mRNA level

Myotube로 분화된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에 100  $\mu$ M,의 필버톤을 24시간 동안 전 처리한 후 1  $\mu$ M의 독소루비신(Dox)를 6시간 처리하여 Myogenin과 MuRF1의 mRNA 발현을 분석한 결과는 Fig.19 과 같다. Veh그룹과 비교하여 Dox 그룹에서 myogenin의 mRNA 발현이 0.27배 감소하였으며, Fil 그룹에서는 Dox 그룹에 비교하여 1.3배 증가하여 Fil 그룹에서 약간의 회복을 관찰 하였다.

또한 Veh그룹과 비교하여 Dox 그룹에서 MuRF1의 mRNA 발현이 3.177배 증가하였으며, Fil 그룹에서는 Dox 그룹에 비교하여 0.18배 수준으로 감소하여 Fil 그룹에서 유의한 수준으로 회복됨을 관찰 하였다. (Fig 19)

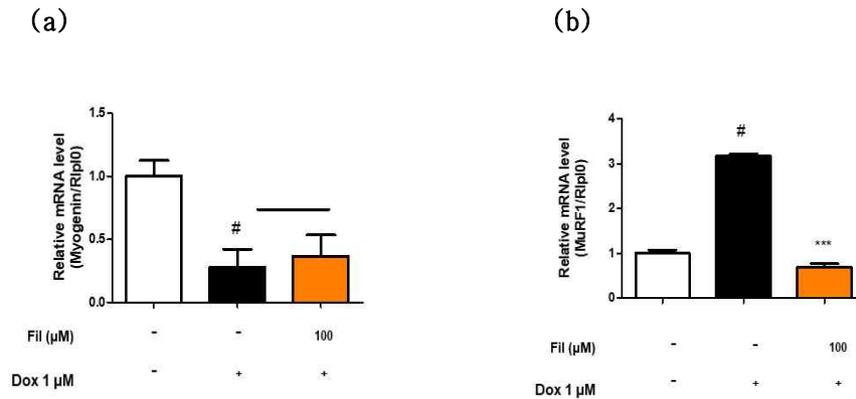


Fig 19. Effect of Filbertone on Myogenesis and Muscle atrophy related genes expression in Doxorubicin treated C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes.

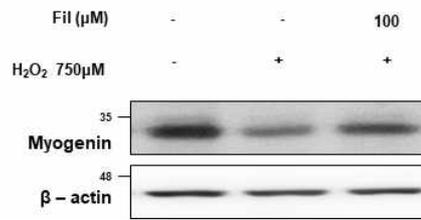
C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes was treated with doxorubicin 1μM(6h) in the presence of filbertone (100μM). (A) Myogenin and (B) MuRF1 gene expression was normalized to the Rpl0 level in each sample (n = 3 per group). Results are means ± SD, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.005 compared to Veh. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared to Dox by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

## 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### (1) Protein level

근관세포로 분화 된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>에서 Myogenesis 관련 인자 Myogenin 및 Muscle atrophy의 protein level을 확인 한 결과는 Fig. 20과 같다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 필버톤 처리 그룹에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 시 Myogenin 단백질 수준이 Veh (control) 그룹 기준하여 0.73배 수준으로 감소 한 것을 관찰 할 수 있다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그룹에 비교하여 Fil 그룹에서 2.15배 상승을 관찰 할 수 있다. (Fig 20). 또한 MuRF1 단백질 수준이 Veh (control) 그룹 기준하여 1.52배 수준으로 유의하게 증가 한 것을 관찰 할 수 있으나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그룹에 비교하여 Fil 그룹에서 유의하게 감소 하지 않은 것을 관찰 할 수 있다. (Fig. 21)

(a)



(b)

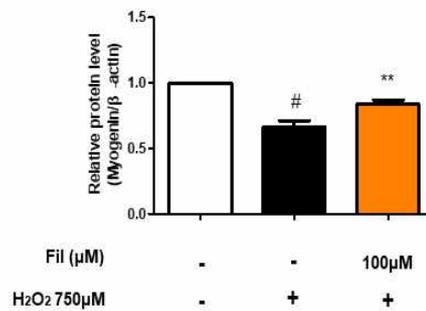
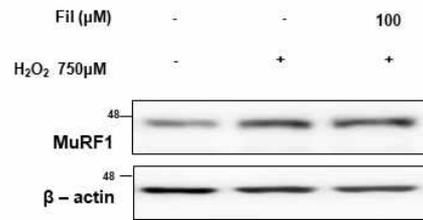


Fig 20. Effect of Filbertone on Myogenesis related protein level in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes.

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes was treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750 $\mu$ M(2h) in the presence of filbertone 100 $\mu$ M (24h). (a) Western blot analysis of myogenesis - related protein (b) Protein expression was normalized to the  $\beta$ -actin level in each sample (n = 3 per group) were analyzed by 10% SDS-PAGE and western blotting. Results are means  $\pm$  SD, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.005 compared to Veh. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

(a)



(b)

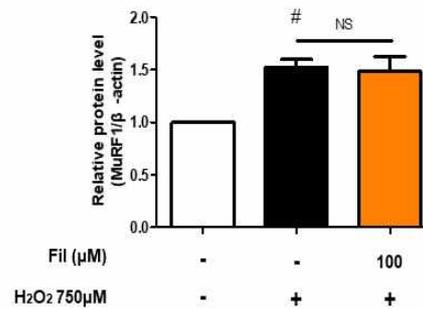


Fig 21. Effect of Filbertone on Muscle atrophy related protein level in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes.

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes was treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750µM(2h) in the presence of filbertone 100µM (24h). (a) Western blot analysis of muscle atrophy - related protein (b) Protein expression was normalized to the β-actin level in each sample (n = 3 per group) were analyzed by 10% SDS-PAGE and western blotting. Results are means ± SD, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.005 compared to Veh. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

## (2) mRNA level

근관세포로 분화 된 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>에서 Myogenesis 관련 인자 Myogenin 및 근 위축 관련 인자 MuRF1의 mRNA 수준을 확인 한 결과는 Fig.22과 같다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 필버튼 처리 그룹에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 시 Myogenin mRNA 수준이 Veh (control) 그룹 기준하여 0.85배 수준으로 감소 한 것을 관찰 할 수 있다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그룹에 비교하여 Fil 그룹에서는 1.12배 상승을 관찰 할 수 있다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 필버튼 처리 그룹에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 시 MuRF1 mRNA 수준이 Veh (control) 그룹 기준하여 1.89배 증가 한 것을 관찰 할 수 있다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그룹에 비교하여 Fil 그룹에서는 1.17배 감소 한 것을 관찰 할 수 있다. (Fig. 22)

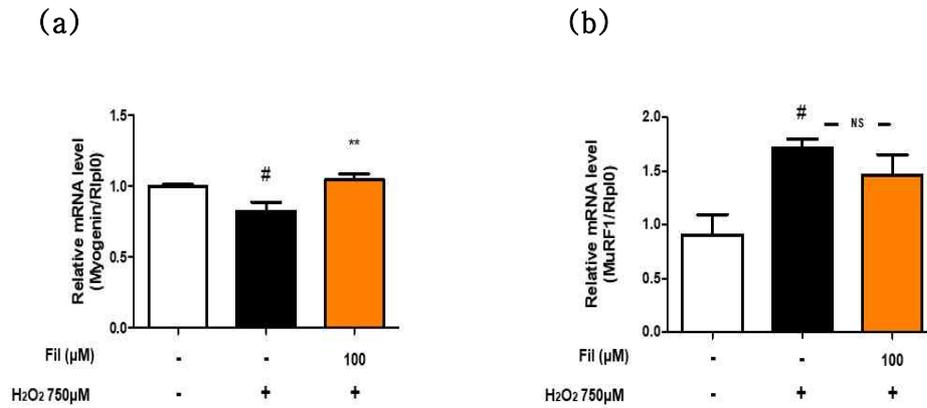


Fig 22. Effect of Filbertone on Myogenesis and Muscle atrophy related genes expression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes.

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes was treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750µM(2h) in the presence of filbertone 100µM (24h). (A) Myogenin and (B) MuRF1 gene expression was normalized to the Rpl0 level in each sample (n = 3 per group). Results are means ± SD, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.005 compared to Veh. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison post-hoc test.

## VI. 고찰

세포노화 (Cellular senescence)는 DNA의 손상, 텔로미어의 기능장애, 종양관련유전자(p53) 활성화, ROS에 의한 세포소기관 등 다양한 요인에 의해 일어난다. 이는 세포의 성장을 중지하여 손상된 세포의 복제를 제한한다. (Herranz, Gil. 2021) 특히 골격근은 신체 중 가장 큰 기관 중 하나로 신체의 약 30~40%를 차지한다. 골격근은 근아세포(Myoblast)가 근관세포(Myotube)로 융합한 후 근관세포가 근섬유(myofiber)로 융합한 다핵세포로 형성된다. (Yamakawa et al. 2020) 골격근세포에 노화가 발생할 시 위와 같은 근신생합성이 저하된다고 보고되어진다. (Moustogiannis et al. 2021)

이에 따라 많은 연구에서 노화에 의하여 근육의 양과 질이 떨어지고 근감소증이 발생한다고 밝히고 있다. 최근 우리나라는 출산율의 감소, 평균수명의 연장으로 인구 고령화를 경험중이다. 2022년 기준 노인인구는 전체의 15.7%를 차지하며, 이는 더욱 늘어나 2030년에는 24.1%에 이를 것으로 예상된다. 이러한 노인인구의 증가세는 OECD 국가 중 가장 빠른 것으로 보고된다. (Korea National Statistical Office, 2020) 신체가 노화하며 근육량의 감소는 근력의 저해를 초래하며, 근력을 결정하는 주요 인자는 골격근의 양이다. 노화에 따라 체성분이 변화하여 골격근량은 저하되고, 지방량이 증가 할 시 근육의 기능 저하 뿐만 아니라 대사장애의 위험도 증가시킨다고 보고되어진다. 근육량의 감소와 체지방량의 증가는 서로 상승작용을 하여 기능 및 대사장애를 일으킬 수 있으므로 최근 근감소성 비만 (Sarcopenic Obesity) 이라는 개념 또한 등장 하였다. (Jang, 2011) 이는 노령인구가 주 인구 층이 되는 현 상황에서 갈수록 근감소증과 근감소성 비만의 환자는 더욱 늘어 날 것으로 예상 된다. 2010년 전에는 근감소증에 관한 연구가 거의 되어지지 않았으나, 최근 10년 간 노인인구가 늘어감에 따라 관련 연구도 폭발적으로 늘어난 상황이다. 그럼에도 현재까지 많은 사람들이 근감소증에 대해서는 인지가 부족한 실정이다. 2016년 11월 미국질병통제예방센터(CDC)에서 근감소증에 대하여

최초로 질병코드(M62.84)를 부여했으며 2018년 일본에 이거 2021년 우리나라에서도 처음으로 질병코드(M62.5)를 부여하여 근감소증을 질병으로 보고 있다.

근육의 노화는 현재까지 치료제가 개발되어 있지 않으며, 운동과 적절한 영양 및 보충제 공급만이 근육노화를 예방 및 관리하는 최선의 방법으로 여겨지고 있다. 현재까지 예방 및 개선을 위해 연구된 식품소재로는 오미자, 인삼, 프로바이오틱스, 올리고놀 보충, 비타민D 등이 있으며 단백질을 급원으로 하는 식품소재로는 대두단백, 유청단백질 등의 연구가 진행되어져 오고 있다.

헤이즐넛은 항비만, 항염증 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 헤이즐넛의 주된 성분인 필버톤에 대해서는 충분한 연구가 진행되지 않았고, 이전의 연구 또한 항비만 및 항염증에 관한 연구가 대부분으로 근육과 필버톤 간의 상관관계를 규명한 연구는 보고되어있지 않다. 필버톤의 항비만 및 항염증 효과를 근거로 하여 근육에서도 근 기능 개선의 효과가 있을 것으로 예상하여 실험 및 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 분화유도 한 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 근관세포에 노화를 유도하는 인자 독소루비신, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 처리하여 노화가 유도된 세포에 헤이즐넛의 향미성분 필버톤이 미치는 영향을 확인하고자 실시되었다. C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포를 Myotube로 3~4일간 분화시킨 후 각 노화인자와 필버톤을 처리하여 실험을 진행하였다. 노화유도인자를 농도와 시간에 따라 처리 후 노화관련인자 p53 발현량을 통해 근관세포에 적절한 스트레스를 주는 농도 및 시간 (독소루비신 1 μM, 6h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 750 μM, 2h)를 선정하였다. 필버톤은 각 농도를 처리하여 실험에 사용한 필버톤의 농도 (25 μM, 50 μM, 100 μM)가 세포활성이 줄어들지 않는 것을 확인하였다. 독소루비신, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 각 농도 별로 처리하여 노화 관련 인자의 발현을 확인한 결과 노화를 유도한 세포에서는 p53의 단백질 및 유전자 수준에서 발현이 증가하였고, 근육 관련인자 Myogenin과 MuRF1의 단백질 및 유전자 수준을 악화시킨 것을 관찰 하였다. 이는 골격근 세포에 노화를 유도 할 시 Myogenesis를

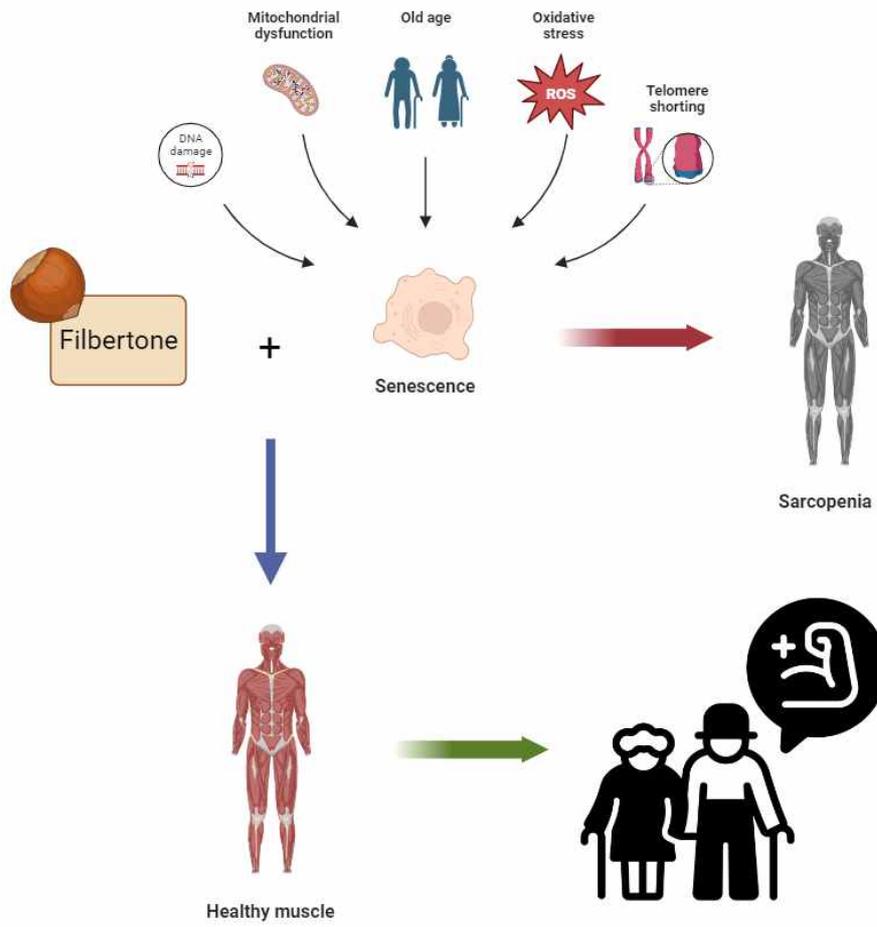
저해하고 근 위축을 유도하는 것을 의미한다. 또한 필버톤을 함께 처리한 그룹에서는 단백질 수준에서 p53 발현이 농도 의존적으로 감소하였으며 유전자 수준에서는 필버톤 100  $\mu$ M에서 노화관련인자가 감소 한 것을 관찰 할 수 있었다. Myogenin 단백질 수준에서의 발현은 필버톤을 전처리 한 그룹에서 증가하였다. 유전자 수준에서는 필버톤 100  $\mu$ M 처리그룹에서 유의하게 발현이 증가 한 것을 관찰 할 수 있다. 또한 필버톤을 처리 할 시 MuRF1의 발현이 감소 하는 것을 관찰 할 수 있다. 이는 p53의 발현 증가 시 Myogenin의 발현감소로 근 분화가 감소하며, 노화가 유도 될 시 근 위축을 일으켜 근력 및 근량의 감소에 영향을 준다는 연구와 같은 방향성을 띤다. (Manhong et al, 2020). 이러한 결과는 본 실험에서 사용 된 필버톤이 더 많은 연구를 통하여 근육에서의 기전을 규명할 시 근육노화의 예방 및 개선 천연 유래 식품소재로서의 가능성이 있다고 사료된다.

본 실험의 한계점으로는 세포실험만 진행하여 생체 내 실험을 진행하지 못한 점, 분자적인 기능은 확인 하였으나 실제 생체 내에서 일어나는 현상을 관찰하지 못한 것이다. 또한 노화로 인한 근기능의 감소는 관찰 하였으나 그에 따른 근감소성 비만으로 인해 발생하는 사항을 확인 하지 못함도 본 실험의 한계점이다. 이전의 연구에 따르면 고지방식이와 함께 급여한 필버톤은 14주령 비만 쥐에서 AMPK 신호를 활성화 하여 cAMP-PKA 신호를 활성화 하고 지방 조직의 지질 축적 유전자 발현감소, 열생성 관련 유전자발현 증가를 나타낼 수 있음을 보고한다. (Moon et al 2019). 필버톤을 처리 할 시 활성화 되는 AMPK 신호는 단백질 합성 및 분해에도 관여 하므로 필버톤이 항비만, 근육노화로 인한 근감소증으로 인한 비만에도 효과를 낼 수 있을 것으로 기대한다.

본 연구의 결과를 통해 독소루비신, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 스트레스를 유도한 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 근관세포에 필버톤을 처리한 결과 노화 관련 신호를 완화하고, 근육관련 인자를 회복수준으로 완화 한 것을 확인 할 수 있다. 이를 바탕으로 헤이즐넛의 주 성분 필버톤이 근육 및 노화에 도움을 주어 충분한 운동 및 적절한 영양과 병행할 시 노령인구의 건강개선, 근육 노화 예방에 도움을 주며 및 이를 활용한 잠재적 치료제로 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

## VII. 결론

본 연구에서는 노화근육의 분자 메커니즘을 조사하여 골격근세포에서 필버톤이 근 감소증의 예방 및 개선에 관하여 연구하였다. 골격근세포에 스트레스 인자를 처리 할 시 노화관련인자인 p53이 증가하며, 이는 Myogenesis 관련 인자 Myogenin의 발현을 감소하며, 근위축 인자인 MuRf1을 증가시킨다. 이는 더 나아가 근 기능과 근량을 저하 시킬 것으로 사료된다. 필버톤을 전 처리한 골격근세포에 스트레스 인자를 처리할 시 노화관련인자의 발현은 감소하고, 근육분화인자는 농도에 따라 차이가 있으나 발현의 증가를 보이며 근 위축인자의 감소가 관찰 된다. 근육노화의 예방 및 개선은 고령화 사회인 현 시대에 국민건강증진에 이바지 할 수 있으며, 필버톤이 이에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대한다.



## VIII. 참고문헌

1. Al-Rawi, N., B. Anwer, A. Uthman, I. Saad, N. Al-Rawi and N. Al-Rawi (2020). "Magnetism in drug delivery: The marvels of iron oxides and substituted ferrites nanoparticles." *Saudi Pharmaceutical Journal*.
2. Altun, M., E. Edstrom, E. Spooner, A. Flores-Moralez, E. Bergman, P. Tollet-Egnell, G. Norstedt, B. M. Kessler and B. Ulfhake (2007). "Iron load and redox stress in skeletal muscle of aged rats." *Muscle Nerve* 36(2): 223-233.
3. Barbieri, E. and P. Sestili (2012). "Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling." *J Signal Transduct* 2012: 982794.
4. Chae Jongbeom, Nam, Ju-Ock (2020). "Recent Studies on Natural Products that Improve Myogenesis" *J. Life Sci. volatile salt*.30 (2): 202-210.
5. Chen, L. H., S. S. Chang, H. Y. Chang, C. H. Wu, C. H. Pan, C. C. Chang, C. H. Chan and H. Y. Huang (2022). "Probiotic supplementation attenuates age-related sarcopenia via the gut-muscle axis in SAMP8 mice." *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 13(1): 515-531.
6. Choi, K. M. (2016). "Sarcopenia and sarcopenic obesity." *Korean J Intern Med* 31(6): 1054-1060.
7. Di Micco, R., V. Krizhanovsky, D. Baker and F. d'Adda di Fagagna (2021). "Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22(2): 75-95.
8. G.Jh, K.Cs, R. Yu (2020). "Effect of Filbertone on Hypothalamic Neurotrophic Factor Expression in Obese Mice Fed a High Fat Diet." *한국식품영양학회 학술*

대회논문집: 227-227.

9. Ha, J. W., Choi, J. Y., Boo, Y. C. (2023). "Antioxidant Effects of Cysteine-containing Peptides of Different Lengths in Human HaCaTKeratinocytes Exposed to Hydrogen Peroxide." *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* 43(133) 193-201.
10. Ha, J. W., Choi, J. Y., Boo, Y. C. (2023). "Antioxidant Effects of Cysteine-containing Peptides of Different Lengths in Human HaCaTKeratinocytes Exposed to Hydrogen Peroxide." *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* 43(133) 193-201.
11. Herranz, N. and J. Gil (2018). "Mechanisms and functions of cellular senescence." *The Journal of Clinical Investigation* 128(4): 1238-1246.
12. Jang, Y.-N. and E. Baik (2013). "JAK-STAT pathway and myogenic differentiation." *JAK-STAT* 2: e23282.
13. Jung, E. Y., J. W. Seo, J. H. Lee, Y. S. Suh and D. H. Kim (2016). "Association between Sarcopenia and Diabetes according to Age in Korean Adults." *Korean Journal of Family Practice* 6(4): 242-248.
14. Kim, K. and D. Jung (2023). "The Impact of Possible Sarcopenia and Obesity on the Risk of Falls in Hospitalized Older Patients." *The Korean Journal of Rehabilitation Nursing* 26(1): 18-27.
15. Le Grand, F. and M. A. Rudnicki (2007). "Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis." *Current Opinion in Cell Biology* 19(6): 628-633.
16. Lee, H.-S. (2014). "The Factors Influencing Health-Related Quality of Life in the Elderly: Focused on the General Characteristics, Health Habits, Mental Health, Chronic Diseases, and Nutrient Intake Status: Data from the Fifth

Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES V), 2010~2012." *Korean Journal of Community Nutrition* 19(5).

17. Lim, J.-Y. (2020). "Consensus Update on Definition and Diagnosis for
18. Lourenco Dos Santos, S., M. A. Baraibar, S. Lundberg, O. Eeg-Olofsson, L. Larsson and B. Friguet (2015). "Oxidative proteome alterations during skeletal muscle ageing." *Redox Biol* 5: 267-274.
19. Malmstrom, T. K., D. K. Miller, E. M. Simonsick, L. Ferrucci and J. E. Morley (2016). "SARC-F: a symptom score to predict persons with sarcopenia at risk for poor functional outcomes." *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 7(1): 28-36.
20. Mankhong, S., S. Kim, S. Moon, H. B. Kwak, D. H. Park and J. H. Kang (2020). "Experimental Models of Sarcopenia: Bridging Molecular Mechanism and Therapeutic Strategy." *Cells* 9(6).
21. Moon, Y., T. Tong, W. Kang and T. Park (2019). "Filbertone Ameliorates Adiposity in Mice Fed a High-Fat Diet via Activation of cAMP Signaling."
22. Mori, K., K. Nishide, S. Okuno, T. Shoji, M. Emoto, A. Tsuda, S. Nakatani, Y. Imanishi, E. Ishimura, T. Yamakawa, S. Shoji and M. Inaba (2019). "Impact of diabetes on sarcopenia and mortality in patients undergoing hemodialysis." *BMC Nephrology* 20(1): 105.
23. Mougeolle, A., S. Poussard, M. Decossas, C. Lamaze, O. Lambert and E. Dargelos (2015). "Oxidative stress induces caveolin 1 degradation and impairs caveolae functions in skeletal muscle cells." *PLoS One* 10(3): e0122654.
24. Moustogiannis, A., A. Philippou, O. Taso, E. Zevolis, M. Pappa, A.

- Chatzigeorgiou and M. Koutsilieris (2021). "The Effects of Muscle Cell Aging on Myogenesis." *International Journal of Molecular Sciences* 22(7): 3721.
25. Mutsnaini, L., J. Yang, J. Kim, C.-S. Kim, C.-H. Lee, M.-S. Kim, T. Park, T. Goto and R. Yu (2021). "Filbertone Protects Obesity-induced Hypothalamic Inflammation by Reduction of Microglia-mediated Inflammatory Responses." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 26(1): 86-92.
26. Park, Y., J. E. Choi and H. S. Hwang (2018). "Protein supplementation improves muscle mass and physical performance in undernourished prefrail and frail elderly subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Am J Clin Nutr* 108(5): 1026-1033.
27. Puchl'ova, E. and P. Szolcsanyi (2018). "Filbertone: A Review." *J Agric Food Chem* 66(43): 11221-11226.
28. Rui Zhang, Hyunjin Lee, Yeongmin Yoon, Sumi Kim, Hyunsook Kim, Shun Hua Li, Sungkwan An.(2009).The Melanin Inhibition, Anti-aging and Anti-inflammation Effects of Portulaca oleracea Extracts on Cells.KSBB Journal,24(4),397-402.
29. Seo, D. Y., J. H. Bae, H. S. Bang and Y. S. Kwak (2020). "Role of Exercise in Skeletal Muscle Atrophy: A Mechanistic Investigation." *Exercise Science* 29(3): 202-207
30. Seo, Y.-j. and J.-h. Lew (2018). "The Effect of Red Ginseng on Sarcopenic Rat." *The Journal of Internal Korean Medicine* 39(6): 1168-1180.
31. Sharpless, N. E. and C. J. Sherr (2015). "Forging a signature of in vivo senescence." *Nature Reviews Cancer* 15(7): 397-408.

32. Woo, Haebong,(2023)“Demographic Components of Population Aging in South Korea,” Health and Social welfare review 43(1) 50–68.
33. Yamakawa, H., D. Kusumoto, H. Hashimoto and S. Yuasa (2020). "Stem Cell Aging in Skeletal Muscle Regeneration and Disease." International Journal of Molecular Sciences 21(5): 1830.

## Abstract

Due to the increasing elderly population, the incidence of aging-related diseases is on the rise, with muscle loss in the elderly significantly hindering their independent living. Muscle cell aging inhibits the differentiation from myoblasts to myotubes, decreasing muscle mass and strength. It is often associated with decreased physical activity and musculoskeletal disorders. It has also been linked to metabolic conditions such as diabetes, hypertension, and cardiovascular diseases. While Filbertone, a flavor component of hazelnuts, is known to have potential benefits in improving obesity and metabolic diseases, its impact on aging and muscle function has yet to be studied. In this study, we aimed to investigate the effects of Filbertone on aging-related factors and muscle-related factors in senescence-induced C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes treated with Doxorubicin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, to assess its potential in preventing muscle aging. C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myoblasts were differentiated into myotubes and divided into control, senescence-induced, and senescence-induced+Filbertone groups. Following Filbertone treatment, cell viability was evaluated using MTT assays, senescence related marker was measured using  $\beta$ -galactosidase staining, Western blot and RT-qPCR analysis of protein and mRNA in the cells to measure the expression of senescence or muscle-related factors. Treatment with Filbertone did not exhibit toxicity in the control and Filbertone groups. Moreover, in the senescence-induced group treated with Filbertone, a reduction in the expression of the senescence-related factors and improved of the muscle-related factor was observed. This result suggests that Filbertone prevents cellular senescence and improves muscle function in senescence-induced muscle cells.

keywords : Aging, Muscle, Filbertone, p53, p21