



Original Article / 원저

Dexamethasone으로 유도한 근감소 동물모델에서 상황버섯-오미자박 고상발효 열수추출물의 근감소 개선에 대한 효과

황수진^{1,2}, 김영숙³, 오태우^{2,4*}

¹동국대학교 한의과대학, 한방생리학교실

²한국한의학연구원 한의기술응용센터

³(주)글루칸

⁴과학기술연합대학원대학교, 한국한의학연구원 스쿨 한의융합과학 전공

Effect of water extract *Phellinus linteus*-discard *Schisandra chinensis* solid fermented extracts in an Animal Model of Dexamethasone-Induced Muscle Loss

Su-Jin Hwang^{1,2}, Young-Suk Kim³, Tae Woo Oh^{2,4*}

¹Department of Physiology, College of Korean Medicine Dongguk University,
Gyeongju 38066, Korea

²Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental
Medicine (KIOM), 70 Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu 41062, Republic of
Korea.

³ Glucan Co. Ltd., 25-15, Worasan-ro 950 beon-gil, Munsan-eup, Jinju-si
52840, Gyeongsangnam-do, Korea

⁴Department of Korean Convergence Medical Science, University of
Science & Technology(UST), 1672 Yuseongdae-ro, Yuseong-gu, Daejeon
34054, Republic of Korea.

ABSTRACT

Objectives : In this study, it was investigated the effects of solid-phase fermentation extraction with *Phellinus linteus* of discarded *Schisandra chinensis* extract (PS) and its action mechanism on dexamethasone-induced muscle atrophy in mice.

© 2022 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Methods : In mice, muscle atrophy model was induced by dexamethasone (5 mg/kg, i.p) once daily for 2 weeks and with PS extract administration (100 and 300 mg/kg, p.o.) as treatment groups. The changes in body weights, grip strength, Treadmill test, muscle weights, and the expression of atrophy-related genes were measured in muscle atrophy mice. The histological changes of gastrocnemius tissues were also observed by H&E staining with measurement of myofiber size.

Results : The administration of PS extract increased significantly body weights, grip strength, treadmill test and muscle weights in muscle atrophy mice. PS extract administration increased significantly the area of myofibers and inhibited structural damages of muscle and increased significantly the expression of myogenin and decreased significantly the expression of MuRF1, Atrogin1 and phosphorylation of AMPK and PGC1 α in muscle tissues of muscle atrophy mice.

Conclusions : These results indicate that PS extract has a improvement effects on muscle atrophy with stimulation of myogenic differentiation and inhibition of mRNA degradation that could be related with the activation of AMPK and PGC1 α signaling pathways in muscle. This suggests that PS extract can apply to treat muscle atrophy in clinics.

Key words : *Phellinus linteus*, *Schisandra chinensis*, Dexamethasone, Skeletal muscles, sarcopenia

I. 서론

근육의 위축은 과도한 단백질 분해로 인하여 근육의 기능이 저하되고, 질량이 감소되는 현상을 말한다¹⁾. 골격근은 수의근이라고 말하며 이는 우리 몸의 자세 유지 및 운동 촉진 등의 기능적 역할 뿐만 아니라 전신 항상성에서 포도당 대사에 관여하는 등 주요한 역할을 한다. 우리나라의 경우 60세 이상의 인구 비율은 2050년에 두 배 이상으로 증가할 것으로 예상되며, 또한 전세계적으로도 노인 인구 증가는 중요한 사회적 문제로 대두되고 있으며, 이러한 노인 인구 증가는 근육 위축이라는 질환의 증가율과도 밀접한 관련이 있다²⁾. 근육 위축은 근육량의 손실, 쇠약, 피로 및 근육 수축 활동의 감소를 포함하여 여러 병인을 가져 만성 심부전, 만성 신장 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환 및 암 등과 같은 만성 질환에서 악화되는 병인을 제공하여, 근 위축은 삶의 질과 사망률 및 이환율의 증가에 영향을 미치는 주요한 요인이다. 최근 근감소증(sarcopenia)을 유발하는 근감소증(muscopenia)의 증상 중 하나로 근위축(muscle atrophy)이 알려져 있으며³⁾, 이에 따라 전 세계적으로 연구주제로서 연구자들의 주목을 받고 있는 근위축증에 대한 약물치료를 비롯한 전문적인 치료제 개발이 필요하다.

내인성 글루코코르티코이드(GC, glucocorticoid)는 포유동물의 에너지 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 하는 스트레스 호르몬이라는 것을 이미 잘 알려져 있다. 반면 과도한 GC 자극은 고혈당, 인슐린 저항성, 지방간, 근육 위축 및 심각한 대사 기능장애와 같은 부작용과도 관련이 있다⁴⁾. 합성 GC인 Dexamethasone(Dex)은 류마티스 관절염, 기관지 천식 및 전신성 홍반성 루푸스 등 다양한 염증성 질환을 치료하는데 일반적으로 사용되는 의약품으로 고용량의 투약 또는 장기간 복용을 하면, 근육량 손실 및 기능 장애와 같은 심각한 부작용을 일으킬 수 있다. 또한 과도한 덱사메타손 사용은 인슐린 신호 장애에 의한 포도당 소비 및 이용을 억제하여 근육 위축을 유도하기 때문에 생체내 및 시험관내 연구 모두에서 근육위축을 유도하는 약물로 사용되고 있다⁵⁾. 특히, 덱사메타손 유도 근육 위축 모델에서 근육 특이적인 Atrogin-1과 E3 유비퀴틴 리가아제인 MuRF-1의 활성화에 의한 단백질 분해 인자의 활성화가 보고되었다⁶⁾.

근 위축, 중증 근무력증, 근이영양증, 근육 위축 및 운동 신경 질환을 포함한 질환에 대하여 한의학에서는 근육의 저하를 비롯한 신체기능에 대하여 전반적인 약화를 초래하여 기능 회복이 점점 어려워지는 시들음 질병에 포함하였으며, 이 시들음병은 팔 다리의 근육과 정맥이 약하거나 오랫동안 활동하지 않아서 사지 기형

*Corresponding author: Tae Woo Oh, Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 70 Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu, 41062, Republic of Korea.
Tel : +82-53-940-3833, E-mail : taewoo2080@kiom.re.kr

•Received : November 6, 2022 / Revised : November 11, 2022 / Accepted : November 13, 2022

과 함께 근육 위축을 일으키는 질환을 말한다. 따라서 한의학에서는 근위축은 질병보다는 증상의 범주에 포함시켰으며⁷⁾, 이 증상은 4가지의 주요상태를 나타낸다. I) 불규칙한 식사는 비장과 위장을 손상시켜 기혈변형(氣血變型) 결핍에 영향을 미치는 증상 II) 기분전환, 간에서의 혈액 저장, 간이 마름으로 인한 신체활동 능력에 영향을 미치는 증상 III) 온열과 열을 포함한 기(氣), 피(血), 체액(血液)은 내장과 창자(腸腸), 사지(四肢), 근육(筋筋), 힘줄(筋肉)로 인한 체액 손상 IV) 신장의 기능 상실의 증상으로 분류하였으며, 따라서 전통의학에서는 근육의 위축이 주로 간 및 신장 결핍, 비장 및 위장의 약화로 인하여 발생한다고 보고 있다. 결국 근위축은 몸의 항상성 불균형에 의한 신체기능 저하를 일컫는다⁸⁾.

지난 수십 년 동안 사람들은 근육 위축의 분자 메커니즘을 연구하고 치료제를 개발하려고 하였지만, 효과적인 약물이거나 치료제 개발은 아직까지 이루어지지 않았다. 현재 주요 치료법은 약물적인 치료법보다는 운동 훈련, 영양보충제, 물리치료 등이 있다⁹⁾. 그러나 운동 요법은 고령자, 병상에 누워 있는 환자 및 급성 질환이 있는 사람들에게 심각하게 제한적으로 이루어지고 있으며, 또한 현재 개발되는 많은 영양소가 근육 소모에 유익한 것으로 밝혀졌지만 대부분은 여전히 일차 근육 소모가 있는 환자에 국한되고 있는 실정이다¹⁰⁾. 최근 근육 위축을 치료하기 위하여 많은 연구가 진행 중이지만, 임상적으로 승인된 경우는 없으며, 따라서 부작용이 적은 효과적인 근위축증 치료제나 보조제를 개발하는 것이 중요하다.

이전의 연구에서 저자는 이미 탄소중립에 대한 리사이클링 산업 소재로서 오미자박 활용도를 가늠해보고자 오미자박에 대한 상황버섯 고상발효물을 제조하여 추출한 열수 추출물로부터 atorvastatin으로 유도된 근 위축 세포모델에서 유의한 결과 보고하였으며¹¹⁾ 그 후속연구로서, 텍사메타손으로 유도된 근감소 동물모델에서 그 효능을 검증하여, 근 위축 동물모델에서 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물 제조

1) 상황버섯 오미자박 고상발효 추출물(PS) 제조

본 실험에 사용된 상황버섯 오미자박 고상발효 분말(해양심층수 경도 200)추출물은 (주)글루칸에서 제조 후 추출물을 분양받아 사용하였다. 추출을 제조한 방법은 오미자박을 60°C에서 48hr 열풍건조하고 건조된 오미자박을 분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 오미자박을 고상발효 용기에 5% 설탕과 해양심층수(경도 200, QBM)를 혼합하여 오미자박과 50:50의 비율로 혼합하고 이를 121°C 1.1kg/cm²으로 30분 동안 멸균시킨 후 5°C/min의 속도로 25°C까지 냉각시켰다. 냉각된 오미자박에 상황버섯(*Phellinus linteus*, KCCM 60261)균 5%를 접종하고 배양기 24±2°C에서 50일 동안 고상발효시켜 제조하였다. 해양 심층수 상황-오미자박 고상발효물을 121°C 1.1kg/cm²으로 30분간 멸균하였으며, 균을 모두 사멸한 고상발효물을 -40°C에서 동결건조하여 분쇄기(분쇄기 파워 3000W)로 1분간 분쇄하여 고상발효 분말을 획득하였다. 해양 심층수 상황-오미자박 고상발효 분말 100g에 증류수 900g 비율로 혼합한 후 100°C에서 2.5hr 열수 추출하여 추출한 액을 100mm 종이필터로 필터 후 여액을 다시 한번 0.45um 거른 후 -40°C에서 동결건조 후 시료로 사용하였으며, 수율은 10%를 얻었다.

2. 방법

1) 실험동물 및 분류

실험동물은 6주령 수컷 C57BL/6 마우스를 두얼바이오텍(Seoul, Korea)에서 구입하였고, 온도 22±2°C, 상대습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하면서 1주일 간 환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 적응기간 동안 물과 사료는 제한 없이 섭취하도록 하였다. 전체 실험기간은 총 3주간 실시하였으며, 적응 기간 후 무처리군(CTL), 텍사메타손 처치군(Veh, Dex), 텍사메타손+PS 추출물 처치군(PS 100, 300 mg/kg), 텍사메타손+대조군(오미자추출물 처치군, SC 300 mg/kg)으로 나누어 각 5마리씩 무작위로 분류하였다. 실험 종료 당일 마취 후, 복대 정맥에서 혈액을 채취하여 보관하였으며, 실험동물의 간 조직은 적출하여 -0°C에 보관하였다. 본 연구는 한국한의학연구원의 동물보호 및 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC, 22-059)에 승인되었으며, 한국한의학연구원 IACUC의 지침에 따라 수행되었다.

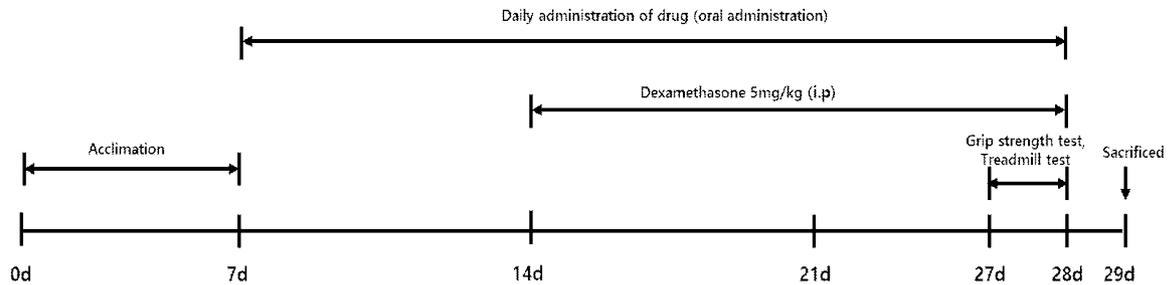


Fig. 1. Schematic diagram to illustrate the experimental design.

2) 근위축 동물모델 유도

실험동물 적응 기간 후 근위축 모델을 만들기 위해 Dex군, PS군, SC군에 매일 오전 10~11시 사이에 텍사메타손 5 mg/kg을 14일간 복강 투여를 실시하였고, Control군인 CTL군은 생리식염수를 같은 용량으로 투여하였다. 약물 투여군은 텍사메타손 투여 1주일 전부터 실험 종료일까지 100, 300 mg/kg의 복용량으로 매일 1회 경구투여하였고, control군인 CTL군과 Vehicle군인 텍사메타손 군에는 같은 용량의 생리식염수를 투여하였다. 체중은 텍사메타손 투여 전과 투여 후 3일간격으로 측정하였다. 각 대조군과 실험군은 실험이 종료되는 날 안락사 시킨 후 대퇴사두근(허벅지 근육, Quadriceps) 및 정강근(Tibialis Anterior (TA))을 적출하였다.

3) 약력 측정 (Grip strength test)

모든 실험 동물은 실험 종료 전 날 grip strength test를 시행하였다. Grip strength는 Bioseb grip strength test (BIO-GS3; BIOScience and Experimental Biology, Florida, USA)를 이용하여 그래프 단위로 측정하였다. 스테인리스 스틸 T-bar를 게이지에 부착하여 사용하였다. 실험 동물의 양측 전지로 실험 도구의 T-bar를 잡게 하고, 그림이 해제 될 때까지 꼬리를 일정한 속도(2 cm/초)로 잡아당겨 grip strength를 측정하였다. 각 동물에 대한 5개의 측정값을 얻은 후 평균 값을 계산하였다.

4) 마우스 러닝 테스트 (Treadmill test)

마우스 러닝 테스트는 treadmill machine (Panlab, Barcelona, Spain)에 의해 속도, 지속 시간, 거리를 측정하고, 소프트웨어(SeDaCom v2.0.02, Panlab, Barcelona, Spain)를 사용하여 조절하였다. 이 테스트에서 적응 보

행 속도는 10 cm/sec로 3분 동안 달리도록 설정하였고, 75 cm/sec의 최대 속도에 도달하기까지 5분마다 5 cm/sec로 증속하여 지칠 때까지 달리게 하였다. 적응 보행 속도와 달리기 속도는 모든 군에 대해 동일하게 적용하였고, 러닝머신의 각 레일 뒤에서 전기 자극(1.1 mA)을 주어 강제로 달리게 하였다. 지칠 때까지 걸리는 시간(time to exhaustion)을 비교하여 각 개체의 운동능력을 평가하였다. 지침(exhaustion)이 발생한 시점은 앞다리가 레일에 놓이고 뒷다리는 3초 동안 전기 장치에 놓여 있는 시간으로 정의하였다.

5) Hematoxylin & Eosin (H&E)

안락사 이후 적출한 대퇴사두근(Gastrocnemius) 및 정강근(Tibialis Anterior (TA)) 조직의 일부를 10% paraformaldehyde(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 고정시킨 후 파라핀에 매립하고, microtome (Thermo fisher scientific, Germany)으로 3 μm의 두께로 조직을 절단하여 H&E으로 염색하고 광학 현미경 (Nikon Eclipse 80i; Nikon, Tokyo, Japan)으로 조직 병리학적 변화를 200배 배율로 관찰하였다.

6) RNA 분리 및 Quantitative RT-PCR

근위축에 대한 변화를 확인하기 위하여 대퇴사두근에서 RNeasy® mini kit(Aiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 Spectrophotometer (Nanodrop)을 통하여 정량해, 1 μg RNA를 Maxima first strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR(Thermo scientific, Waltham, USA)를 이용하여 complementary DNA(cDNA)를 합성하였다. PCR bio syGreen blue Mix(PCR Biosystems, Pennsylvania, USA) 10 μl와 primer 2 μl가 포함된 혼합물 19 μl와 cDNA 1 μl를 polymerase chain reaction (PCR) 사이클을 40회 수행하였다. 중합 효소 반응에 쓰인 primer

의 정보는 Table 1에서 나타내었다.

Table 1. Specific primer sequences for PCR

| Target | Primer Sequences | |
|---------------|------------------|---------------------------------|
| Myogenin | Forward | 5'-AGTACATTGAGCGCCTACAG-3' |
| | Reverse | 5'-GACGTAAGGGAGTGCAGATT-3' |
| MuRF1 | Forward | 5'-TGCCTACTTGCTCCTTGTGC-3' |
| | Reverse | 5'-CACCAGCATGGAGATGCAGT-3' |
| Atrogin-1 | Forward | 5'-CACCAAACCCACAGAAAACAG-3' |
| | Reverse | 5'-GGGTCAGAGGAAGAGATAAAGTTG -3' |
| PGC1 α | Forward | 5'-ACAAACGGCTCACTTTGTCC-3' |
| | Reverse | 5'-GTGCCGGATGGAGTTCTTC-3' |
| AMPK | Forward | 5'-AGCCCTTCCTTCTCTTGCTC-3' |
| | Reverse | 5'-AGGATGCCTGAAAAGCTTGA-3' |
| GAPDH | Forward | 5'-CAGCCTCGTCCCGTAGAC A-3' |
| | Reverse | 5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3' |

7) 통계처리

모든 실험 결과는 GraphPadprism 5.0 통계 프로그램 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean \pm SD)로 계산하였으며 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA로 분석하였으며, 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 평가하였다.

III. 결과

1. 텍사메타손 유도 근위축 동물모델에서 몸무게 변화 및 운동능력에 대한 영향

상황버섯-오미자박 추출물(PS)가 근육 위축에 미치는 개선 효과를 조사하기 위하여 텍사메타손로 유도된 근육 위축 마우스에서 체중의 변화를 확인하였다. 그 결과, 그림 2에서와 같이 생리식염수만 투여한 대조군(control) 경우 주령이 증가될수록 몸무게가 증가됨을 확인할 수 있었으며, 텍사메타손을 투여한 Veh군에서는 CTL군에 비하여 주령이 증가 될수록 유의적으로 몸무게가 감소됨을 확인할 수 있었다. 한편 약물투여군인 PS군에서는 약물 농도적으로 몸무게의 증가는 보이지 않았지만, 텍사메타손로 근위축을 유도한 Veh군과 비교하였을 때, 유의적으로 몸무게가 증가함을 알 수

있었다. 몸무게의 차이 변화를 살펴보면 정상대조군인 CTL군은 3.8 \pm 0.81 g의 체중 증가량을 보인 반면, 근위축을 유도한 Veh군은 1.7 \pm 0.72g으로 체중 증가량이 유의적으로 감소함을 알 수 있었으며, PS 100 mg/kg군은 2.3 \pm 0.37g 300 mg/kg군은 2.4 \pm 0.21g으로 체중 증가량을 확인할 수 있었으며, Positive control군인 오미자 추출물(SC 300 mg/kg) 투여군에서는 2.1 \pm 0.46g의 몸무게 증가로, 모든 약물군에서 Veh군과 비교하였을 때 유의적인 증가를 확인할 수 있었다(Fig.2.B). 상황버섯-오미자박 추출물(PS)이 텍사메타손-유도 근위축 마우스 모델의 운동능력에 어떠한 영향을 미치는지 Grip test와 Treadmill test를 시행하였다. 그 결과, 약력을 나타내는 Grip test에서는 CTL군은 149.4 \pm 22.8 g의 약력을 보인 반면, 근위축이 유도된 Veh그룹에서는 110 \pm 16.5 g으로 약력이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 또한 약물군인 PS 100 mg/kg군에서는 144.8 \pm 25.4 g, 300 mg/kg군에서는 162 \pm 16.0 g으로 약물 농도가 증가함에 따라 Veh군에서 감소된 약력이 회복되는 것을 확인할 수 있었으며, 대조약물군인 SC 300 mg/kg 153.8 \pm 22.1 g으로 이 역시, 대조군인 Veh군보다 회복됨을 알 수 있었다(Fig.2.C). 한편, 운동시 지칠 때까지 걸리는 지구력 테스트인 Treadmill test에서는 평균 5분간 견도록 유도하였을 때, 정상군인 CTL군에서는

4.70±0.49 min으로 기록된 반면, 근 위축 유도 모델인 Veh군에서는 3.47±0.94 min으로 상대적으로 낮게 측정되었으며, PS 투여군은 3.85±0.8 min, 4.29±0.48

min, positive control군인 SC군에서는 3.85±0.84 min으로 기록되었으며, Veh군과 유의한 차이를 보였다 (Fig.2.D).

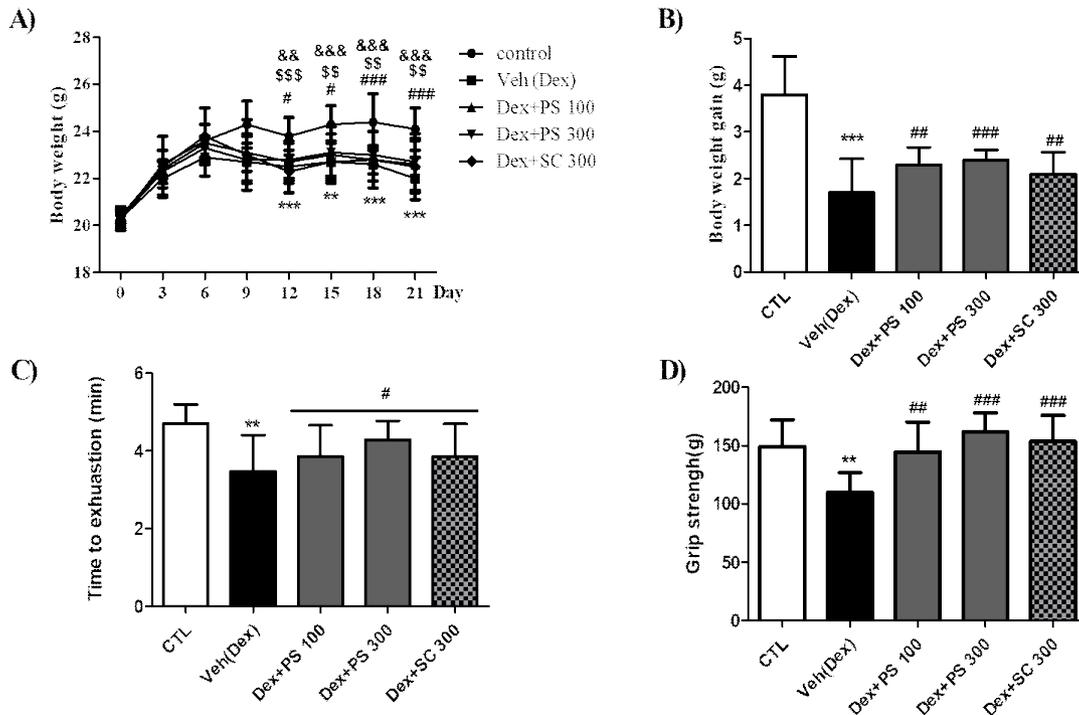


Fig. 2. Effects of PS extract on Dexmethasone-induced muscle atrophy mice. A) Body weight. B) Body weight gain. C) Treadmill test. D) Grip strength. Results represent as the mean±SD of three different preparations with quadruplicate experiments. . **p<0.01, ***p<0.001 vs. CTL ; #p<0.05 and ###p<0.001 Dex+PS100vs. Dexgroup; \$p<0.05 and \$\$\$p<0.001 Dex+PS300vs. Dexgroup. ; &&p<0.001 Dex+SC300vs. Dexgroup. And **p<0.01, ***p<0.001 vs. CTL ; #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs. Dexgroup. PS; Phellinus linteus and Schisandra chinensis extract, Sc; Schisandra chinensis Baillon.

2. 텍사메타손 유도 근위축 동물모델에서 대퇴사두근 보호에 대한 효과

근위축 동물모델에서 근육의 두께와 무게가 중요한 지표인자로 인식되고 있음에, 본 연구에서도 안락사 이후 대퇴 근육을 적출하여 무게와 두께를 확인하였다. Fig.3A는 부검 이후 대퇴 사진으로 그 크기를 가늠한 것으로서, 정상대조군인 CTL군에 비하여 텍사메타손으로 유도한 근위축 모델인 Veh군에서 대퇴 근육의 크기

가 감소한 것을 알 수 있었으며, 대퇴근육의 두께와 무게를 비교하였을 때 두께의 경우 약물투여군인 PS군에서 약물 농도의존적으로 근육의 두께의 증가는 보였지만, 무게에서는 농도의존적으로 무게의 증가를 확인 할 수 없었다. 하지만, Veh군과 비교하였을 때, PS추출물 군과 약물 비교 대조군인 SC군에서 대퇴근육의 두께와 무게가 증가됨을 알 수 있었다(Fig.3).

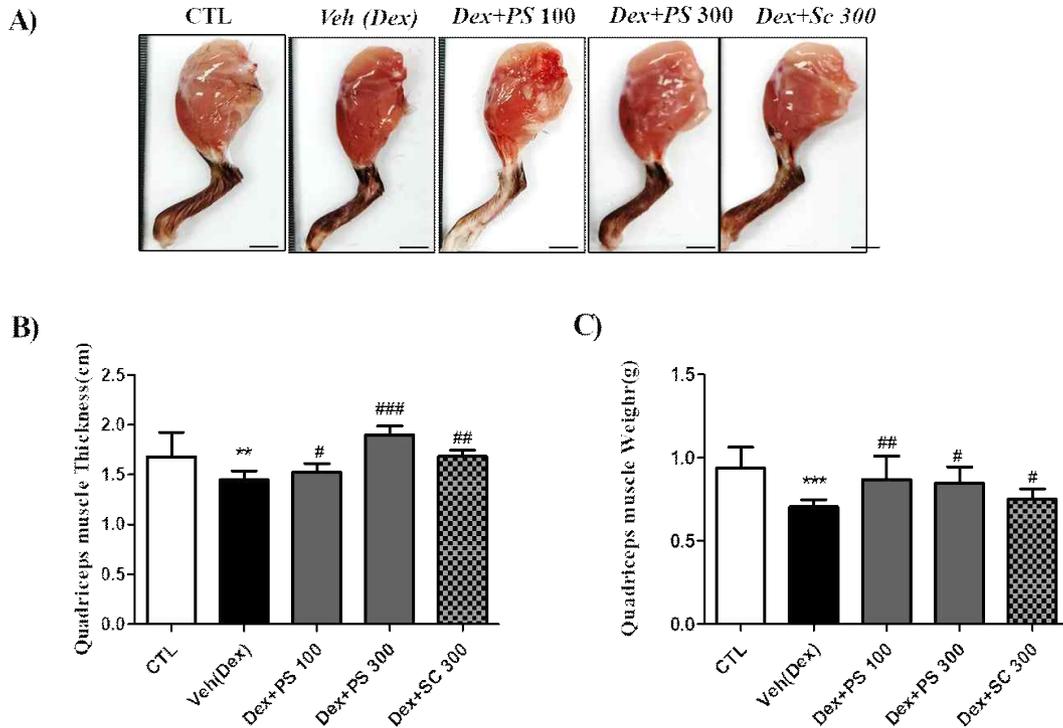


Fig. 3. Effects of PS extract on Dexamethasone-induced muscle loss and weight in muscle atrophy mice. A) The photo of Quadriceps muscle. B) Quadriceps muscle Thickness(cm). C) Quadriceps muscle weights. Results represent as the mean±SD of three different preparations with quadruplicate experiments. **p<0.01, ***p<0.001 vs. CTL ; *p<0.05, #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs. Dex group. PS; *Phellinus linteus* and *Schisandra chinensis* extract, Sc; *Schisandra chinensis* Baillon.

3. 텍사메타손 유도 근위축 동물모델에서 근육의 형태학적 변화에 대한 보호에 대한 효과

근위축 동물모델에서 골격근육 위축의 중요한 변화는 근육섬유(근섬유, myofiber)의 크기와 수의 감소를 특징으로 한다. 본 연구에서도 텍사메타손으로 유도된 근위축 동물모델에서 Gastrocnemius, Tibialis anterior 조직을 H&E 염색하여 근섬유의 형태 변화의 조직학적인 특징을 비교하였다. 정상 대조군인 CTL군은 정상적인

근육의 형태가 관찰된 것에 비하여 텍사메타손군에서 전체적으로 근섬유의 구조가 불규칙하게 변형되어있으며, 근 섬유도 위축되어 근섬유의 굵기가 감소되었으며, 다양한 크기의 핵 및 증가된 핵 수가 관찰 되었다. 이에 비하여, PS 투여군에서는 용량 의존적으로 근근섬유의 구조가 정상적인 배열을 보였으며, 근 섬유의 굵기 역시 증가됨을 확인 할 수있었다(Fig. 3C).

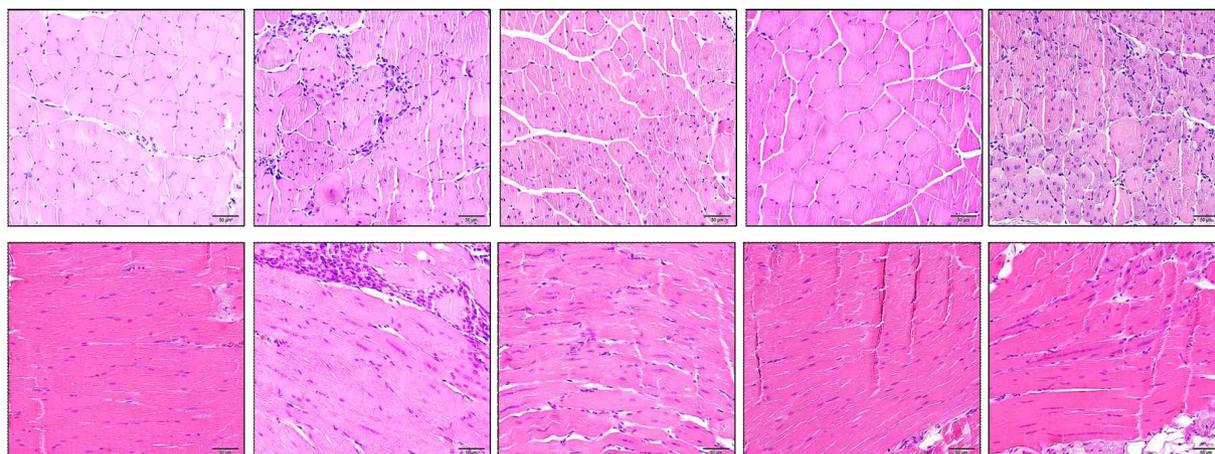


Fig. 4. Effects of PS extract on Haematoxylin-Eosin stain of quadriceps muscles in muscle atrophy mice. Treated dexamethasone-induced atrophy mice from PS 100 mg/kg and 300 mg/kg had altered muscle pathology with an increase in morphologically normal fibers and fewer regenerating fibers, cross sectional fiber areas (Gastrocnemius, upper panel) and longitudinal sectional fiber areas in mice (Tibialis Anterior, lower panel). 200X H&E. PS; *Phellinus linteus* and *Schisandra chinensis* extract, Sc; *Schizandra chinensis* Baillon.

4. 근육 분해/생성에 관련된 mRNA 발현에 대한 효과
 텍사메타손으로 인위적인 근위축 동물모델을 유도한 후 PS추출물이 근육세포 생성(Myogenin) 및 단백질 분해 인자(Atrogin-1, MuRF1) 및 에너지 대사 조절 경로(AMPK, PGC1 α)에 어떠한 영향을 미쳤는지 확인하기 위해 근육조직에서 mRNA를 분리하여 그 발현을 살펴보았다. 근육세포 생성에 관여하는 전사인자인 Myogenin의 경우, 정상 대조군인 CTL군과 근위축 유도군인 Veh군과 비교하였을 때, 약 50%정도 감소하는 경향을 보였으며, PS 추출물을 처리하였을 때, 농도 의

존적으로 발현양이 증가됨을 알 수 있었다. 또한, 근육 세포 단백질 분해에 관여하는 인자인 Atrogin-1, MuRF1의 경우 Veh군에서는 발현양이 증가됨을 확인할 수 있었으며, PS 추출물 처리시, 대부분의 농도에서 mRNA 발현량이 농도 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5B). 이와 관련하여 PS 추출물이 근 위축에 효과가 있을 것이라 판단되어, pAMPK 및 PGC1 α 의 발현양을 살펴 본 결과, PS 추출물 투여군에서 발현 양이 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig.4).

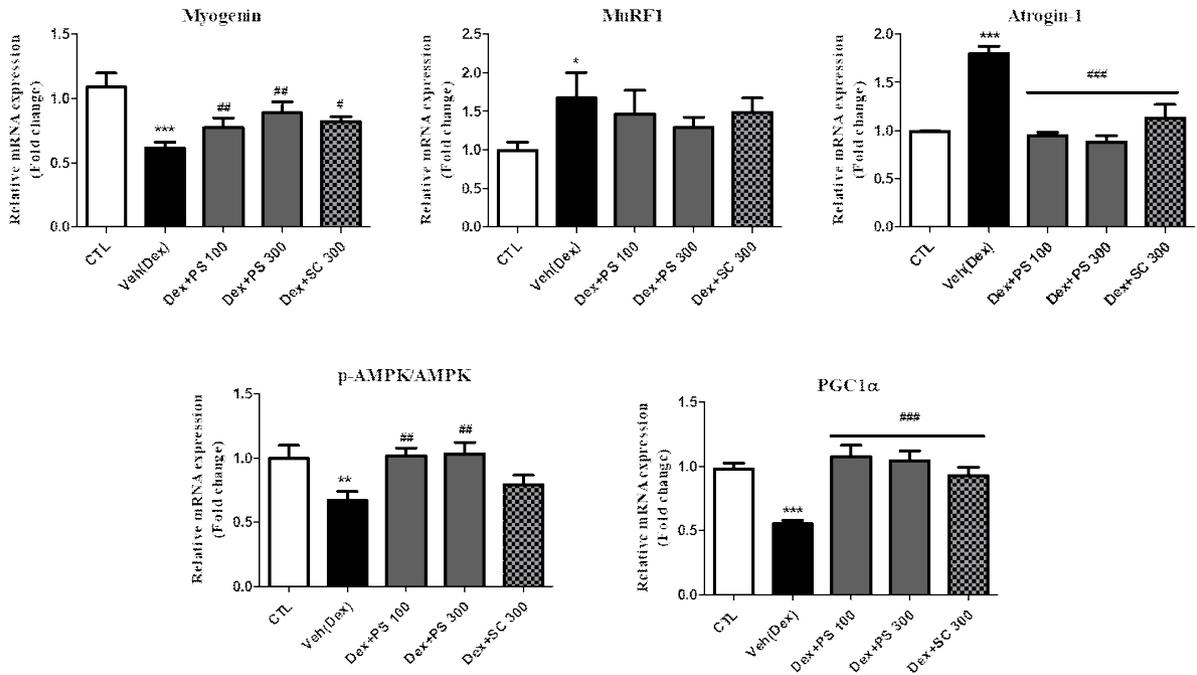


Fig. 5. Effect of PS extract on mRNA expression in muscle atrophy mic. The expression of mRNA in quadriceps muscles was analyzed by qPCR. GAPDH was used as a control. Results represent as the mean±SD of three different preparations with quadruplicate experiments. **p<0.01, ***p<0.001 vs. CTL ; *p<0.05, #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs. Dex group. PS; *Phellinus linteus* and *Schisandra chinensis* extract, Sc; *Schisandra chinensis* Baillon.

IV. 고찰

근위축 질환은 최근 노인성 인구 증가와 관련이 있는 사회적 질환으로, 노인 인구에서 근육의 사용량이 줄어드는 것, 유전적 요인, 질병 및 노화 등의 요인으로 의하여 근육 단백질이 과도하게 분해되는 병리학적 상태를 말한다¹²⁾. 근육 위축은 근육량의 손실과 더불어 쇠약, 피로로 인하여 악화되며, 합병증을 유발한다. 또한 이 질환은 삶의 질과 사망을 및 만성 질환으로 병리학 적 이환율의 증가에 영향을 미치는 요인이다¹³⁾. 따라서 전 세계적으로 많은 연구자들이 최신 주목받고 있는 근 위축증에 대한 약물 치료를 비롯한 전문적인 치료제 개발을 하고 있는 상황이다. 하지만, 지난 수십년 동안 많은 연구자들이 근육 위축의 분자 메커니즘을 연구하였지만, 효과적인 약물이나 치료제개발을 아직까지 이루어지지 않고있으며, 이 질환의 현재 주요 치료법으로는, 운동처방, 보조적인 약물치료, 영양 보충제, 물리치료

등이 있다¹⁴⁾. 하지만 이러한 주된 치료법 중 운동 처방의 경우에는 고령자, 병상에 누워있는 환자 및 급성 질환이 있는 환자에게는 매우 제한적이며, 또한 많은 영양소가 근육 소모에 효과적이라고 밝혀져 있지만, 여전히 일차 근육 소모가 있는 환자에게 국한되는 상황이다. 최근 근육 위축을 치료하기 위해 여러 약물이 연구되고 있는 상황이나, 임상적으로 승인 된 치료제는 아직까지 없는 상황으로 부작용이 적고, 효과적인 근위축증 치료제나 보조제를 개발하는 것은 매우 중요한 문제이다.

한의학에서는 근위축에 대한 증상을 위증(痿證)으로 보고있으며, 이 위증은 사지 근력이 약해져 활동에 제약이 되는 병증을 말하는 것으로, 처음에는 사지 또는 하지가 늘어지고 약해지며, 물건을 들거나 걸을 수 없게 되는 증상을 일컫는다. 위증으로 인하여 발생하는 증강 중 가장 흔한 증상이 하지무력이며, 한의학에서는 이러한 증상에 대하여 좋지않은 영양상태, 나쁜 기운, 오래된 병 등으로 인하여 체내 잔액이 말라 사지까지

영양을 공급하지 못하여 발생하는 것으로 보고 있다⁷⁾. 특히 이러한 근육 위축이 주로 간이나 신장 및 비장의 약화로 인하여 발생한다고 보고 있으며, 따라서 근위축증의 치료는 비장과 신장의 회복/강화를 기본으로 한다¹⁵⁾.

텍사메타손은 근위축을 유발하는 약물로 이미 많이 알려져 있으며, 텍사메타손 처리된 마우스는 근육량 감소와 함께 체중이 감소하여 근육 기능에 영향을 미치는 것으로 보고되었습니다. 이는 Fast-twitch glycolytic muscle fibers의 신경과 근육의 스냅스의 변화를 일으켜서 근원 섬유의 조직에 대하여 근위축이라는 병변을 일으키는 것으로 알려져 있다. 특히, 신경절단(Denervation), 고정화(Immobilization), Disuse으로 유도되는 근위축 동물모델과는 다르게 sarcopenia와 동일한 type II의 근육 섬유를 변형시켜, 근섬유 감소화를 일으켜 Myosin Heavy Chain(MyHC) transition을 유발하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 이러한 근위축에 대한 치료제의 연구는 이미 많이 진행되고 있으며, 대부분 부작용이 적은 약용 식물을 비롯한 식물에서 그 연구가 진행되고 있다. 최근, Valeriana fauriei¹⁶⁾, Quercetin glycosides¹⁷⁾와 같은 약용식물이 근위축 예방 및 치료에 적용될 수 있다는 연구가 진행되어 보고되었으며, Valeriana fauriei는 항산화 특성에 의해 텍사메타손 유발 근육 위축으로부터 보호하는 것으로 보고되었었다. 또한 Quercetin 배당체는 미오스타틴 신호 전달 경로의 하향 조절과 Akt 신호 전달 경로의 활성화를 통해 근육 위축을 개선하는 것으로 보고되었었다. 하지만 이전 연구에서는 근육에서 포도당 흡수 과정에서 중요한 역할을 하는 PI3K/AKT 및 AMPK 경로와 같은 특정 메커니즘을 보고하지는 않았다. 이에 본 연구에서는 상화버섯-오미자박 열수 추출물 (PS)에 대하여 텍사메타손으로 유도된 근위축 마우스에서 근위축에 대한 개선 효과와 작용 기전을 조사했습니다.

텍사메타손에서 이미 보고된 바와 같이 우리의 연구 결과에서도 근육량의 감소와 더불어 체중이 감소하는 현상이 관찰되었으며, 이는 근육 위축 모델이 성공적으로 확립되었음을 알 수 있었다. 또한, 본 연구에서 근위축증 마우스에 100 및 300 mg/kg의 PS 추출물을 3주간 투여하여 근육량 및 악력의 손실을 예방하는 것을 확인하였으며, 이러한 결과로부터 PS가 근위축증의 증상 개선에 효과적임을 확인하였다.

myogenesis의 조절자로서 myogenin은 근섬유의 발달 동안 myoblasts의 myotubes로의 분화를 촉진하며¹⁸⁾, 또

한 MyHC는 근육 성숙도의 표지자로서, 발현이 증가되면, 근육 세포 융합에 의한 근모세포의 분화를 유도한다¹⁹⁾. 본 연구에서, 텍사메타손으로 유도된 근위축 마우스에서 근 섬유 면적과 직경의 감소가 관찰되었으며, 근육 조직의 구조적 손상 역시 관찰되었습니다. 또한 PS 추출물의 저용량 및 고용량 투여군에서는 조직병리학적인 변화를 포함하여 구조적 손상에 대하여 개선되는 것을 확인할 수 있었습니다.

체세포 분열이 끝난 이후, 근육 조직은 단백질의 합성과 분해, 근세포의 사멸과 분화, 염증 등의 관련 기전에 의하여 근육량 감소로 근위축증이 일어나게 된다. 근위축증에서 공통적으로 나타나는 세포 신호 전달 기전은 매우 복잡하게 연결되어 있으며, 단백질 분해의 대부분은 Ubiquitin (Ub)이 단백질에 붙게 되고 proteasome에 의해 이루어진다. 하지만, 이러한 단백질 분해가 무조건 악영향은 미친다고는 판단하기 어려운 이유는 근육을 유지하고 움직이는데 필요한 일련의 과정이다²⁶⁾. 근육 특이적 E3 유비퀴틴 리가제인(Ubiquitin E3 ligases) 근육 위축 F-Box (MAFbx, Atrogin-1)와 근육 RING Finger-1(MuRF1)은 유비퀴틴-프로테아좀 경로(UPP)에 속하는데, 근육의 단백질 분해에 주요 관여하고 있다²¹⁾. 텍사메타손은 FoxO 발현의 자극으로 PI3K/Akt의 IRS1 관련 활성화를 유도하여 근육 위축 모델에서 Ubiquitin E3 ligases Atrogin-1/MAFbx의 전사를 유도하는 것으로 보고되었습니다²²⁾. PI3K(phosphatidyl inositol-3-kinase)-PDK1-Akt의 신호전달을 활성화시키며, 신호전달 체계에서 중요한 허브 중 하나인 Akt는 FOXO를 억제시켜 단백질 분해를 막고, mTOR (mammalian target of rapamycin)와 GSK3b (glycogen synthase kinase 3b)를 통해 단백질 합성을 활성화시킨다. PI3K 신호 전달 경로의 주요 하류 분자인 Akt의 활성화는 세포 주기, 성장, 증식 및 에너지 대사의 조절을 매개하며, Akt는 GTP와 결합하여 RheB를 활성화시키며, 이는 mTORC1을 활성화를 유도한다. 이렇게 유도된 mTORC1은 p70S6K를 인산화시켜 결과적으로는 리보솜 단백질 S6를 통해 단백질을 합성하게 한다. 이때, 전사인자인 FOXO는 근육 단백질을 특이적으로 분해하는 Ubiquitin ligase인 Atrogin-1 와 MuRF1을 활성화시킨다²³⁾. 또한, AMP 활성 단백질 키나아제(AMPK)는 세포 및 전신 에너지 균형을 조절하는 세포 에너지 상태의 핵심 센서로서, 더 많은 ATP를 생성하기 위해 이화작용 경로를 촉진합니다²⁴⁾. 이와 관련하여, 본 연구에서는 근육



세포 생성 전사인자인 Myogenin과 근육 단백질 분해인자인 MuRF1, Atrogin-1, 에너지 대사 조절 관련 경로인 AMPK, PGC1 α 에 대하여 발현양을 조사한 결과, 텍사메타손으로 유도된 근육 위축 마우스에서 PS 추출물에 의해 MuRF1 및 Atrogin1의 발현을 억제시켰으며, Myogenin의 발현양은 증가되었다. 또한, 에너지 조절인자의 경우 그 활성이 증가됨을 확인하여, PS 추출물은 근육 위축을 개선할 수 있습니다.

이상의 결과들로 종합적으로 살펴볼 때 PS 추출물은 텍사메타손으로 유도된 근위축 동물모델에서 AMPK 및 PGC1 α 신호 전달 경로 조절에 대하여 PS 추출물의 조절 효과는 MuRF1 및 위축 발현을 억제하여, 근위축에 도움이 될 수 있는 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 텍사메타손으로 유도된 근 위축 동물 모델에서 상황버섯-오미자박 열수 추출물에 대하여 근육 세포의 단백질 생성 및 분해에 관여함은 물론 근 위축에 대한 근육 무게 감소를 억제함으로써 근 위축에 대하여 그 효능을 가진다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 전임상적인 결과이며, 추후 인체적용시험을 통하여 인체에 대한 유효성의 입증에 필요할 것으로 판단된다. 하지만, 유효소재의 리사이클링 측면으로 살펴볼 때, 오미자박에 대한 리사이클링 산업 소재로서의 개발 가능성을 확인한 것으로, 소재의 다변화에 대하여 그 가능성을 제시할 수 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원의 야생생물 유래 친환경 신소재 및 공정기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다. (RE202101318, 한국한의학연구원 ERTERT2112080).

References

1. Dimon T., "Anatomy of the moving body: a basic course in bones, muscles, and joints", North Atlantic Books, 2001.
2. Seldin, Marcus M., et al., "Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic

- lipid homeostasis", Journal of Biological Chemistry, Vol. 287(15), 2012.
3. Rooyackers O E, Nair K S., "Hormonal regulation of human muscle protein metabolism", Annual review of nutrition, Vol. 17, 1997.
4. Melby J C., "Clinical pharmacology of systemic corticosteroids", Annual review of pharmacology and toxicology, Vol. 17(1), 1977.
5. Weinstein S P, Paquin T, Pritsker A, et al., "Glucocorticoid-induced insulin resistance: dexamethasone inhibits the activation of glucose transport in rat skeletal muscle by both insulin- and non-insulin-related stimuli", Diabetes, Vol. 44(4), 1995.
6. Kim H, Jang M, Park R, et al., "Conessine treatment reduces dexamethasone-induced muscle atrophy by regulating MuRF1 and atrogin-1 expression", Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 28(4), 2018.
7. Habukuihakwon. youngchu-kyungkyosuk. Beijing: Inminwisheng publisher; 1982:161,24
8. Liu H B., "Literature research on clinical treatment of Withering disease", China Academic Journal Electronic Publishing House, 2011.
9. Yin L, Li N, Jia W, et al., "Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments", Pharmacological Research, Vol. 172, 2021.
10. Quittan M., "Aspects of physical medicine and rehabilitation in the treatment of deconditioned patients in the acute care setting: the role of skeletal muscle", Wiener Medizinische Wochenschrift, Vol. 166(1), 2016.
11. YS Kim, SJ Hwang, KI Park, Jet al., Protective Effect of water extract *Phellinus linteus*-discard *Schisandra chinensis* solid fermented extracts on improvement of sarcopenia by Atorvastatin-induced muscle atrophy cell model. Herbal Formula Science. 2021;29(4):239-252.
12. Fried LP, Xue QL, Cappola AR, Ferrucci L, Chaves P, Varadhan R, et al. Nonlinear multisystem physiological dysregulation associated with frailty in older women: implications for etiology and treatment. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2009;64:1049-1057.

13. Cebron Lipovec N, Schols AMWJ, van den Borst B, Beijers RJHCG, Kosten T, Omersa D, Lainscak M. Sarcopenia in advanced COPD affects cardiometabolic risk reduction by shortterm high-intensity pulmonary rehabilitation. *J Am Med Dir Assoc.* 2016;17(9):814-820
14. Park SH, Park JH, Song PS, Kim DK, Kim KH, Seol SH, Kim HK, Jang HJ, Lee JG, Park HY, Park JS, Shin KJ, Kim DI, Moon YS. Sarcopenic obesity as an independent risk factor of hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2013;7(6):420-425
15. China Traditional Chinese Medicine Press. *Chinese Internal Medicine*, 2007.
16. Kim Y I, Lee H, Nirmala F S, et al., "Antioxidant Activity of Valeriana fauriei Protects against Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2022, 2022.
17. Otsuka Y, Egawa K, Kanzaki N, et al., "Quercetin glycosides prevent dexamethasone-induced muscle atrophy in mice", *Biochemistry and biophysics reports*, Vol. 18, 2019.
18. Zammit P S., "Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis[C]//Seminars in cell & developmental biology", Academic Press, Vol. 72, 2017.
19. Bandman E., "Functional properties of myosin isoforms in avian muscle", *Poultry science*, Vol. 78(5), 1999.
20. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14440-14445.
21. Foletta V C, White L J, Larsen A E, et al., "The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy", *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, Vol. 461(3), 2011.
22. Zheng B, Ohkawa S, Li H, et al., "FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogin-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy", *The FASEB Journal*, Vol. 24(8), 2010.
23. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704-1708.
24. Thomson D M., "The role of AMPK in the regulation of skeletal muscle size, hypertrophy, and regeneration", *International journal of molecular sciences*, Vol. 19(10), 2018.