



Original Article / 원저

Dexamethasone에 의하여 유발된 근육 위축 생쥐의 비복근 근섬유에서 apoptosis와 염증 반응에 미치는 오미자 추출물의 영향

최영현*

동의대학교 근·골격계 질환제어 융합연구실, 향노화연구소 및 한의과대학
생화학교실

Effects of Schisandrae Fructus Supplementation on Apoptosis and Inflammatory Response in Gastrocnemius Muscle of Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy Mice

Yung Hyun Choi*

Open Lab. for Muscular & Skeletal Disease Control, Anti-Aging
Research Center and Department of Biochemistry, Donggeui University
College of Korean Medicine

ABSTRACT

Dried fruits of *Schizandra chinensis* Baillon, Fructus Schisandrae, have been widely used for many years to prevent and treat various diseases in Asian countries including Korea and Russia. It has recently been reported that extracts of Fructus Schisandrae are effective for controlling muscle and skeletal diseases. In this study, we investigated the efficacy of ethanol extract of Fructus Schisandrae (EEFS) on apoptosis and inflammatory response in gastrocnemius muscle of dexamethasone-induced catabolic muscle atrophy mice as part of natural substance discovery and functional analysis for improving muscle function. According to the results of this study, EEFS supplementation attenuated body weight gains and suppressed calf thickness loss in dexamethasone-induced muscle atrophic mice. Gastrocnemius muscle immunohistochemistry showed that expression of caspase-3 and poly(ADP-ribose) polymerase, which are representative apoptotic markers, was markedly increased in dexamethasone control mice; however, their expression was effectively reduced in the EEFS-fed mice. EEFS supplementation also prevented dexamethasone-induced increases in immunoreactivity of muscle fibers for myostatin, an important negative

regulator of skeletal muscle mass. In addition, EEFS significantly normalized the increased numbers of nitrotyrosine, 4-hydroxynonenal and inducible nitric oxide synthase-positive muscle fibers compared to that found in dexamethasone control mice. These results suggest that EEFS protects dexamethasone-induced muscular atrophy by decreasing apoptosis and inflammatory responses, and EEFS is more likely to be developed as a muscle strengthening agent.

Key words : Schisandrae Fructus, muscular atrophy, dexamethasone, apoptosis, anti-inflammation

I. 緒論

고령화에 따른 근육감소증(sarcopenia)은 신체 활동 저하에 중대한 영향을 미치며, 신체 활동의 감소는 골격근 위축(skeletal muscular atrophy)을 유도하여 위축성 과정의 악순환을 야기한다¹⁾. 다양한 원인에 의하여 근육의 위축이 유발되지만, 공통적인 특징은 근육 긴장의 감소에 따른 근육 세포의 단백질 합성 감소와 분해의 증가이다²⁾. 특히 골격근 위축은 패혈증, 암, 신부전, glucocorticoid 과다 생성, 탈 신경증(denervatio), 근육 쇠약 등을 포함한 여러 원인에 의하여 야기된다^{1,2)}.

현재까지 골격근 위축 기전 연구를 위하여 사용되고 있는 다양한 약물 중에서 dexamethasone은 주로 근육 단백질의 분해를 자극하여 골격근에서 이화 작용을 일으키는 대표적인 glucocorticoid 계열 약물이다³⁾. 따라서 dexamethasone을 이용한 실험 모델은 비정상적인 이화성 근육 위축(catabolic muscular atrophy)을 차단할 수 있는 작용제를 선별하는데 유용하고 효과적인 동물 모델로 사용되고 있다^{4,5)}. Dexamethasone에 의하여 유도되는 근육 단백질의 분해는 주로 ubiquitin-proteasome과 리보솜 경로(lysosomal pathway)의 활성화에 의해 매개되며, 특히 근육 특이적 E3-ligases 인 atrogen-1과 muscle ring finger 1 (MuRF1) 및 리보솜 효소인 cathepsin L이 dexamethasone의 주요 활성 표적이다^{6,7)}. 또한, transforming growth factor (TGF)- β 계열의 구성원인 myostatin은 골격근의 중요한 음성조절인자이며, dexamethasone에 의한 이화성 근육 위축에 핵심 인자로서 관여한다⁸⁾. 아울러 근

육의 염증 반응 증가 및 항산화 방어 시스템 파괴와 동반되는 근섬유의 세포사멸(apoptosis)은 병인에 관계 없이 근 위축의 초기 단계에 관여한다^{9,10)}.

최근 오랫동안 한의학에서 널리 사용되어 온 약재들에 대한 새로운 약리 효능이 밝혀지면서 이들을 활용한 인체 질환 치료제의 발굴에 관심이 높아지고 있다. 그중, 우리나라 대한약전에서 규정하고 있는 오미자(五味子, Schisandrae Fructus)는 오미자과(Schisandraceae)의 오미자(*Schizandra chinensis* Baillon)에 속하는 덩굴성 식물의 열매를 말린 것으로 다양한 의학 목적의 예방과 치료를 위해 우리나라를 포함한 아시아 및 러시아 지역의 전통 의학에서 널리 사용되어 왔다¹¹⁾. 현재까지 알려진 오미자 추출물 및 구성 성분들은 항산화, 항종양, 간기능 보호, 항패혈증, 신경 보호, 항염증 및 항당뇨 효과 등을 포함한 다양한 약리학적 효능이 있는 것으로 알려져 있다¹²⁻¹⁸⁾. 그동안 본 연구실에서도 오미자 추출물 및 생리활성 물질에 의한 근육 세포에서의 항산화, 대식세포에서의 항염증, 죽상동맥 경화증 예방, 인지장애 억제, 혈구암 세포의 증식 차단 및 관절염 억제 효능 등을 보고한 바 있다^{12,19-24)}. 아울러 오미자 추출물은 신경 절단 및 dexamethasone 투여 모델에서 골격근 위축 억제 효과를 가지며^{25,26)}, 이는 근원세포의 분화(myogenic differentiation) 촉진에 의한 근 단백질의 합성의 증대와 연관성이 있음을 보고한 바 있다²⁷⁾. 비록 본 연구실에서의 선행 결과들에 의하면 오미자 추출물은 골격근 위축의 차단 효과가 있음이 확실하지만, 골격근 위축과 연관된 근섬유의 apoptosis 차단 및 염증반응 억제 등과 연관된 연구는 여전히 미진하

* Corresponding author: Yung Hyun Choi, Department of Biochemistry, Dongeui University College of Korean Medicine, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036, E-mail : choiyh@deu.ac.kr

• Received : Aug 08, 2017 / Revised : Aug 23, 2017 / Accepted : Aug 25, 2017

다. 따라서 본 연구에서는 선행 연구²⁵⁾에서 나타난 결과에 준하여 오미자 에탄올 추출물(ethanol extract of Fructus Schisandrae, EEFS)이 dexamethasone 처리에 따른 근섬유의 apoptosis 및 염증성 반응에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. EEFS의 준비 및 처리

본 연구에 사용된 오미자는 경상북도 문경시 주변에서 수거하여 동의대학교 한의과대학 홍수현 교수가 동정하였으며, 세척한 후 -20°C 에서 보관하였다. 냉동된 오미자를 분쇄기로 균질화시킨 후, 에탄올 추출물(EEFS; 표본번호: DEU#2016-04)을 얻기 위하여 20% 에탄올로 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출 용액은 여과하고 rotary vacuum evaporator (Rotavapor® R-300, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)를 사용하여 농축시켰다. 농축 잔류물을 동결 건조기(Freeze Dryer With Concentrator, Lyophilizer, IlShin Bio Base, Seoul, Republic of Korea)에서 동결 건조시킨 후 -80°C 에서 보관 하였다. 대조 약물로는 oxymetholone [17 β -hydroxy-2-(hydroxymethylene)-17-methyl-5 α -androstane-3-one; Celltrion Pharm Inc., Jincheon, Korea]을 사용하였다. EEFS와 oxymetholone은 증류수에 각각 50 mg/ml 및 5 mg/ml로 녹였으며, dexamethasone (Water-soluble, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)은 50 mg/ml의 농도로 증류수로 희석하였다. 이들은 모두 4°C 에서 보관하고 사용하기 전에 원하는 농도로 적정량 처리하였다.

2. 동물 사육 및 실험군 분리

본 연구에 사용한 SPF/VAF outbred CrljOri:CD1 (ICR) 수컷 마우스는 OrientBio Inc. (Seungnam, Korea)에서 구입하였다. 8일간 사육실(12 h/12 h light/dark cycle condition)에서 순화시킨 다음 체중(35.76 ± 1.32 g, $33.40 \sim 38.50$ g) 및 종아리 두께 (3.15 ± 0.14 mm, $2.84 \sim 3.42$ mm)가 일정한 실험동물을 군당 8마리씩 선정하였다. 모든 실험동물은 실험물질의 경구 투여 시작일 및 최종 부검일에 각각 18시간 정도 절식을 실

시하였다²⁵⁾.

실험군은 총 6개 군으로, 각 군은 (1) Intact vehicle control: 정상 대조군, (2) Dexamethasone control: 멸균 증류수 투여 및 dexamethasone 처리 유발 대조군, (3) Oxymetholone 처리군: oxymetholone 50 mg/kg 투여 및 dexamethasone 처리 대조 약물군, (4) EESF 125: EESF 125 mg/kg 투여 및 dexamethasone 처리 저용량 약물군, (5) EESF 250: EESF 250 mg/kg 투여 및 dexamethasone 처리 중간용량 약물군, (6) EESF 500: EESF 500 mg/kg 투여 및 dexamethasone 처리 고용량 약물군으로 구분하였으며, 군 분리, 실험 개시 및 투여 조건은 Table 1과 같다. 근육 위축의 유발은 선행 방법²⁵⁾에 준하여 1 mg/kg의 dexamethasone을 매일 1회씩 10일간 피하 주사하였으며, 정상 대조군에서는 dexamethasone 대신 동일한 용량의 생리식염수만을 피하 주사하였다. 또한 oxymetholone 투여 용량은 선행 연구의 방법²⁸⁾에 준하여 50 mg/kg로 선정하였다.

3. 체중 증가량 변화의 측정

Dexamethasone 처리에 따른 체중 증가량(body weight gains)에 미치는 EEFS의 영향을 조사하기 위하여 시험 물질 전처리, 투여 기간의 10일 및 투여 기간의 총 24일 동안 14일 동안의 증체량 변화를 아래 식에 준하여 조사하였다.

- (1) 시험 물질 사전 투여 14일 동안 체중 증가 = 초기 시험 물질 투여 후 14일째 체중 - 처음 투여 시 체중
- (2) Dexamethasone 투여 기간의 10일 동안 체중 증가 = 마지막 dexamethasone 투여 일의 체중 - 첫 dexamethasone 투여 시 체중(초기 시험 물질 투여 후 2주)
- (3) 투여 기간의 총 24일 동안의 체중 증가 = 희생시의 체중 - 첫 번째 시험 물질 투여 당일의 체중

4. 종아리 두께 변화의 측정

Dexamethasone 처리에 따른 종아리 두께(calf thickness)의 변화에 미치는 EEFS의 영향을 조사하기 위하여 해당 동물들을 희생한 후, 좌측 뒷다리 종아리 근육(비복근, gastrocnemius muscle)을 노출시킨 후 electronic digital caliper (Mytutoyo, Tokyo, Japan)를 사용하여 두께를 측정하였다. 종아리 두께의 변화는

시험 물질 섭취 14일 동안의 변화와, 투여 기간 10일과 총 24일의 투여 기간을 추가로 계산하여 아래의 식에 준하여 조사하였다.

(1) 시험 물질 섭취 14일 후 변화 = 초기 시험 물질 섭취 후 14일째 종아리 두께 - 첫 섭취시 종아리 두께

(2) Dexamethasone 처리 기간의 10일 후 종아리 두께 변함 = 최종 dexamethasone 처리 일의 종아리 두께 - 첫 dexamethasone 처리시 두께(초기 시험 물질 투여 후 2주)

(3) 총 24일간의 투여 기간 후 종아리 두께 변화 = 첫 번째 시험 물질 투여 일의 종아리 두께 - 종아리 두께

5. 면역조직화학적 관찰

Dexamethasone 처리에 따른 근육 손상에 미치는 EEFS의 영향을 조사하기 위하여 비복근 근육 샘플을 분리하고 10% 중성 완충 포르말린(neutral-buffered formalin, Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 이용하여 고정하고, 파라핀에 매립한 후, 3-4 μm 두께의 절편을 제작하였다. 면역조직학적 염색을 위하여 파라핀을 제거한 후, Shi et al.²⁹⁾의 방법에 준하여 구연산염 완충액 항원(citrate buffer antigen, epitope)을 처리하였다. Epitope를 회수 후, Ki et al.³⁰⁾의 avidin-biotin complex (ABC) 방법에 준하여 caspase-3, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), nitrotyrosine, 4-hydroxynonenal (4-HNE), inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 myostatin (Table 2)을 면역 염색하여 형광현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다.

6. 통계 분석

각 실험군 단 통계적 유의성은 Levene test에 준하여 실시하였다³¹⁾. Levene test에서 variance homogeneity에서 유의한 편차가 없을 경우, one-way ANOVA와 LSD (least-significant difference multi-comparison) 테스트에 의해 분석하여 실험군과의 유의성 여부를 결정하였다.

III. 결과

1. Dexamethasone 유도 근육 위축 동물 모델에서 체중 증가량에 미치는 EEFS의 영향

Dexamethasone에 의한 근육 위축 유도 여부를 조사하기 위하여 체중의 변화 정도를 조사한 결과와 결과, dexamethasone 처리 시작 5일 후부터 정상 대조군에 비해 체중의 감소가 나타나기 시작하여 24일간의 실험 전 기간 동안의 증체량 역시 유의성 있는 감소를 각각 나타내었다. 그러나 oxymetholone, EEFS 투여군에서는 dexamethasone 대조군에 비해 유의성 있는 체중의 증가가 관찰되고(data not shown), 이에 따른 증체량의 변화를 산출하였다. Table 3에 나타낸 바와 같이 14일간의 약물 전 투여 기간 동안의 체중 증가량이 dexamethasone 대조군에서 정상 대조군과 큰 차이는 없었다. 비록 oxymetholone 처리군에서 다소 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. 아울러 EEFS 투여군에서 다소 차이는 나타났으나 EESF 처리 농도 증가에 따른 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다. 10일간의 dexamethasone 투여기간에서는 dexamethasone 대조군에서 정상 대조군에 비하여 유의적으로 감소되었으나, oxymetholone 처리군에서는 유의적으로 증가되었으며, EEFS 투여 농도 증가에 따라 oxymetholone 처리군과 유사한 수준으로 회복되었다. 24일간의 실험 전 기간 동안의 체중 증가량 변화에서도 dexamethasone에 의하여 감소된 체중 증가량이 oxymetholone 및 EEFS 처리군에서 유의적인 회복 현상을 보였다.

2. Dexamethasone 유도 근육 위축 동물 모델에서 종아리 두께 변화에 미치는 EEFS의 영향

EEFS 처리에 따른 체중 증가량 변화가 종아리 두께의 회복과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 비복근의 두께 변화를 측정하였다. Table 4에 나타낸 바와 같이, 14일간의 약물 전 투여 기간 동안의 종아리 두께 변화량이 dexamethasone 대조군에 비하여 oxymetholone 처리군에서 다소 증가된 반면, EEFS 투여군에서는 실험군에 따른 변화가 심하게 나타났다. 그러나 10일간의 dexamethasone 투여기간 및 24일간의 실험 전 기간 동안의 종아리 두께의 변화는 EEFS 투여군에서

dexamethasone 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 각각 나타내었다.

3. Dexamethasone 유도 근육 위축 동물 모델에서 비복근 근섬유의 apoptosis 유도에 미치는 EEFS의 영향

Dexamethasone에 의한 체중 및 종아리 두께의 감소에 EEFS가 유의적인 보호 효과가 관찰되었기에, 근육 감소의 주요 요인 중의 하나인 근섬유의 apoptosis 유발에 미치는 EEFS의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 비복근 근육 다발(gastrocnemius muscle bundles)을 대상으로 두 가지 주요 apoptosis 표적인자인 caspase-3 및 PARP에 대한 면역조직화학 관찰을 시도하였다. Fig. 1의 결과에서 알 수 있듯이, dexamethasone 대조군에서는 정상 대조군에 비하여 caspase-3과 PARP의 면역 반응성 섬유의 현저한 증가가 관찰되었으나, oxymetholone 처리군에서는 두 항체에 대한 반응성이 매우 감소되었다. 그리고 EEFS 처리군에도 EEFS의 처리 농도 증가에 따라 caspase-3 및 PARP의 면역 반응성이 EEFS 처리 농도 의존적으로 감소되었다.

4. Dexamethasone에 의하여 유도된 근육 위축 동물 모델에서 비복근 근섬유의 염증 반응에 미치는 EEFS의 영향

다음은 dexamethasone에 의한 비복근 근섬유의 염증 반응에 미치는 EEFS의 영향을 조사하기 위하여 3가지 주요 염증 지표인 nitrotyrosine, 4-HNE 및 iNOS의 반응 정도를 비교하였다. 3가지 주요 지표에 대한 반응에서도 dexamethasone 대조군에서 면역 반응성 섬유의 현저한 증가가 관찰되었으나, EESF는 처리 용량 의존적으로 dexamethasone 관련 변화를 정상화시켰다. 아울러 oxymetholone 또한 nitrotyrosine, 4-HNE 및 iNOS에 대한 양성 근섬유 수치를 dexamethasone 대조군 수준에 근접되게 감소시켰다.

5. Dexamethasone에 의하여 유도된 근육 위축 동물 모델에서 비복근 근섬유의 myostatin 반응에 미치는 EEFS의 영향

이상에서 관찰된 비복근 근섬유에서 dexamethasone에 의한 apoptosis 및 염증반응에 대한 EEFG의 차단

효과가 근육 성장의 유지와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 근육 성장의 강력한 음성조절인자인 myostatin에 대한 반응성의 변화 여부를 조사하였다. Fig. 1의 결과에 제시하였듯이, myostatin의 양성 반응의 정도가 정상 대조군에 비하여 dexamethasone 대조군에서 현저히 증가하였다. 그러나 EESF는 dexamethasone 대조군에 비하여 myostatin 양성 근섬유의 수를 처리 농도 의존적으로 현저하게 감소시켰고, oxymetholone 처리군에서도 유의적인 감소가 관찰되었다.

IV. 고찰

많은 선행 연구들에 의하면 glucocorticoid에 의해 유도된 이화성 근육 위축은 단백질 함량, 세포 기관, 세포질, 섬유 지름 및 근력의 저하 등에 의해 특징지어진다³²⁾. Glucocorticoid의 대표적인 부작용으로 불면증, 긴장감, 위장 장애, 관절통, 면역 억제, 부종 및 근병증 등이 보고되고 있다³³⁾. 그럼에도 불구하고, 류마티스 관절염, 천식, 장기 이식 및 일차 또는 이차 부신 기능 부전과 같은 질병 치료를 위한 만성 치료제로 glucocorticoid가 광범위하게 복용되고 있다³⁴⁾. 특히 근육 약화와 근병증(myopathy)의 발생률은 glucocorticoid의 장기 투여자에게 높은 빈도로 나타나며, 근육 병증의 특징은 근육 위축과 약화, 인슐린 저항성, 산화 스트레스 및 미토콘드리아 기능 장애 등을 포함한다^{3,35)}. 이러한 스테로이드성 근병증은 dexamethasone, betamethasone 및 triamcinolone과 같은 불소화 스테로이드(fluorinated steroid)의 사용과 더 일반적으로 연관되지만 prednisolone 및 hydrocortisone 같은 비불소화 스테로이드(non-fluorinated steroid)에 의해서도 발생할 수 있다³²⁾. 따라서 dexamethasone과 같은 약물을 이용한 이화성 근육 위축 모델은 골격근의 기능과 연관된 다양한 연구에 적절히 사용되고 있으며⁴⁾, 본 연구에서는 생쥐의 dexamethasone 유도 근육 위축에서 EESF가 유의적인 보존 효과가 있음을 관찰하였다.

일반적으로 dexamethasone 처리에 의한 체중 및 체중 증가량의 감소는 dexamethasone 자체의 강력한 이화작용에 의한 악액질(cachexia) 관련 변화로 인한 것으로 간주된다³⁶⁾. 또한, 대표적인 17 α -alkylated

anabolic-androgenic steroid인 oxymetholone은 강력한 동화(anabolic) 작용을 통해 glucocorticoid 치료에 의해 유발된 악액질 관련 체중 감소를 억제할 수 있다³⁷⁾. 통상적으로 면역 체계가 강화된 동물은 그렇지 않은 동물들에 비하여 비교적 좋은 성장 패턴을 보이므로^{38,39)}, EESF에 의한 체중의 보존은 현재까지 알려진 오미자의 면역 기능 조절능^{40,41)}과도 연관성이 있을 수도 있다.

한편 근육 섬유의 apoptosis는 병인에 관계없이 근육 위축의 초기 단계에 관여하며^{9,10)}, 현재까지 알려진 다양한 세포의 죽음 유형에서 가장 전형적인 기전인 apoptosis는 caspase cascade의 활성을 특징으로 한다^{42,43)}. Apoptosis는 외인성(extrinsic) 및 내인성(intrinsic) 경로로 대별되는데, 전자는 death receptor 분자에 death ligand가 결합하여 caspase-8을 활성화시키고 이는 다시 caspase-3과 같은 effect caspase의 활성을 통하여 PARP를 포함한 다양한 세포 내 기질 단백질의 분해를 유도한다^{44,45)}. 후자의 경우 미토콘드리아의 기능 손상과 연관된 caspase-9의 활성화에 따른 effect caspase의 활성을 증가시키는 공통 경로로 유입된다^{42,46)}. 따라서 caspase-3의 활성 증가와 연관된 PARP 단편화의 증가는 apoptosis가 유도된 세포에서 관찰되는 대표적인 특징이다^{43,47)}. 이러한 현상들은 glucocorticoid 치료에 따른 근육 섬유에서도 공통된 현상이다^{34,48)}. 따라서 dexamethasone이 처리된 비복근 근섬유에서 EESF 처리에 따른 농도 의존적 caspase-3 및 PARP 면역 반응 억제 현상은 apoptosis 억제를 통한 근육 위축을 차단할 수 있다는 직접적인 증거로 간주될 수 있다.

산화적 스트레스와 함께 염증성 반응의 증대는 근육 위축의 촉진인자로 작용하며, nitrotyrosine은 peroxynitrite 음이온과 이산화질소(nitrogen dioxide, NO)와 같은 반응성 질소 화학종(reactive nitrogen species, RNS)에 의해 매개되는 tyrosine nitration 생성물의 일종이다⁴⁹⁾. Nitrotyrosine 다양한 병리학적 조건 하에서 다량으로 검출되며, iNOS 및 RNS에 의한 염증성 스트레스의 바이오 마커로 간주된다^{49,50)}. 한편 4-HNE는 세포의 지질 과산화에 의해 생산되는 α , β -unsaturated hydroxyalkenal로 다양한 질병 특히, 만성 염증, 신경

병성 질환, 성인 호흡곤란 증후군, 혈관계 질환, 당뇨 및 종양의 원인으로 주목 받고 있으며, 현재 지질 과산화(lipid peroxidation)의 마크로 활용된다^{51,52)}. EESF에 의한 비복근 근섬유의 apoptosis 유도 억제와 함께, dexamethasone에 의한 이들 3가지 인자들의 발현 또한 EESF에 의하여 유의적으로 억제되었으며, 이는 지금까지 알려진 다양한 실험 모델계에서 보여준 오미자 추출물의 강력한 항염증 및 항산화 효능과 일치되는 결과이다^{12,19,20,24,53)}.

다양한 근육 성장 조절인자 중, myostatin은 TGF- β protein family에 속하는 성장분화인자의 일종으로 골격근 세포에서 분비되어, activin type II receptor와 결합하여, 근육의 분화 및 성장을 억제한다. 따라서 myostatin은 근육 성장을 제한하는 대표적인 음성조절인자로 작용한다^{8,54)}. 본 연구의 결과에 의하면, dexamethasone에 의한 근육 위축 동물에서 myostatin의 발현이 현저하게 증가되었다. 그러나 dexamethasone에 의한 myostatin 면역반응성 섬유의 수적 증가가 EESF 처리군에서는 투여 용량 의존적으로 현저히 억제되었으며, 500 mg/kg 처리군에서 oxymetholone 50 mg/kg 투여군과 유사한 효과가 관찰되었다. 따라서 EESF 투여에 따른 비복근 근섬유의 apoptosis 및 염증성 반응의 차단은 근육 성장을 저해하는 myostatin의 발현 감소와 직접적인 연관성이 있음을 알 수 있다.

V. 결론

본 연구의 결과는 EESF가 dexamethasone 처리에 의한 단백질 합성의 감소 및 분해를 차단하여 근육의 위축을 개선하는데 긍정적인 효과가 있음을 보여주었다. 이를 뒷받침하여 주는 주요 결과로는 dexamethasone 처리에 의한 비복근 근육 섬유의 apoptosis 차단과 염증성 반응의 억제, 그리고 근육 성장 음성조절인자의 활성 억제 등을 제시하였다. 비록 EESF에 대한 3가지 주요 현상과 연계된 기전 연구와 EESF 내의 주요 생리활성 성분에 대한 추가적인 연구가 수행되어야겠지만, 오미자 추출물은 근육 위축의 차단을 위한 선도후보물질로서의 가능성이 매우 높음을 보여주었다.



감사의 글

본 결과물은 부산광역시·부산과학기술기획평가원의 지역특화 기술개발·확산 개방형연구실 운영사업 및 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품 기술개발사업(No. 314043-3)의 지원으로 이루어졌으며, 본 연구에 큰 도움을 준 대구한의대학교 구세광 교수에게 감사드립니다.

References

- Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med.* 2003;9:344-50.
- Jackman RW and Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C834-43.
- Kanda F, Takatani K, Okuda S, Matsushita Tand Chihara K. Preventive effects of insulin like growth factor-I on steroid-induced muscle atrophy. *Muscle Nerve.* 1999;22:213-7.
- Benveniste O, Jacobson L, Farrugia ME, Clover L and Vincent A. MuSK antibody positive myasthenia gravis plasma modifies MURF-1 expression in C2C12 cultures and mouse muscle in vivo. *J Neuroimmunol.* 2005;170:41-8.
- Jones A, Hwang DJ, Narayanan R, Miller DD and Dalton JT. Effects of a novel selective androgen receptor modulator on dexamethasone-induced and hypogonadism-induced muscle atrophy. *Endocrinology.* 2010;151:3706-19.
- Hasselgren PO. Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1999;2:201-5.
- Komamura K, Shirotani-Ikejima H, Tatsumi R, Tsujita-Kuroda Y, Kitakaze M, Miyatake K, Sunagawa K and Miyata T. Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2003;17:303-10.
- McPherron AC, Lawler AM and Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature.* 1997;387:83-90.
- Arakawa T, Katada A, Shigyo H, Kishibe K, Adachi M, Nonaka S and Harabuchi Y. Electrical stimulation prevents apoptosis in denervated skeletal muscle. *Neuro Rehabilitation.* 2010;27: 147-54.
- Lim JY and Han TR. Effect of electromyostimulation on apoptosis-related factors in denervation and reinnervation of rat skeletal muscles. *Muscle Nerve.* 2010;42:422-30.
- Panossian A and Wikman G. Pharmacology of Schisandra chinensis Bail.: an overview of Russian research and uses in medicine. *J Ethnopharmacol.* 2008;118:183-212.
- Kang YS, Han MH, Hong SH, Park C, Hwang HJ, Kim BW, Kyoung KH, Choi YW, Kim CM and Choi YH. Anti-inflammatory Effects of Schisandra chinensis (Turcz.) Baill fruit through the inactivation of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinases signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *J Cancer Prev.* 2014;19:279-87.
- Lv XJ, Zhao LJ, Hao YQ, Su ZZ, Li JY, Du YW and Zhang J. Schisandrin B inhibits the proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells by inducing cycle arrest and apoptosis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:6926-36.
- Wat E, Ng CF, Wong EC, Koon CM, Lau CP, Cheung DW, Fung KP, Lau CB and Leung PC. The hepatoprotective effect of the combination use of Fructus Schisandrae with statin-A preclinical evaluation. *J Ethnopharmacol.* 2016;178:104-14.
- Kook M, Lee SK, Kim SD, Lee HY, Hwang JS, Choi YW and Bae YS. Anti-septic activity of α -cubebenoate isolated from Schisandra chinensis. *BMB Rep.* 2015;48:336-41.
- Park SY, Choi YH, Park G and Choi YW.

- Neuroprotective effects of α -iso-cubebenol on glutamate-induced neurotoxicity. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;40:549-56.
17. Bae H, Kim R, Kim Y, Lee E, Jin Kim H, Pyo Jang Y, Jung SK and Kim J. Effects of *Schisandra chinensis* Baillon (Schizandraceae) on lipopolysaccharide induced lung inflammation in mice. *J Ethnopharmacol.* 2012;142:41-7.
 18. Kwon DY, Kim DS, Yang HJ and Park S. The lignan-rich fractions of *Fructus Schisandrae* improve insulin sensitivity via the PPAR- γ pathways in in vitro and in vivo studies. *J Ethnopharmacol.* 2011;135:455-62.
 19. Kang JS, Han MH, Kim GY, Kim CM, Chung HY, Hwang HJ, Kim BW and Choi YH. *Schisandrae* semen essential oil attenuates oxidative stress-induced cell damage in C2C12 murine skeletal muscle cells through Nrf2-mediated upregulation of HO-1. *Int J Mol Med.* 2015;35:453-9
 20. Jeong JW, Kim JW, Ku SK, Kim SG, Kim KY, Kim GY, Hwang HJ, Kim BW, Chung HY, Kim CM and Choi YH. Essential oils purified from *Schisandrae* semen inhibits tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-9 activation and migration of human aortic smooth muscle cells. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:7.
 21. Song SH, Choi SM, Kim JE, Sung JE, Lee HA, Choi YH, Bae CJ, Choi YW and Hwang DY. α -isocubebenol alleviates scopolamine-induced cognitive impairment by repressing acetylcholinesterase activity. *Neurosci Lett.* 2017;638:121-8.
 22. Kim JH, Choi YW, Park C, Jin CY, Lee YJ, Park DJ, Kim SG, Kim GY, Choi IW, Hwang WD, Jeong YK, Kim SK and Choi YH. Apoptosis induction of human leukemia U937 cells by gomisin N, a dibenzocyclooctadiene lignan, isolated from *Schizandra chinensis* Baill. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:807-13.
 23. Jeong JW, Kim J, Choi EO, Kwon DH, Kong GM, Choi IW, Kim BH, Kim GY, Lee KW, Kim KY, Kim SG, Choi YW, Hong SH, Park C and Choi YH. *Schisandrae* Fructus ethanol extract ameliorates inflammatory responses and articular cartilage damage in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *EXCLI J.* 2017;16:265-77.
 24. Jeong JW, Lee HH, Choi EO, Lee KW, Kim KY, Kim SG, Hong SH, Kim GY, Park C, Kim HK, Choi YW and Choi YH. *Schisandrae* Fructus inhibits IL-1 β -induced matrix metalloproteinases and inflammatory mediators production in SW1353 human chondrocytes by suppressing NF- κ B and MAPK activation. *Drug Dev Res.* 2015;76:474-83.
 25. Kim JW, Ku SK, Han MH, Kim KY, Kim SG, Kim GY, Hwang HJ, Kim BW, Kim CM and Choi YH. The administration of *Fructus Schisandrae* attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. *Int J Mol Med.* 2015;36:29-42.
 26. Kim JW, Ku SK, Kim KY, Kim SG, Han MH, Kim GY, Hwang HJ, Kim BW, Kim CM and Choi YH. *Schisandrae* Fructus supplementation ameliorates sciatic neurectomy-induced muscle atrophy in mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:872428.
 27. Kim CH, Shin JH, Hwang SJ, Choi YH, Kim DS and Kim CM. *Schisandrae* fructus enhances myogenic differentiation and inhibits atrophy through protein synthesis in human myotubes. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:2407-15.
 28. Isaacs J, Loveland K, Mallu S, Adams S and Wodicka R. The use of anabolic steroids as a strategy in reversing denervation atrophy after delayed nerve repair. *Hand (NY).* 2011;6:142-8.
 29. Shi SR, Chaiwun B, Young L, Cote RJ and Taylor CR. Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *J Histochem Cytochem.* 1993;41:1599-604.
 30. Ki SH, Yang JH, Ku SK, Kim SC, Kim YW and Cho

- IJ. Red ginseng extract protects against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *J Ginseng Res.* 2013;37:45-53.
31. Levene A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. *Part I Clin Otolaryng.* 1981;6:145-51.
32. Owczarek J, Jasińska M and Orszulak-Michalak D. Drug-induced myopathies. An overview of the possible mechanisms. *Pharmacol Rep.* 2005;57:23-34.
33. Zoorob RJ and Cender D. A different look at corticosteroids. *Am Fam Physician.* 1998;58:443-50.
34. Dirks-Naylor AJ and Griffiths CL. Glucocorticoid-induced apoptosis and cellular mechanisms of myopathy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;117:1-7.
35. Covar RA, Leung DY, McCormick D, Steelman J, Zeitler P and Spahn JD. Risk factors associated with glucocorticoid-induced adverse effects in children with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:651-9.
36. Gupta AK and Chow M. Prednicarbate (Dermatop): profile of a corticosteroid. *J Cutan Med Surg.* 2004;8:244-7.
37. Hengge UR, Baumann M, Maleba R, Brockmeyer NH and Goos M. Oxymetholone promotes weight gain in patients with advanced human immunodeficiency virus (HIV-1) infection. *Br J Nutr.* 1996;75:129-38.
38. Pinzone Fox ML, Sastry MK, Parenti DM and Simon GL. Plasma leptin concentration increases early during highly active antiretroviral therapy for acquired immunodeficiency syndrome, independent of body weight. *J Endocrinol Invest.* 2005;28:1-3.
39. Lee HS, Yang KJ, Shin HD, Park BR, Son CW, Jang HJ, Park DC, Jung YM and Ku SK. Single oral dose toxicity studies of polycan, β -glucan originated from *Aureobasidium* in mice. *Toxicol Res.* 2005;21:361-5.
40. Yip AY, Loo WT and Chow LW. Fructus Schisandrae (Wuweizi) containing compound in modulating human lymphatic system - a Phase I minimization clinical trial. *Biomed Pharmacother.* 2007;61:588-90.
41. Tang SH, He RR, Huang T, Wang CZ, Cao YF, Zhang Y and Kurihara H. The protective effect of Schisandra lignans on stress-evoked hepatic metastases of P815 tumor cells in restraint mice. *J Ethnopharmacol.* 2011;134:141-6.
42. Fulda S and Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006;25:4798-811.
43. Nakajima YI and Kuranaga E. Caspase-dependent non-apoptotic processes in development. *Cell Death Differ.* 2017;24:1422-30.
44. Kaufmann T, Strasser A and Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ.* 2012;19:42-50.
45. Tummers B and Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev.* 2017;277:76-89.
46. Hata AN, Engelman JA and Faber AC. The BCL2 family: Key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. *Cancer Discov.* 2015;5:475-87.
47. Decker P and Muller S. Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2002;3:275-83.
48. Dam AD, Mitchell AS, Rush JW and Quadrilatero J. Elevated skeletal muscle apoptotic signaling following glutathione depletion. *Apoptosis.* 2012;17:48-60.
49. Pacher P, Beckman JS and Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87:315-424.
50. Chen JH, Tipoe GL, Liong EC, So HS, Leung KM, Tom WM, Fung PC and Nanji AA. Green tea polyphenols prevent toxin-induced hepatotoxicity in mice by down-regulating inducible nitric oxide-

- derived prooxidants. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:742-51.
51. Zarkovic N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med.* 2003;24:281-91.
52. Dubinina EE and Dadali VA. Role of 4-hydroxy-trans-2-nonenal in cell functions. *Biochemistry (Mosc).* 2010;75:1069-87.
53. Xiong J, Guo Y, Li LY, Hu H, Qu XL, Sun XZ, Liu SH and Wang H. A herbal composition of semen hoveniae, radix puerariae, and fructus schisandrae shows potent protective effects on acute alcoholic intoxication in rodent models. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:638197.
54. Carnac G, Ricaud S, Vernus B and Bonnieu A. Myostatin: biology and clinical relevance. *Mini Rev Med Chem.* 2006;765-70.

Table 1. Experimental designs used in this study

Group	Inducer	Test substances and dose (mg/kg/day)	Animal No.
Control	Intact	Distilled water 10 ml/kg, oral	M01~M08
Control	Dex	Distilled water 10 ml/kg, oral	M09~M16
Reference	Dex	Oxymetholone (50 mg/kg), oral	M17~M24
Active	Dex	EESF (120 mg/kg), oral	M25~M32
Active	Dex	EESF (250 mg/kg), oral	M33~M40
Active	Dex	EESF (500 mg/kg), oral	M41~M48

EESF, ethanol extract of Fructus Schisandrae

Dex, Dexamethasone

About eighty-four male mice were prepared, and six groups of eight mice each were selected based on the body weights (35.76 ± 1.32 g, ranged in 33.40~38.50 g) and calf thicknesses (3.15 ± 0.14 mm, ranged in 2.84~3.42 mm) after 8 days of acclimatization.

Catabolic muscular atrophy was induced by subcutaneous treatment of dexamethasone 1 mg/kg, once a day for 10 days.

Three different dosages of EESF (125, 250 and 500 mg/kg) were orally administered in a volume of 10 ml/kg, once a day for 24 days, initiated 2 weeks before dexamethasone treatment, dissolved in distilled water, and 50 mg/kg of oxymetholone was also orally administered, as same periods as EESF.

Equal volume of distilled water was orally administered in sham and dexamethasone control mice, instead of EESF or oxymetholone, and saline was subcutaneously treated in intact control mice instead of dexamethasone.

Table 2. Primary antisera used in this study

Primary antisera*	Code	Source	Dilution
Anti-cleaved caspase-3 (Asp175) polyclonal antibody	9661	Cell Signaling Technology Inc, Danvers,MA,USA	1:400
Anti-cleaved PARP (Asp214) specific antibody	9545	Cell Signaling Technology Inc, Danvers,MA,USA	1:100
Anti-4-Hydroxynonenal polyclonal antibody	Ab46545	Abcam, Cambridge,UK	1:100
Anti-Nitrotyrosine polyclonal antibody	06-284	Millipore Corporation, Billerica,CA,USA	1:200
Anti-nitric oxide synthase2 (N-20) polyclonal antibody	sc-651	Santa Cruz Biotechnology, Burlingame,CA,USA	1:100
Anti-GDF8/Myostatin antibody	Ab71808	Abcam, Cambridge,UK	1:50

*All antiserum were diluted by 0.01 M PBS, in this experiment

Table 3. Changes on the body weight gains in dexamethasone-induced muscular atrophic mice

Groups	Body weight gains during		
	14 days of test material pre-administration ¹	10 days of dexamethasone treatment periods ²	total 24 days of test material administration periods ³
Controls			
Intact	6.03±1.05	1.53±1.20	3.71±1.30
Dexamethasone Reference	6.08±0.88	-4.08±1.12 ^a	-1.53±1.46 ^a
Oxymetholone	6.19±0.73	-1.21±0.61 ^{ab}	1.58±0.96 ^{ab}
EESF treated			
125 mg/kg	6.23±1.04	-2.79±0.80 ^{ac}	0.45±0.91 ^{ab}
250 mg/kg	6.25±1.04	-2.24±0.96 ^{ab}	0.81±0.98 ^{ab}
500 mg/kg	6.05±0.69	-1.19±1.25 ^{ab}	1.64±1.47 ^{ab}

Values are expressed mean ± S.D. of eight mice, g

The body weight gains during 14 days of test material pre-administration, 10 days of administration periods, and the total 24 days of administration were also calculated to reduce individual differences as follows:

¹Body weight gains (g) during 14 days of test material pre-administration = Body weight at 14 days after initial test material administration - body weight at first administration.

²Body weight gains (g) during 10 days of dexamethasone treatment = Body weight at the day of last dexamethasone administration - body weight at first dexamethasone administration (2 weeks after initial test material administration).

³Body weight gains (g) during total 24 days of administration = Body weight at sacrifice - body weight at the day of first test material administration.

^a p<0.01 as compared with intact control by LSD test.

^b p<0.01 and ^cp<0.05ascomparedwithdexamethasonecontrolbyLSDtest.

Table 4. Changes in calf thickness in dexamethasone-induced muscular atrophic mice

Groups	Calf thickness changes during		
	14 days of test material pre-administration ¹	10 days of dexamethasone treatment ²	Total 24 days of test material administration ³
Controls			
Intact	0.26±0.06	0.02±0.08	0.28±0.10
Dexamethasone Reference	0.29±0.12	-0.80±0.09 ^a	-0.52±0.16 ^a
Oxymetholone	0.42±0.14 ^{bd}	-0.30±0.10 ^{ab}	0.12±0.19 ^{bc}
EESF treated			
125 mg/kg	2.89±0.09	-0.53±0.10 ^{ac}	-0.23±0.16 ^{ac}
250 mg/kg	0.23±0.07	-0.31±0.16 ^{ac}	-0.08±0.12 ^{ac}
500 mg/kg	0.27±0.09	-0.21±0.09 ^{ac}	0.06±0.13 ^{ac}

Values are expressed mean ± S.D. of eight mice, mm

¹Calf thickness changes (mm) after 14 days of test material pre-administration = Calf thickness at 14 days after initial test material administration - calf thickness at first administration.

²Calf thickness changes (mm) after 10 days of dexamethasone treatment = Calf thickness at the day of last dexamethasone administration - calf thickness at first dexamethasone administration (2 weeks after initial test material administration).

³Calf thickness changes (mm) after total 24 days of administration = Calf thickness at sacrifice - calf thickness at the day of first test material administration.

^a p<0.01 as compared with intact control by LSD test.

^b p<0.01 and ^cp<0.05ascomparedwithdexamethasonecontrolbyLSDtest.

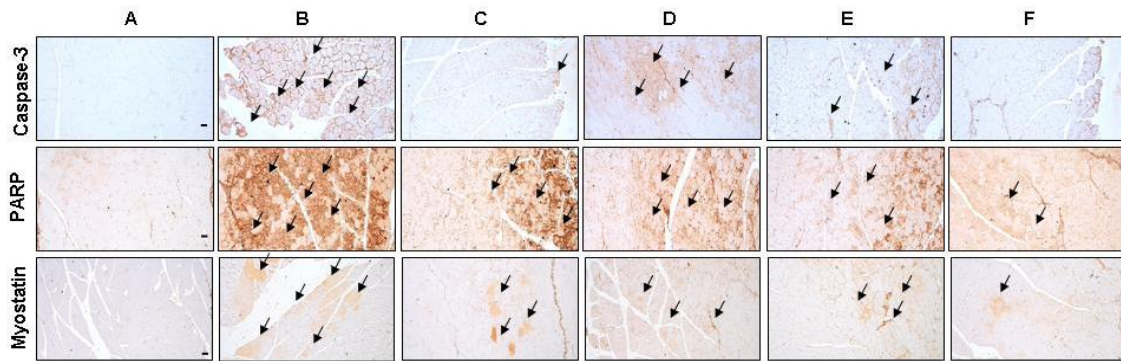


Fig. 1. Representative gastrocnemius muscle immunoreactivities for caspase-3, PARP and myostatin, taken from intact or dexamethasone-induced muscular atrophic mice. The prepared gastrocnemius muscle histological sections were deparaffinized and citrate buffer antigen (epitope) retrieval pretreatment was conducted. The sections were immunostained using ABC methods for caspase-3, PARP and myostatin (A, Intact vehicle control; B, dexamethasone control; C, 50 mg/kg oxymetholone-treated mice; D, 125 mg/kg SF orally treated mice; E, 250 mg/kg SF mg/kg orally treated mice; F, 500 mg/kg SF orally treated mice; Scale bars = 40 μ m).

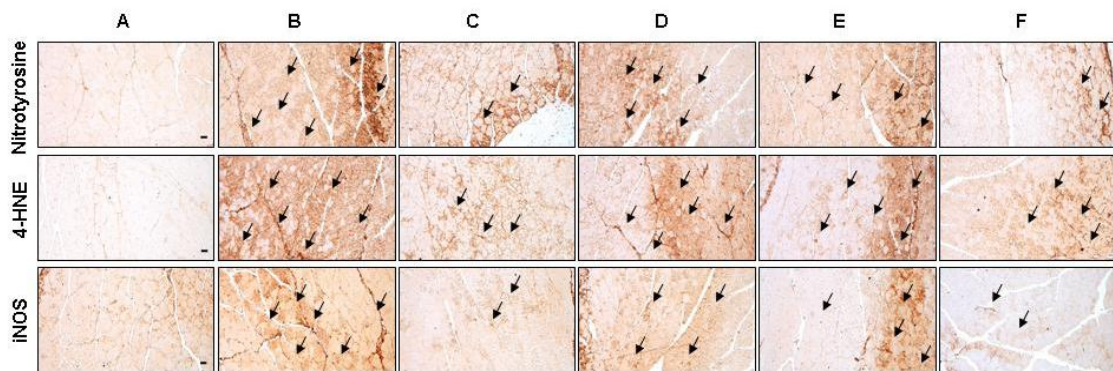


Fig. 2. Representative gastrocnemius muscle immunoreactivities for nitrotyrosine, 4-HNE and iNOS, taken from intact or dexamethasone-induced muscular atrophic mice. The prepared gastrocnemius muscle histological sections were deparaffinized and citrate buffer antigen (epitope) retrieval pretreatment was conducted. The sections were immunostained using ABC methods for nitrotyrosine, 4-HNE and iNOS (A, Intact vehicle control; B, dexamethasone control; C, 50 mg/kg oxymetholone-treated mice; D, 125 mg/kg SF orally treated mice; E, 250 mg/kg SF mg/kg orally treated mice; F, 500 mg/kg SF orally treated mice; Scale bars = 40 μ m).