



Original Article / 원저

대영煎(大營煎)이 불용성 근위축에서의 apoptosis 관련 단백질들의 발현변화에 미치는 영향

김범희*

동의대학교 한의과대학 한의학과, 동의대학교 한의학연구소

The Effects of *Daeyeoung-jeon* on the Prevention of Disuse Muscle Atrophy in Rats

Bum Hoi Kim*

Department of Anatomy, College of Korean Medicine and Research
Institute of Oriental Medicine, Dong-eui University

ABSTRACT

Objectives : Skeletal muscle atrophy occurs in response to a variety of conditions. The unloading to muscle occurs clinically in limb immobilization, bed rest, spinal cord injury and peripheral nerve damage, resulting in significant loss of muscle mass and force production. Muscle disuse is accompanied by an increase in apoptotic signaling, which mediates some of the responses to unloading in the muscle. In this study we tested the hypothesis that *Daeyeoung-jeon* extract would improve muscle recovery after reloading following disuse.

Method : Twenty young male Sprague-Dawley rats were used for the studies. The hindlimb immobilization was performed with casting tape to keep the left ankle joint in a fully extended position. No intervention was performed on the right leg and used as intact region. The Rats in *Daeyeoung-jeon* treated group (DYJ) were orally administrated *Daeyeoung-jeon* water extract, and rats of Control group were given with saline only. After 2 weeks of immobilization, all animals were sacrificed, and the whole gastrocnemius muscles were dissected from both legs. The morphology of right and left gastrocnemius muscles in both DYJ and Control groups were assessed by hematoxylin and eosin staining. Moreover, to investigate the immobilization-induced muscular apoptosis, the immunohistochemical analysis of Bax and Bcl-2 was carried out.

Results : *Daeyeoung-jeon* represented the significant protective effects against the reductions of the left gastrocnemius muscles weight and average cross section area to compared with Control group. The treatment with *Daeyeoung-jeon* extract significantly reduced the immunoreactivity of BAX and increased the immunoreactivity of Bcl-2 in gastrocnemius muscle compared with Control group.

Conclusion : *Daeyeoung-jeon* has protective effects against immobilization-induced muscle atrophy by regulating the activities of apoptosis-associated BAX/Bcl-2 proteins in gastrocnemius muscle.

Key words : Disuse muscle atrophy, *Daeyeoung-jeon*, gastrocnemius, apoptosis, BAX, Bcl-2.

I. 緒論

근육감소증(sarcopenia)은 연령 증가에 따른 근육량의 감소와 근력의 감소를 특징으로 하며 결과적으로 운동능력 상실의 위험성을 높이게 된다¹⁾. 팔다리의 고정이나 오랜 침상생활등으로 인해 근육을 사용하지 않는 기간이 늘어나게 되면 골격근 섬유의 위축을 유발하게 되고 결과적으로 근육을 약화시키고 삶의 질을 떨어뜨리게 된다. 이러한 근위축의 기전에는 근육에서의 단백질 합성과 단백질 분해를 조절하는 여러 세포기전들이 관여하게 된다²⁾. 대표적인 것이 reactive oxygen species의 생성 증가인데, 예를 들어 골격근 근섬유가 hydrogen peroxide에 노출되게 되면 단백질 분해를 유발하는 단백질분해효소(protease)를 활성화시키고 동시에 단백질 합성을 촉진시키는 세포기전을 억제하게 된다³⁾. 또한 최근 연구 결과들에 따르면 불용성 근위축의 과정에 apoptosis 기전이 관여하는 것으로 밝혀졌는데⁴⁾, 근육을 오랜 기간 사용하지 않거나 혹은 노화에 의한 자연스런 근육감소의 과정에서 apoptosis가 활성화되거나 가속화되는 것으로 알려졌다^{5,6)}. Apoptosis는 세포사멸과 조직재생, 그리고 여러 생리학적인 항상성을 유지하는 데 필수적인데, 골격근에서 산화적 손상은 apoptosis 기전을 촉진시키는 하나의 원인이 될 수 있다⁷⁾. 이전 연구에 따르면, 동물실험에서 근육의 불사용으로 유발시킨 근위축 손상의 과정에 apoptotic DNA fragmentation의 증가와 proapoptotic BAX의 증가가 확인되었다. 또한 antiapoptotic Bcl-xL 단백질의 변화도 보고되었는데, Bcl-2의 경우 근위축 초기

에 감소되지만 이후에는 상대적으로 증가 되는 것으로 보고되었다^{6,8)}. 이러한 불용성 근위축에서의 apoptosis는 주로 실험동물의 후지에서 관찰되었으며^{8,9)}, 혼합섬유로 구성된 gastrocnemius 근육^{5,6)} 뿐 아니라 slow-twitch인 soleus 근육에서도 관련된 조절 단백질들이 증가 되는 것으로 밝혀졌다¹⁰⁾.

대영전(大營煎)은 <景岳全書>에 처음 수록된 처방으로 ‘益命門, 補精血, 養肝腎, 壯筋骨’의 효능을 가지고 있어서¹¹⁾ 임상에서 다양한 여성 질환과 내분비 질환 및 근골격계 질환에 다용되는 처방이다^{12,13)}. 근골격계 질환에 있어서 대영전의 효능에 대한 실험적 연구로는 난소 적출 후의 골다공증 개선 효과¹²⁾, 갑상선 기능저하에 대한 방어효과¹⁴⁾가 보고되었다. 또한, 최근 monosodium iodoacetate로 유발된 관절 연골손상에 대한 억제 효과¹⁵⁾가 있음이 밝혀졌다. 그러나, 아직까지 대영전이 근위축에 미치는 영향에 연구는 부족한 것이 사실이다. 따라서, 본 연구에서는 불용성 근위축 손상에 대영전이 미치는 영향을 검증하기 위하여 2주간 흰쥐에 왼쪽 뒷다리의 발목관절을 casting tape로 고정시키고 대영전 물추출액을 경구 투여한 후 체중변화, gastrocnemius 근육의 무게, 근섬유의 변화를 측정하였다. 또한 근위축의 발생 과정 중에 apoptosis 관련 단백질들의 발현 변화를 면역조직화학염색법을 통해 관찰하였다. 그 결과, 불용성 근위축 손상에 대영전이 유의한 보호효과를 나타내었기에 이를 보고하는 바이다.

*Corresponding author : Bum Hoi Kim, Department of Korean Medicine, Dong-eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

Tel : +82-51-850-7411, Fax : +82-51-850-7435, E-mail : bume@deu.ac.kr

• Received : October 27, 2017 / Revised : November 29, 2017 / Accepted : November 30, 2017

II. 실험방법

1. 실험동물

본 연구에서는 (주)샘타코 (경기도, 대한민국)에서 구입한 10주령, 약 250g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 20마리를 사용하였다. 흰쥐는 온도 23~24℃, 습도 40~60%, 조명 12시간 명/암이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균 음수와 사료를 자유롭게 공급하여 사육하고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

본 연구의 모든 과정은 OO대학교 동물실험윤리위원회의 규정 및 방침에 따라 진행되었다(승인번호: R2017-02).

2. 약물의 제조와 실험군의 분리

본 연구에 사용된 대영전은 000에서 구입하였으며, 약물구성은 Table 1과 같다. 대영전 5첩 분량인 250g을 증류수 2L와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과액을 감압농축하여 동결건조시켜 물추출액기스 62.3g을 얻었다. 투여량은 60kg 일반 성인의 하루 3첩 복용량으로 환산하여, 흰쥐 체중 100g당 259.6mg을 음용수에 녹여 경구 투여하였다.

실험군의 분리는 흰쥐를 무작위로 10마리씩 나누어 대영전을 투여하는 DYJ군과 동일량의 생리식염수를 투여한 Control군으로 분리하였으며, 물과 사료는 모든 군에서 전체 실험기간 동안 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

Table 1. Herbal Composition of *Daeyeoung-jeon*(DYJ)

Herb name	Scientific name	weight(g)
熟地黄	Rehmanniae Radix Preparata	12
枸杞子	Lycii Fructus	8
杜冲	Eucommiae Cortex	8
當歸	Angelicae Gigantis Radix	8
牛膝	Achyranthis Radix	6
肉桂	Cinnamomi Cortex	4
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	4
Total amount		50

3. 불용성 근위축(disuse muscle atrophy) 유발¹⁶⁾

흰쥐에서 불용성 근위축을 유발하기 위해 흰쥐의 왼쪽 발목관절을 완전히 신전(extension)시킨 후 casting tape(type 82002A, 3M, USA)를 이용하여 발목관절

을 움직이지 못하게 하였다. 오른쪽 발목에는 아무런 처치도 하지 않아서 자유롭게 움직일 수 있게 하였다. DYJ군에는 매일 오전 정해진 시간에 대영전 추출물을 1회 경구투여 하였으며, Control군에는 동일량의 생리식염수를 같은 방식으로 투여하였다.

4. 체중측정 및 근육 중량의 변화

실험동물의 체중은 실험기간동안 매일 오전 정해진 시간에 측정하였으며, 실험 마지막 날에는 부검 직전에 측정하였다. 실험 개시 2주 후 실험동물을 안락사시킨 후 부검을 통해 실험동물의 오른쪽 후지로부터 gastrocnemius를 분리 채취하여 중량을 측정하였다. 근육의 무게는 실험동물의 체중을 측정한 다음 체중 100g당 근육 무게를 계산하였다.

각 실험군별 gastrocnemius의 근육위축의 정도는 아래 계산식으로 측정하였다¹⁷⁾.

$$\text{근위축비율}(\%) = \frac{\text{우측 근육 중량} - \text{좌측 근육 중량}}{\text{우측 근육 중량}} \times 100$$

이후 근육조직은 근육의 중앙부분에서 약 3~5mm 정도 두께로 절편하여 -50℃의 dry ice-isopentane 용액으로 동결시키고 -80℃에서 보관하였다.

5. 해부조직학적 관찰 및 근육단면적 측정

동결보관된 근육조직 중에 gastrocnemius의 중앙부분(mid-belly)을 연속적으로 8μm 두께로 냉동절편하여 H&E 염색법을 시행 후, 현미경 하에서 관찰하고 사진촬영 후 영상분석용 Axiovision LE software (Carl Zeiss Vision, ver 4.2 USA)를 이용하여 근육 단면의 면적(cross section area)을 측정하였다¹⁸⁾. 각 실험군의 근섬유의 평균 면적은 각각의 근육조직의 최소 30개 이상의 근섬유를 관찰함으로써 측정하였다.

6. 면역조직화학염색

면역조직화학염색(Immunohistochemistry)은 자유부유법(free-floating)을 사용하였다. Primary antibody는 anti-BAX (ab7977, 1:200 dilution, rabbit polyclonal: ABCam), anti-Bcl-2 (sc-783, 1:200 dilution, rabbit polyclonal: Santacruz)로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4℃에서 12시간 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에

따라 각각 1시간씩 반응시켰다.

면역반응의 결과를 정량화하기 위해 현미경 하에서 동일한 일정면적 내 핵 내에 명확하게 적갈색으로 염색된 세포 수를 세어 면역 양성반응으로 구분하고 세포수를 측정하여 수치화하였다.

7. 통계학적 분석

측정된 모든 자료는 SPSS 10.0을 이용하여 분석하였다. ANOVA 분석을 통해 유의성 여부를 확인 후, Tukey's honestly significant difference를 사용하여 $P < 0.05$ 및 $P < 0.01$ 의 유의수준으로 검증하였다. 모든 값의 수치는 평균±표준오차(mean±standard error)로 표시하였다.

III. 결과

1. 체중의 변화

2주간의 실험기간동안 모든 실험군에서 시간이 지남에 따라 체중이 점차 증가하는 양상이 나타났다. 실험 개시 당시 각 군별 흰쥐의 평균체중은 Control군에서 $245.8 \pm 1.8g$, DYJ군에서 $244.0 \pm 1.9g$ 이었으며, 2주 후 마지막으로 측정된 체중은 Control군에서 $334.8 \pm 9.9g$, DYJ군에서 $339.2 \pm 12.5g$ 으로, DYJ군이 Control군에 비해 평균체중이 약간 증가하였으나 유의성 있는 차이는 아니었다.

2. 비복근(gastrocnemius) 중량의 변화

실험 종료 후 흰쥐를 희생하여 양쪽 근육 gastrocnemius의 무게를 측정하고 체중 100g당 근육 무게를 환산하여 좌우 근육 및 각 실험군 간의 근육 무게의 변화를 비교하였다. 그 결과, Control군의 경우 자유롭게 움직일 수 있는 오른쪽 gastrocnemius 근육은 $514.8 \pm 6.7mg/100g$ 인 반면, 붕대로 압박하여 움직이지 못하게 한 왼쪽은 $422.3 \pm 2.9mg/100g$ 로 측정되어 유의성 있는 감소가 나타났다($P < 0.01$, Table 2). 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 무게의 감소율은 $17.9 \pm 1.0\%$ 로 계산되었다.

대영전 추출물을 경구 투여한 DYJ군의 경우는 오른쪽이 $517.0 \pm 5.4mg/100g$ 로 측정된 반면, 발목관절을 고정시킨 왼쪽의 경우는 $438.8 \pm 6.7mg/100g$ 로 측정되어 Control군과 마찬가지로 근육 무게에 있어 유의성 있는 감소가 확인되었다($P < 0.01$, Table 2).

오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 무게의 감소량을 계산하였을 경우 $15.1 \pm 1.3\%$ 로 관찰되었다.

Control군과 DYJ군을 비교한 결과에서는 아무런 처치를 가하지 않은 오른쪽 gastrocnemius 근육 무게는 유의성 있는 차이가 없었으나, 발목관절을 붕대로 고정시킨 왼쪽의 경우에는 근육감소량의 비교에 있어 DYJ군이 Control군에 비해 근육위축이 유의성 있게 회복된 결과를 나타냈다($P < 0.05$, Table 2).

Table 2. Effect of DYJ on Gastrocnemius Weights in Disuse Muscle Atrophy

Group	Right (intact)	Left (disuse)	Atrophy ratio (%)
Control	514.8 ± 6.7	$422.3 \pm 2.9^{**}$	17.9 ± 1.0
DYJ	517.0 ± 5.4	$438.8 \pm 6.7^{**\#}$	$15.1 \pm 1.3^{\#}$

(mg/100g)

The cast immobilization of left hindlimb resulted in significant reduction of gastrocnemius weight in both Control and DYJ groups. The mean weight of left gastrocnemius in the DYJ group was recovered to compared with that of the Control group. The mean ratio of left gastrocnemius to right in the DYJ group was also significantly recovered to compared with that of the Control group.

** $P < 0.01$ compared with right gastrocnemius

$P < 0.05$ compared with Control group

3. 근육 단면의 해부조직학적 변화

gastrocnemius 근육을 $8\mu m$ 두께로 냉동절편하여 H&E 염색을 시행한 뒤 현미경 하에서 근육 단면적의 변화를 관찰하였다. 그 결과, Control군에서 발목 고정을 시행한 왼쪽 gastrocnemius 근섬유의 단면적이 아무런 처치도 가하지 않은 오른쪽에 비해 뚜렷이 감소되었음을 확인할 수 있었다. 또한 오른쪽에 비해 왼쪽에서 근육 내 염증세포와 근육위성세포의 증식을 보여주는 근섬유 주변에서의 핵(nucleus) 응집도 상대적으로 많이 관찰되었다.

대영전을 경구투여한 DYJ군의 경우에서도 Control군에서와 마찬가지로 왼쪽 근육에서 오른쪽에 비해 근섬유 단면적의 줄어드는 것으로 관찰되었다. 하지만, Control군에 비해 감소 정도가 상대적으로 덜한 경향이 있었다.

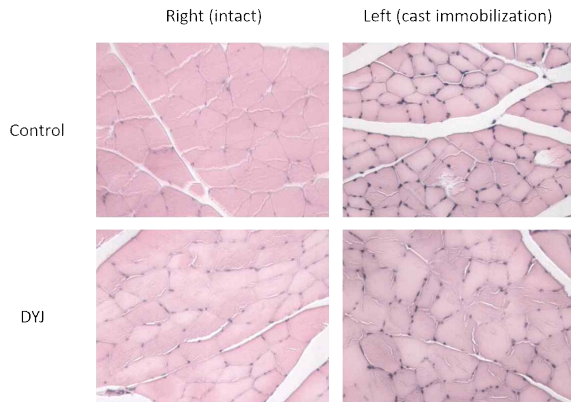


Fig. 1. Representative photographs of muscle sections of gastrocnemius in Rats of Control and DYJ Groups.

The cast immobilization decreased myofibers of gastrocnemius in both Control and DYJ groups. The accumulation of nuclei around the myofibers was observed, suggesting the presence of inflammatory cells. However, the reduction of left myofibrils in the DYJ group was recovered to compared with that of the Control group.

4. 근육섬유의 단면적 크기의 변화

gastrocnemius 근육 단면적의 변화를 영상분석을 통해 실제 수치화하여 비교한 결과에서도, Control 군에서는 자유롭게 움직임이 가능하게 한 오른쪽 gastrocnemius 근육의 경우 $4,492.0 \pm 82.8 \mu\text{m}^2$ 로 측정된 반면, 발목관절을 붕대로 압박하여 움직이지 못하게 한 왼쪽의 경우 $3,683.9 \pm 97.0 \mu\text{m}^2$ 로 측정되어 유의성 있는 감소가 나타났다($P < 0.01$, Table 3). 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 단면적의 평균 감소량은 $17.9 \pm 2.1\%$ 로 계산되었다.

대영전을 투여한 DYJ군의 경우는 아무런 처치를 하지 않은 오른쪽 gastrocnemius 근육의 단면적은 $4,516.5 \pm 113.0 \mu\text{m}^2$ 로 측정되었다. 발목관절을 압박한 왼쪽의 경우는 $3,977.2 \pm 79.4 \mu\text{m}^2$ 로 측정되어 Control 군과 마찬가지로 유의성 있는 감소가 확인되었다($P < 0.01$, Table 3). 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 단면적의 평균 감소량은 $11.8 \pm 0.9\%$ 로 계산되었다.

Control군과 DYJ군의 근육단면적의 변화를 비교해 보았을 때, 아무런 처치도 가하지 않은 오른쪽의 경우는 두 군간에 유의성 있는 변화는 나타나지 않았다. 발목고정을 시행한 왼쪽의 비교에서는 DYJ군이

Control군에 비해 근육위축이 회복된 결과를 보였으며, 통계적으로도 유의성 있는 변화를 나타냈다($P < 0.05$, Table 3).

Table 3. Effect of DYJ on Cross Sectional Area of Gastrocnemius in Disuse Muscle Atrophy

Group	Right (intact)	Left (disuse)	Atrophy ratio (%)
Control	$4,492.0 \pm 82.8$	$3,683.9 \pm 97.0^{**}$	17.9 ± 2.1
DYJ	$4,516.5 \pm 113.0$	$3,977.2 \pm 79.4^{**\#}$	$11.8 \pm 0.9^{\#}$

(μm^2)

The cast immobilization of left hindlimb resulted in significant reduction of Cross Sectional Area of Gastrocnemius in both Control and DYJ groups. The mean Area of left gastrocnemius in the DYJ group was recovered to compared with that of the Control group. The mean ratio of left gastrocnemius to right in the DYJ group was also significantly recovered to compared with that of the Control group.

** $P < 0.01$ compared with right gastrocnemius

$P < 0.05$ compared with Control group

5. Apoptosis 관련 단백질들의 변화

면역조직화학 염색법을 통해 gastrocnemius 근육에서의 BAX와 Bcl-2 단백질의 발현변화를 관찰하고, 영상분석을 통해 양성반응 세포수를 측정하여 수치화하였다.

5-1. Proapoptotic BAX

Control군의 경우 발목고정을 시행한 왼쪽 gastrocnemius 근육에서 오른쪽에 비해 BAX 단백질의 발현이 뚜렷하게 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). DYJ군에서도 마찬가지로 왼쪽근육에서 오른쪽에 비해 BAX의 발현이 증가되는 것으로 관찰되었다. 하지만, Control군에 비해 발현의 양상이 줄어든 편이었다.

BAX의 발현 정도를 정량화하기 위해 양성반응 세포수를 측정하여 수치화한 결과에서도, Control군의 경우 아무런 처치도 가하지 않은 오른쪽에서 단위면적 당 평균 $16.8 \pm 2.4 \text{개}/10^5 \mu\text{m}^2$, 발목고정을 시행한 왼쪽에서는 $31.5 \pm 2.4 \text{개}/10^5 \mu\text{m}^2$ 로 유의성 있는 증가를 나타내었다($P < 0.01$). DYJ군의 경우에서도 오른쪽에서 평균 $15.2 \pm 1.8 \text{개}/10^5 \mu\text{m}^2$, 왼쪽에서는 $24.1 \pm 2.4 \text{개}/10^5 \mu\text{m}^2$ 로 관찰되어 Control군에서도 마찬가지로 유의성 있는 발현증가를 나타내었다($P < 0.01$). Control군과 DYJ군을 비교한 결과에서는 오른쪽 gastrocnemius에서는

두 군간에 발현의 차이를 나타내지 않았으나, 왼쪽근육에서는 DYJ군이 Control군에 비해 유의성 있는 발현감소가 관찰되었다.($P<0.05$).

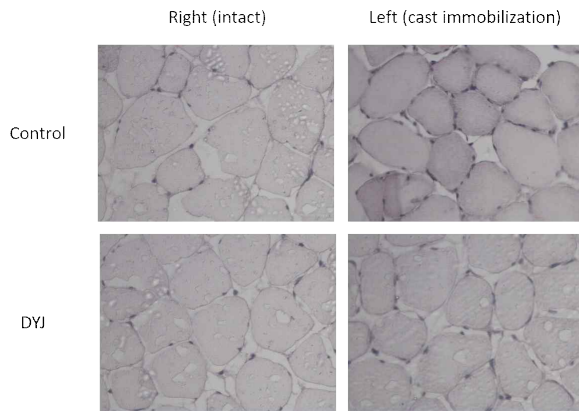


Fig. 2. Representative photographs of BAX immunoreactivities of gastrocnemius in Rats of Control and DYJ Groups.

In Control group, the immunoreactivities of BAX protein in left gastrocnemius muscle were increased significantly to compared with right muscle. In DYJ group, the immunoreactivities of BAX also increased in left gastrocnemius muscle to compared with right muscle. However, the expressions on the left gastrocnemius of DYJ group were less than the left gastrocnemius muscle of the Control group. (Magnification, x400)

Table 4. BAX Immunoreactivities of Gastrocnemius Muscles in Rats of Control and DYJ Groups.

Group	Right (intact)	Left (disuse)
Control	16.8±2.4	31.5±2.4**
DYJ	15.2±1.8	24.1±2.4**#

(counts/ $10^5 \mu\text{m}^2$)

** $P<0.01$ compared with right gastrocnemius

$P<0.05$ compared with Control group

5-2. Antiapoptotic Bcl-2

Bcl-2 단백질의 경우에는 현미경으로 관찰한 결과, Control군과 DYJ군 모두에서 발목고정을 시행한 왼쪽 gastrocnemius에서 아무런 처치도 가하지 않은 오른쪽에 비해 면역 반응이 증가되는 것으로 관찰되었다. 오른쪽에 대한 왼쪽 근육에서의 Bcl-2 면역

반응의 증가는 DYJ군에서 더 뚜렷이 관찰되었다.

양성반응 세포수를 측정하여 수치화한 결과에서는, Control군의 경우 아무런 처치도 가하지 않은 오른쪽에서 단위면적 당 평균 22.1 ± 1.8 개/ $10^5 \mu\text{m}^2$, 발목고정을 시행한 왼쪽에서는 28.8 ± 2.4 개/ $10^5 \mu\text{m}^2$ 로 유의성 있는 증가를 나타내었다($P<0.01$). DYJ군의 경우에서도 오른쪽에서 평균 23.2 ± 2.3 개/ $10^5 \mu\text{m}^2$, 왼쪽에서는 36.4 ± 2.4 개/ $10^5 \mu\text{m}^2$ 로 관찰되어 Control군에서도 마찬가지로 유의성 있는 발현증가를 나타내었다($P<0.05$). Bcl-2 발현의 정도를 Control군과 DYJ군에서 비교한 결과에서는 오른쪽 gastrocnemius에서는 두 군간에 차이를 나타내지 않았으나, 왼쪽근육에서는 DYJ군이 Control군에 비해 발현이 더 증가되어 유의성 있는 차이를 나타내었다($P<0.05$).

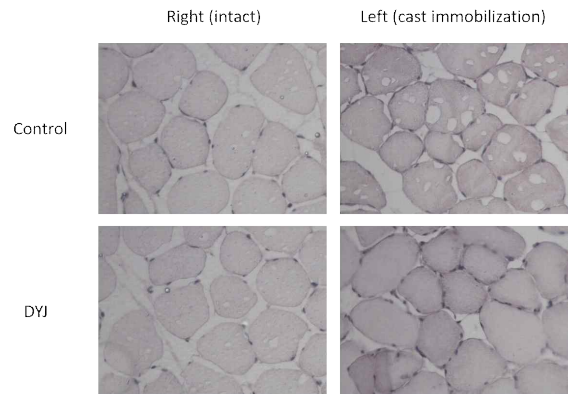


Fig. 3. Representative photographs of Bcl-2 immunoreactivities of gastrocnemius in Rats of Control and DYJ Groups.

The immunoreactivities of Bcl-2 protein in left gastrocnemius muscle were increased significantly to compared with right muscle in both Control and DYJ groups. The expressions on the left gastrocnemius of DYJ group were observed more than left muscle of the Control group. (Magnification, x400)

Table 5. Bcl-2 Immunoreactivities of Gastrocnemius Muscles in Rats of Control and DYJ Groups.

Group	Right (intact)	Left (disuse)
Control	22.1±1.8	28.8±2.4**
DYJ	23.2±2.3	36.4±2.4**#

(counts/ $10^5 \mu\text{m}^2$)

** $P<0.01$ compared with right gastrocnemius

$P<0.05$ compared with Control group

IV. 고찰

실험동물을 이용한 불용성 근위축(disuse muscle atrophy)은 다양한 방법에 의해 유발시킬 수 있다. 꼬리매달기(tail suspension)¹⁹⁾, 신경차단(denervation)²⁰⁾, 고정(immobilization)¹⁶⁾ 등의 방법을 이용하여 인위적으로 골격근 위축을 유도 할 수 있으며, 이전 연구를 통해 위의 모든 방법에 모두 apoptosis 기전이 관여하는 것으로 밝혀졌다^{6,9,21)}. Apoptosis는 신체 내 부적으로 압호화된 자살 프로그램이며, 다양한 세포 유형에서 세포의 생존과 죽음 사이의 균형을 조정하는 역할을 하고 있다²²⁾. 비록 근육의 여러 생리·병리적 상황에서의 apoptosis의 역할이 아직 명확히 밝혀지진 않았으나, apoptosis 기전이 여러 가지 원인에 의한 근육의 손상과 그 이후의 근육 재생을 있어서 중요한 역할을 하고 있음을 나타내는 연구들이 많이 존재 한다²³⁻²⁵⁾. 본 연구는 인위적 유발된 불용성 근위축에서 대영전이 미치는 효과를 검증하고 그 기전을 밝히기 위해 apoptosis 관련 단백질의 변화를 통해 관찰하였다. 본 연구에서 실험동물에 인위적인 불용성 근위축을 유발하기 위해 Udaka J 등¹⁶⁾의 방법을 참고하여 흰쥐의 후지에 붕대고정(cast immobilization)하는 방법을 사용하였는데, 붕대고정은 입상에서 수술 후, 오랜 침상생활 혹은 노년층의 근육의 불사용 등에서 나타나는 불용성 근위축 등을 연구하기 위해 효과적인 방법이다. 흰쥐의 왼쪽 발목관절을 고정시키고, 발목관절의 plantar flexion을 일으키는 종아리의 주요 근육인 gastrocnemius의 변화를 관찰하였다. gastrocnemius는 slow와 fast myosin-heavy chain을 모두 함유하고 있어서 근위축 연구에 자주 사용되는 부위이다^{26,27)}. 2주간 왼쪽 발목관절에 붕대고정을 시행하고 각각 동일량의 saline과 대영전 추출물을 투여한 결과, Control군과 DYJ군에서 실험동물의 체중변화는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으나(Table I), gastrocnemius 근육 무게의 비교에서는 Control군이 붕대고정을 한 왼쪽 gastrocnemius의 중량이 자유롭게 움직임이 가능하게 한 오른쪽에 비하여 유의성 있게 감소되는 결과를 나타내었다(Table II). DYJ군에서도 Control군과 마찬가지로 gastrocnemius 무게가 유의성 있게 감소되었다. 그러나, Control군에 비해서는 감소의 폭이 적어서, 왼쪽 gastrocnemius 근육의 감소율만을 가지고 두 실

험군 간을 비교한 결과에서는 DYJ군에서 Control군에 비해 근육 감소가 유의성 있게 억제된 결과를 나타냈다. 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 중량변화를 측정하기 위하여 Shibaguchi T 등¹⁷⁾의 방법에 따라 각각의 비율로 환산한 결과에서도 통계적으로 유의성 있는 변화를 나타냈다(Table II). 즉, 두 실험군 간에 붕대고정을 시행한 왼쪽 gastrocnemius의 무게 변화만을 비교해보면, Control군에서는 평균 17.9%의 감소율을 나타낸 반면 대영전을 투여한 DYJ군에서는 평균 15.1%의 감소율을 나타내었다. 이러한 결과는 대영전 투여가 불사용 근위축 손상에서 gastrocnemius 근육의 중량 감소에 대해 유의한 보호효과를 가지고 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

각 실험군의 좌·우 gastrocnemius를 적출하여 8 μm 두께로 냉동 절편하여 H&E 염색을 통해 근육 단면을 현미경으로 관찰한 결과에서는, Control군과 DYJ군 모두에서 왼쪽 gastrocnemius 근섬유의 크기가 오른쪽에 비해 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 붕대고정을 시행한 왼쪽 근육만을 비교했을 경우에는 DYJ군이 Control군에 비해 상대적으로 근섬유 크기의 감소가 적은 편이었으며 핵응집도 상대적으로 적게 관찰되었다. 영상분석을 통해 절단면에서의 단면적의 크기를 측정하여 비교한 결과에서는 Control군에서 붕대고정을 시행한 왼쪽에서 오른쪽에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었으며, DYJ군에서도 마찬가지로 왼쪽이 오른쪽에 비해 유의성 있는 감소가 관찰되었다. 이러한 결과는 실험동물의 후지 고정에 의한 근육중량의 감소는 gastrocnemius, soleus, plantaris 근육 내 근섬유의 감소를 동반한다고 이전 연구결과¹⁶⁾와도 일치하는 것이다. 두 실험군 간에 붕대고정을 시행한 왼쪽 gastrocnemius의 단면적만을 비교해보면, Control군에서는 평균 17.8%의 단면적 감소를 나타낸 반면 대영전을 투여한 DYJ군에서는 평균 11.8%의 감소율을 나타내었다. 이는 Control군과 유의성 있는 차이를 보였다(P<0.05). 정리하면, 대영전 투여는 근육의 불사용으로 인한 gastrocnemius의 무게 감소와 근육 속의 근섬유의 단면적 감소에도 영향을 미쳐 유의한 방어효과를 가지고 있음을 보여주는 것이라 할 수 있으며, 근육 무게 감소보다 근섬유의 단면적 감소에 더 큰 영향을 미친 것으로 관찰되었다. 이러한 결과들은 대영전이 장기간의 근육 불사용에 따른 gastrocnemius에서의 근육 단백질 감소를

억제함으로써 근섬유의 단면적 크기의 감소를 억제하고 중량 감소에 방어효과를 나타낸 것으로 사료된다.

여러 가지 원인에 의한 골격근 위축의 발생기전에 있어 apoptosis가 중요한 역할을 하며 여러 병리적 상황에서 근육에서의 apoptosis가 증가하는 것으로 알려져 있다. 앞서 언급한 바와 같이 실험 동물의 후지고정으로 유발된 근위축의 기전에서도 apoptosis가 관여하고 있음이 밝혀졌는데, 본 연구에서는 apoptosis 발생 여부와 그 정도를 확인하기 위하여 pro-apoptotic protein인 BAX와 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 발현 변화를 관찰하였다. Apoptosis와 관련된 단백질 중 BAX와 Bcl-2의 발현은 proapoptotic mechanism을 유발과 억제를 측정하는데 주로 사용된다. Apoptosis로 인한 세포사의 과정 중에 mitochondria의 역할이 중요한데, BAX는 mitochondria의 막투과성을 변화시켜 세포사를 촉진하는 역할을 하는 반면, Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 역할을 한다. 즉, pro-apoptotic protein인 BAX와 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 국소적인 비율이 세포사를 결정하는데 있어 중요하다. 본 연구에서는 gastrocnemius 근육에서의 이러한 BAX와 Bcl-2 단백질의 발현변화를 관찰하기 위하여 면역조직화학 염색법을 시행하였다. 그 결과, BAX의 경우 Control군과 DYJ군 모두에서 봉대 고정을 시킨 왼쪽 gastrocnemius 근육에서 오른쪽에 비해 BAX 단백질의 발현이 뚜렷하게 증가되는 것으로 관찰되었다. 이를 정량적으로 확인하기 위해 영상분석을 통해 면역반응세포를 측정된 결과에서도 유의성 있는 증가를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 실험 동물에 인위적인 불용성 근위축 유발 이후에 근육 내의 apoptosis 관련 BAX 단백질이 현저히 증가한다는 이전 연구 결과¹⁾와도 일치한다. 한편, 두 실험군 간에 봉대 고정을 시행한 왼쪽 gastrocnemius 근육 만에서의 BAX 면역반응을 비교해 보면, 현미경 하에서 DYJ군이 Control군에 비해 발현의 양상이 뚜렷이 줄어드는 것으로 관찰되었다. 면역반응세포수를 수치화한 결과에서도 왼쪽근육에서 DYJ군이 Control군에 비해 BAX 단백질에 대한 면역반응세포수에 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Fig. 2. $P < 0.05$). Bcl-2 단백질에 대한 면역 반응을 현미경으로 관찰한 결과에서도, Control군과 DYJ군 모두에서 발목고정을 시행한 왼쪽에서 아무런 처치도 가하지 않은 오른쪽에 비해 면역 반응이 증가되는 것으로 관찰되었다. 이러한

결과 또한 실험동물에서 인위적인 불용성 근위축 유발 후 14일 이후 Bcl-2 단백질의 발현이 증가한다는 이전 연구결과^{6,8)}와 일치하는 바이며, 본 연구에서 발현 증가의 양상은 DYJ군에서 더 뚜렷이 관찰되었다. 양성반응 세포수를 측정하여 수치화한 결과에서 오른쪽 gastrocnemius에서는 두 군간에 차이를 나타내지 않았으나, 왼쪽 gastrocnemius 근육에서는 DYJ군이 Control군에 비해 면역양성반응 세포수가 더 증가되어 유의성 있는 차이를 나타내었다(Fig. 3. $P < 0.05$). 이는 대영전이 후지고정으로 유발된 근육의 불용성 위축의 apoptosis 기전에서 이를 촉진하는 BAX 단백질의 발현을 감소시키는 동시에, apoptosis를 억제하는 Bcl-2 단백질을 더욱 증가시킴으로써 결과적으로 apoptosis를 억제하는 효과를 나타낸 것으로 생각할 수 있다. 이러한 과정을 통해 불용성 근위축에 보호 효과를 갖는 것으로 사료된다.

종합하면, 2주간 흰쥐 오른쪽 발목관절을 봉대 고정하여 유발시킨 불용성 근위축에 대하여 대영전은 발목관절을 plantar flexion시키는 gastrocnemius 근육의 무게 감소와 근섬유 단면적 감소에 유의한 방어 작용을 나타내었다. 이러한 방어 작용의 기전은 apoptosis 관련 단백질, 예를 들어 BAX, Bcl-2의 발현을 조절함으로써 대영전이 불용성 근위축을 억제하는 효과를 갖는 것으로 사료된다. 다만, 본 연구에서는 불용성 근위축의 발생과정에서 대영전이 apoptosis 기전에 미치는 영향만을 관찰하였으나, 추후 지속적인 연구를 통해 다른 발생 기전에서 영향에 대해서도 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 관찰한 gastrocnemius 근육 외에도 다른 유형의 근섬유를 포함한 soleus, plantaris 등의 변화를 관찰하여, 불용성 근위축에서의 근육 유형별 변화에 대해서도 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 불용성 근위축 손상에서 대영전이 미치는 보호효과를 검증한 실험으로, 불용성 근위축을 유도하기 위하여 흰쥐의 발목관절을 2주간의 봉대 고정시키고 대영전 물추출물을 경구 투여한 후, 2주 후에 실험동물의 체중변화, gastrocnemius 근육 무게, gastrocnemius의 근섬유 단면적 변화, 그리고 근위

축에서의 apoptosis 기전과 관련된 지표들을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

대영전은 장기간의 근육 불사용으로 인한 실험동물의 체중변화에는 영향을 미치지 않았으나, gastrocnemius 근육 무게의 감소를 유의성 있게 방어하는 효과가 있었다. 또한, gastrocnemius의 근섬유의 단면적 감소를 유의성 있게 억제시켰다. 이러한 효과는 불용성 근위축 발생과정에서의 apoptosis 기전과 관련이 있어서 gastrocnemius 근육세포 안에서 apoptosis를 촉진하는 BAX 단백질의 발현을 유의성 있게 감소시키는 동시에, apoptosis를 억제하는 Bcl-2 단백질을 유의성 있게 증가시키는 효과를 갖는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과로 대영전은 근육 불사용에 따른 근위축 변화에 유의한 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

References

1. Alway SE, Bennett BT, Wilson JC, Sperringer J, Mohamed JS, Edens NK, Pereira SL. Green tea extract attenuates muscle loss and improves muscle function during disuse, but fails to improve muscle recovery following unloading in aged rats. *J Appl Physiol*. 2015;118(3):319-30.
2. Wall BT, Dirks ML, van Loon LJ. Skeletal muscle atrophy during short-term disuse: implications for age-related sarcopenia. *Ageing Res Rev*. 2013;12(4):898-906.
3. Powers SK, Smuder AJ, Judge AR. Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012;15(3):240-5.
4. Alway SE, Siu PM. Nuclear apoptosis contributes to sarcopenia. *Exerc Sport Sci Rev*. 2008;36(2):51-7.
5. Siu PM, Pistilli EE, Butler DC, Alway SE. Aging influences cellular and molecular responses of apoptosis to skeletal muscle unloading. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288(2):338-49.
6. Siu PM, Pistilli EE, Alway SE. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(4):1015-26.
7. Theilen NT, Kunkel GH, Tyagi SC. The Role of Exercise and TFAM in Preventing Skeletal Muscle Atrophy. *J Cell Physiol*. 2017;232(9):2348-58.
8. Dupont-Versteegden EE. Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia. *Exp Gerontol*. 2005;40(6):473-81.
9. Marzetti E, Hwang JC, Lees HA, Wohlgemuth SE, Dupont-Versteegden EE, Carter CS, Bernabei R, Leeuwenburgh C. Mitochondrial death effectors: relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800(3):235-44.
10. Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V, Edgerton VR. Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol*. 1997;273:579-87.
11. Zhang Jie-bin. *Jingyuequashu*. Seoul: Jungdam. 1999:1070.
12. Kim KW, Kim SC, Seo BI, Kim SH. A study on the effects of Daeyungeon on ovariectomized osteoporosis of rats. *The Korea Journal of Herbology*. 1998;13(1):59-81.
13. Baek DG. The Clinical Study of 3 Menopausal Disorder Patients with Hot Flush and Depression Treated by Daeyeongjeongami-bang. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 2012;23(4):199-214.
14. Kim DH, Chi JS, Kim CJ, Cho SC. The Effects of Daeyoungjeon(DYJ) on the Hypothyroidism in Rats. *The Korea journal of herbology*. 2007;22(4):35-43.
15. Seo IB, Jeong SH, Park DS. Inhibitory Effects of Daeyeoungjeon on the Injury of Articular Cartilage Induced by Monosodium Iodoacetate in Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2017;27(2):9-17.
16. Udaka J, Terui T, Ohtsuki I, Marumo K, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Depressed contractile performance and reduced fatigue resistance

- in single skinned fibers of soleus muscle after long-term disuse in rats. *J Appl Physiol.* 2011;111(4):1080-7.
17. Shibaguchi T, Yamaguchi Y, Miyaji N, Yoshihara T, Naito H, Goto K, Ohmori D, Yoshioka T, Sugiura T. Astaxanthin intake attenuates muscle atrophy caused by immobilization in rats. *Physiol Rep.* 2016;4(15):1-8.
 18. Lei T, Li H, Fang Z, Lin J, Wang S, Xiao L, Yang F, Liu X, Zhang J, Huang Z, Liao W. Polysaccharides from *Angelica sinensis* alleviate neuronal cell injury caused by oxidative stress. *Neural Regen Res.* 2014;9(3):260-7.
 19. Fujita R, Tanaka Y, Saihara Y, Yamakita M, Ando D, Koyama K. Effect of molecular hydrogen saturated alkaline electrolyzed water on disuse muscle atrophy in gastrocnemius muscle. *J Physiol Anthropol.* 2011;30(5): 195-201.
 20. Midrio M. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol.* 2006;98(1):1-21
 21. Siu PM, Pistilli EE, Murlasits Z, Alway SE. Hindlimb unloading increases muscle content of cytosolic but not nuclear Id2 and p53 proteins in young adult and aged rats. *J Appl Physiol.* 2006;100(3):907-16.
 22. Alway SE, Mohamed JS, Myers MJ. Mitochondria Initiate and Regulate Sarcopenia. *Exerc Sport Sci Rev.* 2017;45(2):58-69.
 23. Theilen NT, Kunkel GH, Tyagi SC. The Role of Exercise and TFAM in Preventing Skeletal Muscle Atrophy. *J Cell Physiol.* 2017;232(9): 2348-2358.
 24. Reilly BD, Franklin CE. Prevention of muscle wasting and osteoporosis: the value of examining novel animal models. *J Exp Biol.* 2016;219(17): 2582-95.
 25. Yu Y, Chu W, Chai J, Li X, Liu L, Ma L. Critical role of miRNAs in mediating skeletal muscle atrophy. *Mol Med Rep.* 2016;13(2): 1470-4.
 26. Zhang J, Li Y, Li G, Ma X, Wang H, Goswami N, Hinghofer-Szalkay H, Chang H, Gao Y. Identification of the optimal dose and calpain system regulation of tetramethylpyrazine on the prevention of skeletal muscle atrophy in hindlimb unloading rats. *Biomed Pharmacother.* 2017;96:513-523.
 27. Rozenberg D, Martelli V, Vieira L, Orchanian-Cheff A, Keshwani N, Singer LG, Mathur S. Utilization of non-invasive imaging tools for assessment of peripheral skeletal muscle size and composition in chronic lung disease: A systematic review. *Respir Med.* 2017;131:125-134.