

訶子 추출물과 그 유효성분 갈산이 근분화에 미치는 영향

천성혜^{1#}, 이효성^{1#}, 한효상^{2*}, 김기광^{1*}

1 : 충남대학교 생화학과, 2 : 중부대학교 보건행정학과

Investigation of the effect of *Terminalia chebula* fruit extract and its active ingredient, gallic acid on muscle differentiation

Seonghye Cheon^{1#}, Hyo Seong Lee^{1#}, Hyo Sang Han^{2*}, Kee Kwang Kim^{1*}

1 : Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

2 : Department of Health Administration, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea

ABSTRACT

Objectives : Decrease in muscle mass and loss of muscle function due to aging are associated with various diseases. As interest in healthy aging increases, efforts to prevent and treat muscle hypoxia as an illness are increasing. Considering the physical limitations, a pharmacologic approach to the treatment of myopenia is needed.

Methods : *Terminalia chebula* Rets has a wide range of pharmacological effects and is used as a medicinal product in traditional medicine. However, the drug effect on the treatment of muscle disorders has not been revealed. The purpose of this study was to evaluate the value of water extract of *Terminalia chebula* (WETC) as a therapeutic agent to relieve symptoms of muscle hypoxia.

Results : WETC showed strong radical scavenging ability. In addition, WETC increased cell activity of myoblast, and we observed that WETC induces myoblast differentiation by immunoblot analysis using differentiation protein markers as well as cell morphology of myoblast. Based on these results, we examined the effect of chebulic acid, chebulagic acid, gallic acid, geraniin, and punicalagin on cell activity and differentiation of myoblasts. Gallic acid significantly increased cell activity of myoblast, and it was found to be an effective substance which not only induces myoblast differentiation but also promotes proliferation.

Conclusions : We suggest that the WETC with antioxidant effect and its indicator gallic acid on cell activity, proliferation and differentiation of myoblast can be studied and developed as a food and medicine for prevention and treatment of various muscle diseases.

Key words : *Terminalia chebula* fruit, myoblast, cell activity, muscle differentiation

I. 서 론

訶子は 新修本草에 처음 收載되었으며, 임상에서 斂肺, 澀腸, 降火力咽의 효능이 있어 久咳失音, 久瀉, 脫肛, 便血, 崩

*Corresponding author : Hyo Sang Han, Department of Health Administration, College of Health and Welfare, Joongbu University, Geumsan 32713, Republic of Korea.

· Tel : +82-41-750-6292. · E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr

Kee Kwang Kim, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-821-5485. · E-mail : kimkk@cnu.ac.kr

#First author : Seonghye Cheon, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.

· Tel : +82-42-821-7525. · Fax : +82-42-822-7548. · E-mail : ealim6230@naver.com

Hyo Seong Lee, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.

· Tel : +82-42-821-7525. · Fax : +82-42-822-7548. · E-mail : lhs30573@naver.com

· Received : 04 January 2019 · Revised : 08 February 2019 · Accepted : 25 March 2019

漏, 帶下, 遺精, 尿頻數의 증상을 치료하는 데 사용되고 있다¹⁾. 訶子是 대한민국 약전에 가자 (訶子) *Terminalia chebula* Retzins 또는 용모가자 (絨毛訶子) *Terminalia chebula* Retzins var. *tomentella* Kurt. (사군자과 Combretaceae) 의 잘 익은 열매라고 收載되어 있다²⁾. 訶子是 triterpene, gallyl glucose 및 gallic acid 등을 함유하고 있다. Tannin 으로 chebulagic acid, chebulinic acid, chebulic acid, glucogallin, chebulin 등을 함유한다. Triterpenoids로 terminoic acid, arjugenin, arjunolic acid, chebupentol 등이 있다. 그 외에 Shilimic acid, quinic acid, ethyl gallate, daucosterol, β -sitosterol을 함유한다. Sennoside A, tannase, polyphenol oxidase, oxidase, ascorbic acid oxidase 등을 함유하고 있다. 이외에 Se, K, Mg, Fe와 Cu 등의 미량원소와 비타민 C 등을 함유하고 있다³⁾. 訶子の 약리작용으로는 항균활성⁴⁻⁶⁾, 항돌연변이 유발효과⁷⁾, 간섬유화 억제활성⁸⁾, 항당뇨활성^{9, 10)}, 암세포성장 억제¹¹⁻¹³⁾, 항염활성¹⁴⁾ 등의 여러 연구들이 보고되었다.

근육은 뼈를 보호하고 체형을 바르게 유지시켜 주며 칼슘 유입을 촉진시켜 골 밀도를 높여 주는 기능을 한다. 근형성 (myogenesis)은 근육조직이 형성되는 과정으로 근원세포 (myoblast)의 분화를 통해 이루어진다. 근형성 과정에서 myoblast는 말단이 분화하여 긴 관성형의 근세포 (myocyte)가 되고, 분화된 myocyte는 세포막 융합을 통해 다핵성세포인 근관세포 (myotube)를 형성한다^{15, 16)}. 근육조직이 외상과 근육위축병 (muscular dystrophy)과 같은 질병에 노출되면 위성세포 (satellite cell) 상태로 증식하고 있던 myoblast가 분화와 융합을 통해 손상된 부위의 근육을 치유하고 재생시킨다. 따라서 myoblast의 분화 및 융합은 배아 발달 과정에서의 근육 형성뿐만 아니라 성인의 골격근을 유지하고, 복구하는데 중요한 역할을 한다. 때문에 다양한 동물 모델에서 myoblast의 배양 시스템을 구축하고 이를 이용한 근육의 증식과 분화에 관련된 연구의 필요성이 강조되고 있으며, 퇴행성 근육 질환의 치료를 위한 연구와 전임상 시험에 myoblast가 실제로 사용되며 연구되고 있다¹⁷⁻¹⁹⁾.

근육 감소증은 근육 섬유가 지방으로 대체되고 근육 내에 과도한 섬유성 결합조직이 형성됨에 따라 근골격의 크기 및 질량이 감소하고 근력의 세기가 약해지는 현상이다²⁰⁾. 건강한 성인의 경우 골격근의 합성 및 분해가 균형적으로 유지되지만 연령이 높아짐에 따라 그 균형이 유지되지 못하며 근육 조직의 질량과 근력의 감소 현상이 나타난다²¹⁻²⁴⁾. 이를 바탕으로 근육 감소증은 노화와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며, 실제로 60~70세의 5~13%, 80세 이상의 50% 인구가 근육 감소증을 겪고 있다²⁵⁾. 인구 고령화와 함께 건강한 노화에 대한 관심이 높아지고 있다. 근육 감소증은 근육 대사의 변화에 의한 근육 기능 상실을 야기할 뿐만 아니라 산화적 스트레스의 유발, 신경접합부의 변성을 통해 고령층의 신체 활동 장애를 초래하고 다양한 질병의 발병 및 질병의 예후에도 큰 영향을 미친다²⁰⁾. 노령화된 환자들에게 근육 감소증의 극복을 위한 운동 요법은 물리적인 한계가 존재한다. 따라서 질병의 진전을 늦추거나 그 영향을 부분적으로 극복할 수 있는 영양학적 연구와 치료 약물 개발의 필요성이 대두되고 있다.

천연물의 생리활성에 대한 관심이 증대되고 있는 가운데

소재물질을 탐색하고, 이를 식·의약품에 실용화하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 한의학에서 다양한 질병의 치료제로 사용되는 訶子 추출물은 항산화 효능²⁶⁾, 생체 내에서 노화의 방지, 궤양 형성의 억제, 심혈관 보호 및 상처 치유 효과를 가지고 있다^{27, 28)}. 현재 訶子 추출물의 구성 물질은 가수분해성 탄닌류의 gallic acid, chebulagic acid, punicalagin, corilagin과 페놀류의 chebulic acid, ellagic acid, 이외에도 gerannin 등이 알려져 있다²⁹⁾. Gallic acid의 항산화, 항균, 항바이러스 및 세포보호활성 효능³⁰⁾과 chebulinic acid, tannic acid, ellagic acid의 암세포 성장 억제 효과가 입증되며¹¹⁾ 訶子 추출물뿐만 아니라 그 구성 물질이 가지는 생리학적 활성에 대한 영향과 이를 바탕으로 한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 하지만 訶子 추출물 및 그 구성 물질과 근육의 증식과 분화와의 관련성에 대해서 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 myoblast 세포를 이용하여 높은 항산화 효능을 가진 訶子 열수 추출물 (WETC)이 근육세포의 활성과 분화에 미치는 영향을 확인하였고, WETC의 구성 물질로 알려진 단일 화합물 가운데 근육의 증식 및 분화에 영향을 미치는 유효 물질을 조사하여 유의미한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 訶子是 한약 제약 회사 (Jeong-Seong Drugstore, Korea)로부터 2018년 8월에 구매 (NO:2018-0815)하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고, 약재는 ultrasonic cleaner를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였으며 실험에 사용된 WETC의 구성 물질은 chebulic acid, chebulagic acid, punicalagin, gallic acid (Sigma Aldrich, USA); chebulic acid (ChemFaces); geraniin (Dalian Meilun Biotech Co., Ltd, China)를 통해 개별 구매하여 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 Ham's F-10 medium (WELGENE, Korea), Dulbecco's modified Eagle medium (WELGENE, Korea), calf serum (Hyclone, USA), horse serum (Gibco, USA), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (WELGENE, Korea), filter paper (Advantec No.2, Japan), DPBS (Corning, USA), Versene (Gibco, USA), potassium persulfate (Sigma, USA), ABTS (Sigma, USA), MTS solution (Promega, USA), anti-Pax-3/7 (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-Myh3 (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-GAPDH (Meridian life Science/Meridian Bioscience, USA), Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Abcam, USA), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Thermo-

Fisher Scientific, USA) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (Thermo Fisher Scientific), waterbath (HAAKE, Germany), automatic non-pressure pot (Dae-Woong, Korea), filterpaper (Advantec No.2, Japan), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), 동결건조기 (Ilshine BioBase, Korea), ultrasonic cleaner (Branson, USA), microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA), LSM 510 Live Configuration Vario Two VRGB confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss, Germany) 등 이다.

2. 방법

1) 訶子 열수추출물 제조

訶子 약재를 100 g으로 중량을 측정 후 분쇄하였다. Automatic non-pressure pot에 분쇄된 약재와 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣어주고 탕액이 끓는 시점으로부터 2 h 동안 가열하여 추출하였다. Filter paper로 추출액을 감압 여과하여 얻은 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 농축액은 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 제작하였고, 동결건조 추출물은 11.584 g으로 측정되었으며, 수율은 11.584%였다.

2) 세포 배양

실험에 사용한 myoblast는 생후 3일 된 C57BL/6의 뒷다리 골격근에서 분리하여 배양하였다. Myoblast는 Ham's F-10 medium에 10% calf serum, 1% 항생제 (100 U/mL penicillin, 100 µg/ml streptomycin), 2.5 µg/ml fibroblast growth factor를 첨가한 growth medium 또는 Dulbecco's modified Eagle medium에 1% horse serum, 1% 항생제 (100 U/mL penicillin, 100 µg/ml streptomycin)를 첨가한 differentiation medium에 배양하였다. 세포는 표준 세포 배양법인 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3) 항산화 효능 측정

ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) assay를 이용하여 측정하였다. Free radical 상태의 ABTS를 만들기 위해 potassium persulfate 2.4 mM과 ABTS 7 mM을 같은 부피로 혼합해주고 실온에서 차광된 상태로 24 시간 반응시켰다. 그 후 free radical 상태의 ABTS를 증류수로 희석하여 흡광도가 0.7 부근이 되는 working solution을 만들어 실험에 사용하였다. 96-well plate의 각 well에 sample 20 µl와 ABTS working solution 80 µl를 넣어준 뒤, 4 분간 암실에서 반응시키고 Microplate reader를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아래 식을 이용하여 항산화 효능을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = (1 - \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Sample blank}}}{A_{\text{Blank}}}) \times 100$$

4) 세포 생존율 평가

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay를 통해 측정하였다. 96-well plate에 분주한 myoblast에 시료를 농도별로 처리한 뒤 24 h 동안 배양하였다. 그 후 각 well에 MTS solution을 20 µl 첨가하여 37°C에서 90 min 동안 반응시키고, microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 세포 생존율은 대조군 대비 시료를 처리한 세포의 흡광도를 백분율로 표시하여 나타내었다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \left(\frac{\text{시료첨가군의 흡광도} - \text{시료자체의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

5) 면역 블롯 분석

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 myoblast로부터 얻은 단백질 샘플을 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane 상으로 이동시키고, non-fat dry milk를 5% 농도로 PBST에 녹인 blocking buffer 와 1 h 동안 처리하여 비특이적인 항체의 결합을 억제시켰다. Blocking buffer에 희석한 1차 antibody를 4°C에서 12 h 동안 처리한 후, 단백질과 결합하지 않은 antibody는 PBST로 세척하였다. Super Signal system을 이용하여 Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies에 결합하여 얻어진 신호를 확인하였다. 면역 블롯 분석에 사용한 1차 antibody의 종류는 anti-Pax-3/7, anti-Myh3, anti-GAPDH이다.

6) 면역 형광 현미경 분석

면역 형광 현미경 분석을 위해 myoblast를 chamber slide에 분주하였다. 세포에 시료를 정해진 농도 및 시간으로 처리한 뒤, 4% paraformaldehyde를 이용하여 10 min 동안 고정시키고 0.5% Triton X-100가 포함된 PBS를 15 min 동안 처리하였다. 이 후 비특이적인 항체 결합을 억제하기 위해 blocking buffer (PBS, 5% goat serum, 0.1% BSA, 0.05% Tween 20)를 상온에서 1 h 동안 처리한 후 blocking buffer에 희석한 anti-Myh3를 4°C에서 12 h 동안 반응시켰다. Mouse IgG에 대한 2차 antibody로는 Alexa Fluor 488-conjugated goat antibody를 사용하였고, 세포핵은 DAPI로 염색하였다. LSM 510 Live Configuration Vario Two VRGB confocal laser-scanning microscope를 통해 면역 형광을 분석하고 이미지화 하였다.

III. 결 과

1. WETC의 항산화 효능 평가

본 연구에서는 ABTS assay를 통해 WETC의 항산화 효능을 평가하였다. 항산화 효능이 잘 알려진 resveratrol을 양성 대조군으로 사용하였고, 10, 100 µM에서 각각 11.51 ± 0.27%,

76.11±0.39%를 보인 resveratrol의 항산화 효능을 바탕으로 실험의 신뢰성을 검증하였다. WETC의 항산화 효능을 평가한 결과 10 µg/ml에서 29.42±0.2,81%, 25 µg/ml에서 63.40±1.55%, 50 µg/ml에서 94.12±0.10%의 라디칼 소거능을 나타내며 농도 의존적인 항산화 효능을 확인하였다.

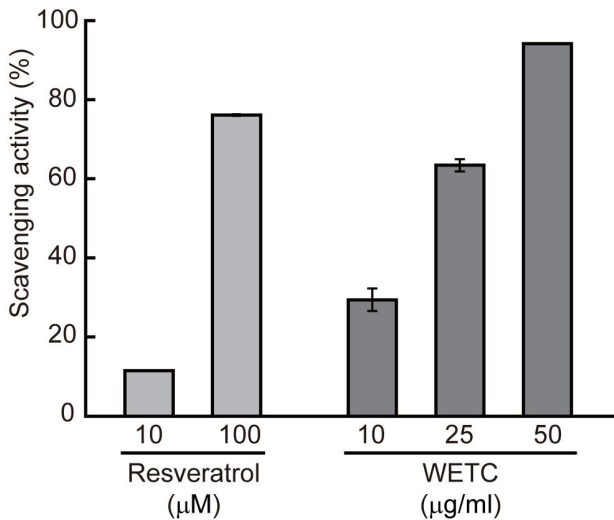


Figure 1. Anti-oxidant activities of the resveratrol and WETC by ABTS assay. n=3 (biological replicates). Average ± S.E.M.

2. WETC에 의한 myoblast의 분화 유도 확인

본 연구에서는 항산화 효능을 가진 WETC가 근육의 성장 및 분화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 먼저, myoblast에 WETC가 미치는 영향을 확인하기 위하여 증식하고 있는 생존 가능한 세포의 수와 세포 독성 또는 화학 감수성 분석용으로 보편적으로 사용되는 MTS assay를 수행하였다. MTS assay는 tetrazolium salt가 미토콘드리아에서 생성되는 NADH, NADPH에 의해 formazan으로 바뀌고, 이 formazan을 490 nm 흡광도로 측정하여 세포 생존율을 확인하는 방법이다³¹. MTS assay 결과, 0.05 mg/ml에서는 124.20±1.52%, 0.1 mg/ml에서는 134.91±2.99%, 0.2 mg/ml에서는 143.78±2.45%의 세포 생존율을 보이며 WETC의 처리에 의해 myoblast의 세포 생존율이 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 2A). Myogenesis 과정에서 myoblast는 myocyte로 분화한 뒤 융합하여 다핵성 세포인 myotube를 형성한다^{15, 16}. Myoblast의 세포 생존율을 증가시킨 WETC를 myoblast에 0.1 mg/ml로 처리하고 세포의 모양을 관찰한 결과, 시간이 지남에 따라 myoblast가 긴 관상형의 세포인 myocyte의 형태로 변화하는 것을 관찰하였다 (Figure 2B). 이 후, 면역 블롯 분석을 통해 WETC에 의한 myoblast의 형태 변화가 myocyte로의 분화 유도에 의한 현상인지 조사하였다. myoblast에 0.1 mg/ml의 WETC를 24, 48 h 동안 처리한 후 면역 블롯 분석을 통해 Pax-3/7과 Myh3 단백질의 발현을 비교한 결과, WETC의 처리에 의해 Pax-3/7의 발현이 감소하고 Myh3 단백질의 발현이 증가하며 WETC가 myoblast의 분화를 유도하는 것을 확인하였다 (Figure 2C).

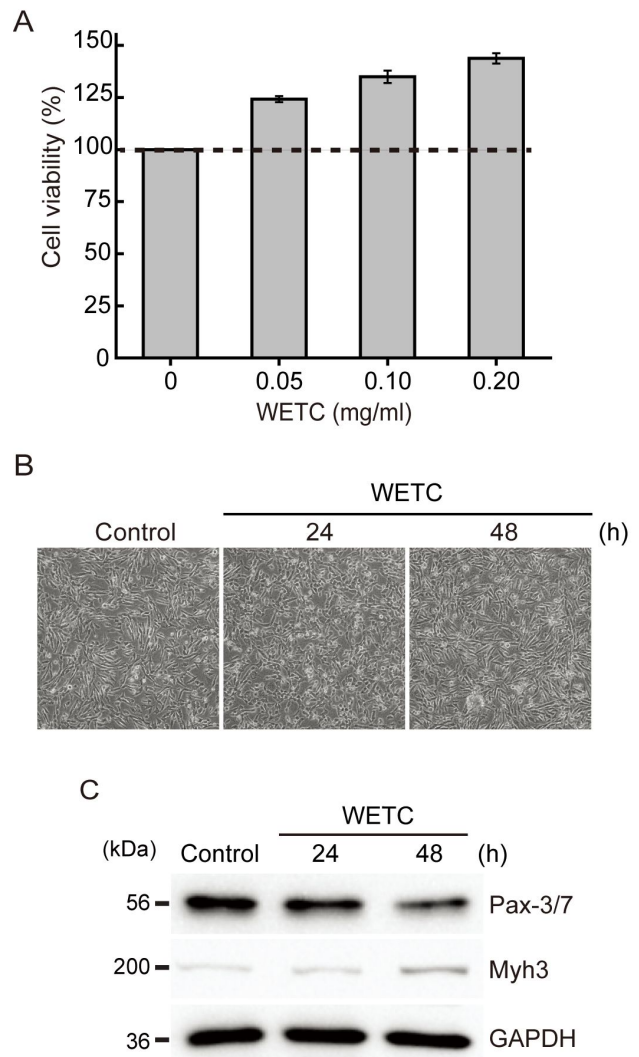


Figure 2. Effect of WETC on the differentiation of myoblasts. (A) Myoblast were treated with indicated concentrations of WETC for 24 h. Cell viability was measured by MTS assay. (B, C) Myoblast were treated with 0.1 µg/ml WETC for 24, 48 h. (B) The morphology of cells was photographed at the indicated times. (C) Immunoblot analysis was performed using anti-Pax-3/7, anti-Myh3; GAPDH was served as control.

3. WETC의 구성 물질이 Myoblast의 분화에 미치는 영향 검증

이 전 연구를 통해 myoblast의 세포 생존율을 증가시키며 분화를 유도하는 WETC의 효능을 검증하였다. WETC의 구성 물질들 가운데 myoblast 세포의 세포 생존율의 증가와 분화를 유도하는 대표적인 유효물질이 무엇인지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. Chebulic acid, chebulagic acid, gallic acid, geraniin, punicalagin은 WETC의 대표적인 구성 물질로 알려져 있다. Myoblast에 다섯 가지 구성 물질을 농도 별로 24 h 동안 처리한 후 MTS assay를 통해 세포 생존율을 측정된 결과, 5가지 구성 물질에 의해 myoblast의 세포 생존율이 모두 증가한 것을 확인하였다. 특히, gallic acid를 처리한 myoblast의 경우 10 µg/ml에서 133.08±1.84%, 20 µg/ml에서 159.69±2.49%, 40 µg/ml에서 181.00±3.15%의 세포 생존율을 보이며 myoblast의 세포 생존율이 가장 크게

증가하였다. Myoblast에 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 다섯 가지 구성 물질을 48 h 동안 처리한 후 면역 블롯 분석을 통해 myoblast의 Pax-3/7과 Myh3 단백질 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, chebulagic acid, gallic acid, geraniin에 의해 myoblast의 myh3 발현이 증가하며 분화를 유도하는 구성 물질을 검증하였다. 더불어, gallic acid와 geraniin를 처리한 myoblast의 경우 Myh3 뿐만 아니라 Pax-3/7의 발현도 증가하였다. 이는 gallic acid와 gerannin은 myoblast의 생리 활성에 관여하여 myoblast의 증식과 분화를 모두 촉진한다는 것을 의미한다.

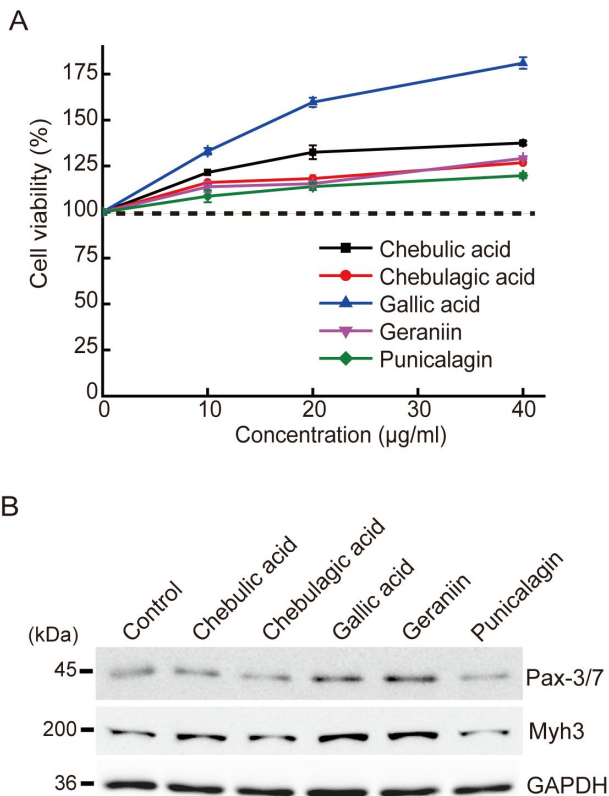


Figure 3. Effect of the constituents of WETC on differentiation of myoblast. (A) myoblast were treated with indicated concentrations of the constituents of WETC for 24 h. Cell viability was measured by MTS assay. (B) myoblast were treated with 20 $\mu\text{g/ml}$ WETC constituents for 48 h, and immunoblot analysis was performed using anti-Pax-3/7, anti-Myh3; GAPDH was served as control.

4. Gallic acid가 myoblast의 분화에 미치는 영향 확인

WETC의 다섯 가지 구성 물질 가운데 gallic acid는 myoblast의 세포 활성을 가장 크게 증가시키며, 분화 유도과 함께 증식을 촉진하는 효능을 가지는 것을 앞 선 결과를 통해 확인하였다. WETC의 유효물질 중 가장 효과가 뛰어난 단일 화합물인 gallic acid가 근육의 증식과 분화에 관여하는 생리 활성 효능을 추가적인 실험을 통해 검증하였다. Myoblast에 gallic acid를 48 h 동안 농도별로 처리하였고, 면역 블롯 분석을 통해 단백질의 발현 변화를 확인한 결과 Pax-3/7과

Myh3의 발현이 모두 농도 의존적으로 증가하며 myoblast의 증식과 분화를 촉진하는 gallic acid의 효능을 확인하였다. Myoblast는 배양 배지의 변화를 통해 증식과 분화 환경을 각각 조성할 수 있다. 본 실험에서는 myoblast에 differentiation medium (D.M.)을 48 h 동안 처리하여 분화를 유도하였다. 또한 gallic acid에 의한 myoblast 분화 유도 효과를 확인하기 위해 growth medium (G.M.)에 gallic acid를 20 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석하여 48 h 동안 처리하였다. 각각의 조건하에서 myoblast의 Myh3 단백질의 발현 변화를 면역 형광 분석을 통해 시각화하여 비교한 결과, D.M. 조건 하에서 분화를 유도한 myoblast는 control에 비해 Myh3의 발현이 크게 증가하였고, 세포 융합이 일어나 다핵성의 myotube가 형성된 것이 관찰되었다. 그리고 gallic acid를 처리한 myoblast에서는 control 보다 Myh3의 발현이 증가하며 myoblast의 분화를 유도하는 gallic acid의 면역 블롯 분석 결과를 재확인 하였다. 더불어, D.M. 조건하에서 형성된 myotube는 관찰되지 않았지만 Myh3의 발현이 긴 관상형의 myocyte 형태와 유사하게 확인되었다.

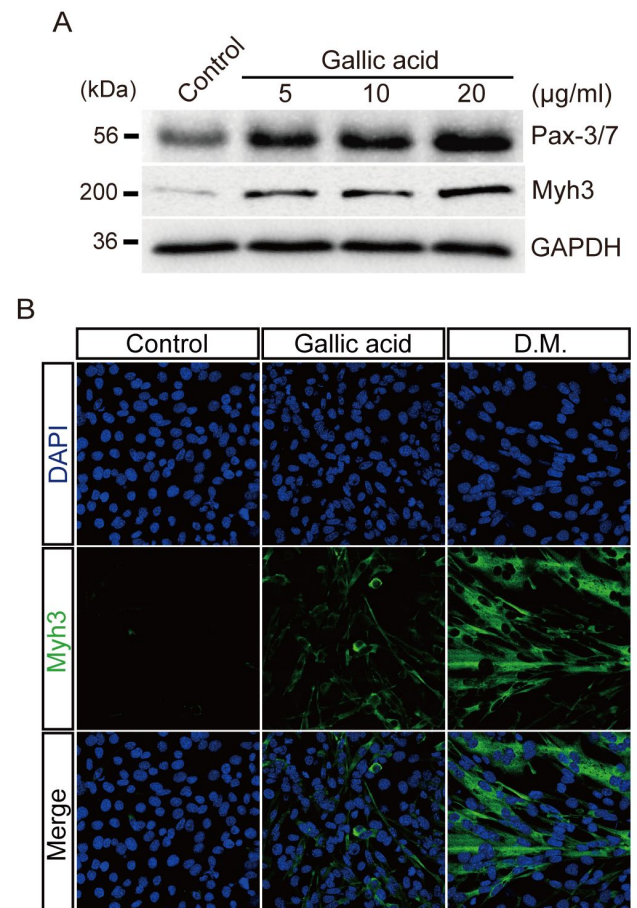


Figure 4. Effect of gallic acid on differentiation of myoblast. (A) myoblast were treated with indicated concentrations of gallic acid. Immunoblot analysis was performed using anti-pax-3/7, anti-myh3; GAPDH was served as control. (B) myoblast were cultured in 20 $\mu\text{g/ml}$ gallic acid or in differentiation media (D.M) for 48 h, and subjected to immunofluorescence. Myh3 (green) was visualized in the immunofluorescence image. DAPI (blue) was used for nuclear staining.

IV. 고 찰

노화에 따른 근육 위축증은 산화적 스트레스, 염증, 내분비계의 비활성화, 영양 부족 등 다양한 요인과의 상호작용을 통해 발생한다. 그 중 산화적 스트레스는 세포 내 신호 전달 경로에 영향을 미쳐 단백질의 합성과 분해의 불균형을 초래하고, 세포 사멸을 유도하며 근육량의 손실을 일으키는 요인이 된다^{32, 33}. 최근 산화적 스트레스에 의해 근육 단백질의 합성을 자극하는 류신의 활성이 저해된 늙은 쥐에 항산화 물질을 투여한 경우 근육 단백질 대사가 개선되었다는 연구 결과가 있다³⁴. 이처럼 산화적 스트레스에 의한 근육 감소증을 완화하기 위한 항산화 물질의 검증과 연구는 매우 중요하다.

한의학에서 訶子是 탁월한 약리학적 효능으로 의약의 왕이라 불리며 다양한 질병의 치료에 사용되고 있으며 訶子の 열매, 뿌리, 잎 등 모든 기관들의 약용 가치가 잘 알려져 있다. 訶子를 열수 추출한 WETC의 대표적인 구성 성분에는 chebulic acid, chebulagic acid, gallic acid, geraniin, punicalagin가 있다³⁵. WETC가 myoblast의 세포 생존율과 근육의 분화에 미치는 효과를 근육 감소증의 예방 및 치료 분야에 적용하여 연구 및 개발하기 위해서는 WETC의 다양한 유효 성분 중 단일 화합물에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 ABTS assay를 통해 WETC의 항산화 효능을 평가하였고, 항산화 효능이 잘 알려진 resveratrol을 양성 대조군으로 사용하여 10 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 라디칼 소거능을 나타내며 농도 의존적인 항산화 효능이 있음을 확인하였다.

항산화 효능을 가진 WETC가 근육의 성장 및 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, WETC에 의한 myoblast의 변화를 MTS assay 통해 확인하였다. 그 결과, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml에서 세포 생존율을 보이며 WETC의 처리에 의해 myoblast의 세포 생존율이 증가하는 것을 확인하였다. Myoblast의 세포 생존율을 증가시킨 WETC를 myoblast에 0.1 mg/ml로 처리하고 세포의 모양을 관찰한 결과, 시간이 지남에 따라 myoblast가 긴 관상형의 세포인 myocyte의 형태로 변화하는 것을 관찰하였으며, myoblast에 0.1 mg/ml의 WETC를 24, 48 h 동안 처리한 후 면역 블롯 분석을 통해 Pax-3/7과 Myh3 단백질의 발현을 비교한 결과, WETC의 처리에 의해 Pax-3/7의 발현이 감소하고 Myh3 단백질의 발현이 증가하며 WETC가 myoblast의 분화를 유도하는 것을 확인하였다.

Chebulic acid, chebulagic acid, gallic acid, geraniin, punicalagin은 WETC의 대표적인 구성 물질로 Myoblast에 다섯 가지 구성 물질을 농도별로 24 h 동안 처리한 후 MTS assay를 통해 세포 생존율을 측정된 결과, gallic acid를 처리한 myoblast의 경우 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포 생존율을 보이며 myoblast의 세포 생존율이 가장 크게 증가하였으며 Myoblast에 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 다섯 가지 구성 물질을 48 h 동안 처리한 후 면역 블롯 분석을 통해 myoblast의 Pax-3/7과 Myh3 단백질 발현 변화를 확인한 결과, chebulagic acid, gallic acid, geraniin에 의해 myoblast의 myh3 발현이 증가하며 분화를 유도하는 구성 물질을 검증하였으며, gallic acid와 geraniin를 처리한 myoblast의 경우

Myh3 뿐만 아니라 Pax-3/7의 발현도 증가하였다.

후기 발달 단계에서 골격근 내 위성세포는 MyoD, Myf5, myogenin 와 같은 근육 전사인자의 발현을 조절하는 전사인자인 Pax-3와 Pax-7을 발현을 통해 출생 후의 근육 성장 및 근육의 재생을 조절한다. Myoblast에서 Pax-3와 Pax-7의 발현은 분화를 억제하고 증식을 촉진한다³⁶. Myh3는 myotube에서 가장 많이 발현되는 단백질 중 하나로 ATP의 가수분해를 통해 근육의 수축에 관여하는 단백질로 myoblast가 분화에 따라 그 발현이 증가한다³⁷. 따라서 두 단백질은 myoblast의 분화를 확인할 수 있는 마커 단백질로 사용된다.

WETC의 다섯 가지 구성 물질 가운데 gallic acid는 비만과 연관된 동맥 경화증의 발병 이전에 중요한 역할을 하는 혈관 평활근의 증식을 억제한다는 연구 결과가 있다³⁸. 본 연구에서는 골격근의 증식과 분화에 미치는 gallic acid의 생리활성 효능을 검증하였고, 그 결과 myoblast의 Pax-3/7과 Myh3의 발현이 모두 농도 의존적으로 증가하며 myoblast의 증식과 분화를 촉진하는 gallic acid의 효능을 확인하였다. 또한 본 실험에서는 myoblast에 differentiation medium (D.M.)을 48 h 동안 처리하여 분화를 유도한 결과 D.M. 조건 하에서 분화를 유도한 myoblast는 control에 비해 Myh3의 발현이 크게 증가하였고, 세포 융합이 일어나 다핵성의 myotube가 형성된 것이 관찰되었다. 그리고 gallic acid를 처리한 myoblast에서는 control 보다 Myh3의 발현이 증가하며 myoblast의 분화를 유도하는 gallic acid의 면역 블롯 분석 결과를 재확인 하였다. 더불어, D.M. 조건하에서 형성된 myotube는 관찰되지 않았지만 Myh3의 발현이 긴 관상형의 myocyte 형태와 유사하게 확인되었다. 그러므로 이러한 결과는 Gallic acid는 근육의 분화를 촉진하여 근육 감소증의 증상 가운데 근육의 크기와 질량의 증가에 직접적인 도움을 준다. 더불어 myoblast의 세포 생존율을 증가시키고, 증식 자체를 촉진하여 근육 조직을 형성할 수 있는 잠재능력도 향상시키며 gallic acid는 근육 감소증의 치료뿐만 아니라 예방을 위한 약물의 개발에도 적용할 수 있음을 시사한다.

질병을 예방하고 치료하는 식·의약품의 개발에 천연 유래 물질의 생리 활성을 이용하기 위해서는 질병의 근본적인 원인과 함께 천연 유래물질이 표적으로 하는 기작에 대한 연구가 필요하다. 따라서 노화와 근육 감소증의 상관관계와 더불어 WETC와 gallic acid가 myoblast의 증식과 분화에 관여하는 구체적인 기작에 대한 심화 연구가 수행되어 진다면 새로운 건강 기능 식품과 의약품으로 개발될 수 있는 가치가 있다고 생각되는 바이다.

V. 결 론

본 연구에서 訶子 열수 추출물(WETC)이 항산화 효능 및 myoblast의 세포 활성 증가 그리고 면역 블롯 분석을 통해 WETC의 처리에 의해 myoblast의 분화 마커 단백질의 발현 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ABTS assay를 통해 WETC의 라디칼 소거능을 나타내며 농도 의존적인 항산화 효능이 있음을 확인하였다.

2. WETC가 근육의 성장 및 분화에 미치는 영향을 알아보고자 myoblast의 세포 생존율의 변화를 관찰하기 위해 MTS assay를 수행한 결과 농도 의존적으로 세포 생존율을 보이며 WETC의 처리에 의해 myoblast의 세포 생존율이 증가하는 것을 확인하였다.
3. myoblast에 WETC를 처리하고 세포의 모양을 관찰한 결과, 시간이 지남에 따라 myoblast가 긴 관상형의 세포인 myocyte의 형태로 변화하는 것을 관찰하였으며, 면역 블롯 분석을 통해 Pax-3/7의 발현이 감소하고 Myh3 단백질의 발현이 증가하며 WETC가 myoblast의 분화를 유도하는 것을 확인하였다.
4. WETC의 대표적인 구성 물질 중 gallic acid를 처리한 myoblast의 경우 농도 의존적으로 세포 생존율을 보이며 myoblast의 세포 생존율이 가장 크게 증가하였으며 면역 블롯 분석을 통해 myoblast의 Pax-3/7과 Myh3 단백질 발현 변화를 확인한 결과, chebulagic acid, gallic acid, geraniin에 의해 myoblast의 myh3 발현이 증가하며 분화를 유도하는 구성 물질을 검증하였으며, gallic acid와 geraniin를 처리한 myoblast의 경우 Myh3 뿐만 아니라 Pax-3/7의 발현도 증가하였다.
5. myoblast에 differentiation medium (D.M.)을 48 h 동안 처리하여 분화를 유도한 결과 control에 비해 Myh3의 발현이 크게 증가하였고, 세포 융합이 일어나 다핵성의 myotube가 형성된 것이 관찰되었고 gallic acid를 처리한 myoblast에서는 control 보다 Myh3의 발현이 증가하며 myoblast의 분화를 유도하는 gallic acid의 면역 블롯 분석 결과를 재확인 하였으며 Myh3의 발현이 긴 관상형의 myocyte 형태와 유사하게 확인되었다.

향후 WETC가 노화와 다양한 질병의 원인이 되는 활성 산소를 제거하고, 근육의 대사과정에 관여하여 건강한 근육을 합성함으로써 근육 감소증을 치료할 수 있는 효능에 대한 보다 깊은 연구가 필요한 것으로 생각되는 바이다.

감사의 글

이 논문은 충남대학교 자체연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Kim IR KH, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, LeeYC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY, Boncho-Hak, Seoul : Young-Lim Press, 2007 : 671-2.
2. Korea Food and Drug Administration, The Korean Pharmacopoeia Eleventh Edition, Seoul : Korea Food and Drug Administration, 2018 : 3-4.
3. HC K, Hanbanyagli-Hak, Seoul : Jibmundang, 2001 : 493-4.
4. Malekzadeh F, Ehsanifar H, Shahamat M, Levin M, Colwell RR. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents*. 2001 ; 18(1) : 85-8.
5. Koo JE, Kim SO. Anti-microbial Activities of the Extract of *Terminalia chebula* Retz. for Cosmetics. *J Kor Soc Esthe & Cosm*, 2011 ; 6(4) : 289-94.
6. Nam KY, Lee JS. Dyeing Property and Antimicrobial activity of Protein Fiber Using *Terminalia chebula* Retzius Extract. *Fashion & Text Res J*. 2014 ; 16(3) : 476-84.
7. Kaur S, Arora S, Kaur K, Kumar S. The in vitro antimutagenic activity of *Triphala*-an Indian herbal drug. *Food Chem Toxicol*, 2002 ; 40(4) : 527-34.
8. Lee HS, Koo YC, Lee KW. Suppressive Activity of Extract of *Terminalia chebula* Retz. on Hepatic Fibrosis. *Korean J. Food Sci Technol*. 2009 ; 41(5) : 597-601.
9. Sabu MC1, Kuttan R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J Ethnopharmacology*. 2002 ; 81(1) : 155-60.
10. Silawat N, Gupta VB. Chebulic acid attenuates ischemia reperfusion induced biochemical alteration in diabetic rats. *Pharm Biol*. 2013 ; 51(1) : 23-9.
11. Saleem A, Husheem M, Härkönen P, Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *J Ethnopharmacology*. 2002 ; 81(3) : 327-36.
12. Achari C, Reddy GV, Reddy TC, Reddanna P. Chebulagic acid synergizes the cytotoxicity of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma through COX-2 dependant modulation of MDR-1. *Med Chem*, 2011 ; 7(5) : 432-42.
13. Lee YH. The Inhibitory Effect on Androgen Receptor-Dependent Prostate Cancer Cell Growth by Anti-Histone Acetyltransferase Activity from *Terminalia chebula* Retz. Fruit Methanol Extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2013 ; 42(10) : 1539-43.
14. Bag A, Kumar Bhattacharyya S, Kumar Pal N, Ranjan Chattopadhyay R. Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits. *Pharm Biol*, 2013 ; 51(12) : 1515-20.
15. Konigsberg IR. Clonal analysis of myogenesis. *Science*. 1963 ; 140(3573) : 1273-84.

16. Mintz B, Baker WW. Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocitrate dehydrogenase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967 ; 58(2) : 592–8.
17. Chen E. *Current Topics in Membranes*. Cambridge: ELSEVIER Academic Press INC. 2011 : 235–58.
18. Shinn–Thomas JH, Mohler WA. New Insights into the Mechanisms and Roles of Cell–Cell Fusion. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011 ; 289 : 149–209.
19. Timon Seeger CC, Ioannis Karakikes, Joseph C. *Cardiac Electrophysiology : From Cell to Bedside*. Cambridge : ELSEVIER Academic Press INC. 2018 : 284–92.
20. Ryall JG, Schertzer JD, Lynch GS. Cellular and molecular mechanisms underlying age–related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology*. 2008;9(4):213–28.
21. Marcell TJ. Sarcopenia: causes, consequences, and preventions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003 ; 58(10) : M911–6.
22. Balagopal P, Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS. Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy–chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am J Physiol*. 1997 ; 273(4 Pt 1) : E790–800.
23. Volpi E, Sheffield–Moore M, Rasmussen BB, Wolfe RR. Basal muscle amino acid kinetics and protein synthesis in healthy young and older men. *JAMA*. 2001 ; 286(10) : 1206–12.
24. Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *Clin Geriatr Med*. 2011 ; 27(3) : 337–9.
25. Morley JE. Sarcopenia: diagnosis and treatment. *J Nutr Health Aging*. 2008 ; 12(7) : 452–6.
26. Hazra B, Sarkar R, Biswas S, Mandal N. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica* and *Emblica officinalis*. *BMC Complement Altern Med*. 2010 ; 10 : 20.
27. Babu BH, Larkin A, Kumar H. Effect of Plant Growth Regulators on Rooting Behavior of Stem Cuttings of *Terminalia chebula* (Retz.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2018 ; 7(8) : 2475–82.
28. Maurya SK, Seth A. Potential medicinal plants and traditional ayurvedic approach towards Urticaria, an allergic skin disorder. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014 ; 6(5) : 172–7.
29. Juang LJ, Sheu SJ, Lin TC. Determination of hydrolyzable tannins in the fruit of *Terminalia chebula* Retz. by high–performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Sep Sci*. 2004 ; 27(9) : 718–24.
30. Gaire BP, Jamarkattel–Pandit N, Lee D, Song J, Kim JY, Park J, Jung S, Choi HY, Kim H. *Terminalia chebula* extract protects OGD–R induced PC12 cell death and inhibits lps induced microglia activation. *Molecules*. 2013 ; 18(3) : 3529–42.
31. Dunigan DD, Waters SB, Owen TC. Aqueous soluble tetrazolium/formazan MTS as an indicator of NADH– and NADPH–dependent dehydrogenase activity. *Biotechniques*. 1995 ; 19(4) : 640–9.
32. Moylan JS, Reid MB. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve*. 2007 ; 35(4) : 411–29.
33. Koopman R, van Loon LJ. Aging, exercise, and muscle protein metabolism. *J Appl Physiol*. 2009 ; 106(6) : 2040–8.
34. Marzani B, Balage M, Vénien A, Astruc T, Papet I, Dardevet D, Mosoni L. Antioxidant supplementation restores defective leucine stimulation of protein synthesis in skeletal muscle from old rats. *J Nutr*. 2008 ; 138(11) : 2205–11.
35. Lee Y, Byun HS, Seok JH, Park KA, Won M, Seo W, Lee SR, Kang K, Sohn KC, Lee IY, Kim HG, Son CG, Shen HM, Hur GM. *Terminalia Chebula* provides protection against dual modes of necroptotic and apoptotic cell death upon death receptor ligation. *Sci Rep*. 2016 ; 6 : 25094.
36. Brzoska E, Przewozniak M, Grabowska I, Janczyk–llach K, Moraczewski J. Pax3 and Pax7 expression during myoblast differentiation in vitro and fast and slow muscle regeneration in vivo. *Cell Biol Int*. 2009 ; 33(4) : 483–92.
37. Stern–Straeter J, Bonaterra GA, Kassner SS, Zügel S, Hörmann K, Kinscherf R, Goessler UR. Characterization of human myoblast differentiation for tissue–engineering purposes by quantitative gene expression analysis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 ; 5(8) : e197–206.
38. Hsieh SC, Wu CC, Hsu SL, Feng CH, Yen JH. Gallic acid attenuates TGF–beta1–stimulated collagen gel contraction via suppression of RhoA/Rho–kinase pathway in hypertrophic scar fibroblasts. *Life Sci*. 2016 ; 161 : 19–26.