

## 續斷이 중풍모델 흰쥐 비복근의 근섬유위축 및 MyoD 발현에 미치는 영향

한상우<sup>2#</sup>, 류사현<sup>2</sup>, 심은섭<sup>1</sup>, 이동은<sup>2</sup>, 박민희<sup>2</sup>, 김범희<sup>1</sup>, 최현<sup>4</sup>, 정혁상<sup>1</sup>, 손낙원<sup>2</sup>, 손영주<sup>3\*</sup>

1: 경희대학교 한의과대학 해부학교실, 한의학연구소, 2: 경희대학교 동서의학대학원 신경과학 및 뇌질환전공, 3: 상지대학교 한의과대학 부인과학교실, 4: (주)함소아제약 연구개발센터

### Effects of *Dipsaci Radix* on Muscle Fiber Atrophy and MyoD Expression in Gastrocnemius of MCAO Rats

Sang-Woo Han<sup>2#</sup>, Sa-Hyun Ryu<sup>2</sup>, Eun-Sheb Shim<sup>1</sup>, Dong Eun Lee<sup>2</sup>, Min Hee Park<sup>2</sup>, Bum Hoi Kim<sup>1</sup>, Hyun Choi<sup>4</sup>, Hyuk-Sang Jung<sup>1</sup>, Nak-Won Sohn<sup>2</sup>, Youngjoo Sohn<sup>3\*</sup>

1: Department of Anatomy & Institute, Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, 2: Department of Neuroscience and Brain Disease, Graduate School of East-West Medicine, Kyung Hee University, 3: Department of Gynecology, College of Oriental Medicine, Sangji University  
4: Hamsa Pharmaceutical Co. R&D Center

#### ABSTRACT

**Objectives** : The present study has been undertaken to investigate the effects of *Dipsaci Radix* on Muscle Fiber Atrophy and MyoD Expression in Gastrocnemius of MCAO Rats

**Methods** : In order to investigate effects of *Dipsaci radix* on the skeletal muscle atrophy following stroke, cerebral infarct was induced by the middle cerebral artery occlusion (MCAO) in the rats. Water extract of *Dipsaci radix* (184.4 mg/100 g) was treated for 4 weeks, once a day orally, after the MCAO. Effects were evaluated with muscle fiber type composition and cross-sectioned area of muscle fibers in gastrocnemius of the unaffected & affected hind limbs. And MyoD protein expression in gastrocnemius was demonstrated with immunohistochemistry and western blotting.

**Results** : Obtained results were as follows; 1. Infarct volume was not attenuated by *Dipsaci radix* treatment in the MCAO rats. 2. At the affected-side hind limb of the MCAO rats, the increase of type-I fibers and the decrease of type-II fibers were induced by *Dipsaci radix* treatment. 3. At the affected-side hind limb of the MCAO rats, decreases of cross-sectioned areas of type-I and type-II fibers were attenuated by *Dipsaci radix* treatment. 4. At the affected-side hind limb of the MCAO rats, MyoD positive cells were increased by *Dipsaci radix* treatment. 5. At the affected-side hind limb of the MCAO rats, MyoD expressions were increased by *Dipsaci radix* treatment.

**Conclusions** : These results suggest that *Dipsaci radix* has a protective effect against muscle atrophy, through the inhibition of the muscle cell apoptosis, following the central nervous system damage.

\* 교신저자 : 손영주, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교 한의과대학 부인과학교실

· Tel : 033-741-9303 · E-mail : q701@chollian.net

# 제1저자 : 한상우, 경희대학교 동서의학대학원 신경과학교실

· Tel : 031-204-6832 · E-mail : rupophobia@freechal.com

· 접수 : 2008년 5월 19일 · 수정 : 2008년 6월 11일 · 채택 : 2008년 6월 20일

**Key words :** MCAO, *Dipsaci radix*, muscle atrophy, MyoD

## 서 론

續斷(*Dipsaci Radix*)은 强壯筋骨의 要藥으로 補肝腎, 續筋骨, 活血, 止血, 安胎, 鎮痛의 效능이 있어 血脈을 通하게 하여 筋骨을 이어주므로 關節不利와 筋骨折傷 등에 사용된다<sup>1)</sup>. 續斷의 效능에 대한 연구보고에 의하면 골다공증 방지<sup>2)</sup>, 장골 길이 성장<sup>3)</sup>, 골모세포의 분화와 증식 촉진<sup>4)</sup> 등의 效능이 있다고 보고하여 强壯筋骨의 效능을 실험적으로 입증하고 있다. 또한 續斷의 유효성분이 항암효능<sup>5)</sup>, 항산화 효능과 신경세포손상 보호효능<sup>6)</sup>, 베타 아밀로이드 과발현과 인지기능 장애 억제<sup>7)</sup> 및 뇌허혈 손상에 대한 보호효능<sup>8)</sup>이 있는 것으로 보고되어 있다. 그러나 근육위축에 대한 續斷의 效능을 실험적으로 연구한 보고는 찾아보기 어려웠다.

신경계 활동의 변화는 골격근의 구조적, 기능적 특성의 변화를 일으킨다. 골격근에 대한 신경계 활동의 증가는 근육의 비대를 유도하고<sup>9)</sup>, 신경계 활동의 부재는 근육위축을 유발한다<sup>10)</sup>. 골격근에 대한 탈신경 지배(denervation)는 근섬유 굵기 감소, 근섬유형 조성 변화, 근섬유 수축력 감소, 근육피로 저항력 감소 및 근육단백질 감소 등을 특징으로 하는 근육위축을 유발시킨다<sup>11,12)</sup>.

최근에는 근육세포와 같은 다핵세포에서도 세포자연사(apoptosis) 기전이 근육위축에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다<sup>13)</sup>. 만성적인 심부전<sup>14)</sup>, 운동신경세포의 탈신경지배<sup>15)</sup>에 의한 근육의 불용<sup>16)</sup> 등의 경우 근육세포의 자연사가 증가하고, 반대로 조절된 근육 훈련은 근육세포의 자연사를 억제한다<sup>17)</sup>고 하였다. 또한 근육세포의 생성, 분화 및 성장 조절인자 중 하나인 MyoD가 탈신경지배에 의한 근육세포의 자연사를 방지하고 근육세포 생성을 촉진하여 근육위축을 억제하는 기전에 관여한다고 보고되어 있다<sup>18)</sup>.

이에 저자는 續斷의 强壯筋骨하는 작용이 근육위축에 미치는 效능을 실험적으로 관찰해보고자 하였다. 근육위축은 한방에서 높은 빈도를 차지하는 중풍과의 연관성을 고려하여 중대뇌동맥을 폐쇄하여 유발하였다. 이를 위해 흰쥐에 중대뇌동맥 폐쇄 방법의 뇌경색 유발에 의하여 근육위축을 유발하고, 이후 4주간 續斷 물추출 엑기스를 경구투여한 다음 하지 비복근(*Gastrocnemius*)에서 근섬유 위축 및 MyoD

단백질 발현의 변화를 관찰한바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 10주령(250~260g)의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 (21~23℃), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

### 2. 약물의 조제 및 투여

본 실험에 사용한 약물은 續斷(*Dipsaci Radix*)으로, 약물의 조제는 일반적인 물추출 엑기스 제조방법에 의하여 300 g을 3,000 ml의 물과 함께 냉각기가 장착된 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축 후 동결건조하여 83.0 g을 얻어 수율은 27.7%이었다. 실험동물의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100g당 체중비례 계산량의 10배로 184.4 mg을 1회 투여량으로 하였다. 약물의 투여는 각각의 1회 투여량을 2 ml의 음용수에 녹여 1일 1회, 4주간 경구투여 하였다.

### 3. 실험군의 구분

續斷이 뇌경색에 의한 비복근(*gastrocnemius*)의 근육위축에 미치는 효과를 관찰하기 위하여, 뇌경색 유발을 위한 수술 준비과정은 시행하였으나 중대뇌동맥(*middle cerebral artery*, MCA)은 폐쇄하지 않은 정상대조군(Sham), 중대뇌동맥 폐쇄(MCAO)에 의하여 뇌경색을 유발시킨 대조군(Control) 및 중대뇌동맥을 폐쇄하여 뇌경색을 유발시킨 후 續斷 물추출 엑기스를 경구투여한 續斷투여군(Sample)으로 나누었다. 각 군 당 실험동물은 6마리씩 배정하였다.

### 4. 뇌경색의 유발

뇌경색은 총경동맥으로 나일론 수술실을 삽입하여

중대뇌동맥의 기시부를 폐쇄하는 방법을 사용하였다. 마취는 70% N<sub>2</sub>O와 30% O<sub>2</sub>의 혼합가스에 5% isoflurane으로 마취를 시작하여 수술 도중에는 1.5~2%의 농도로 마취를 유지하였다. 체온은 feedback-regulated heating pad로 수술 전과정 동안 37.0±0.5℃로 조절하였다. 전경부의 피부를 절개하고 총경동맥과 외경동맥 및 내경동맥의 분지 부위를 찾아 주위 조직을 잘 정리하였다. 외경동맥에 나일론 수술실을 삽입할 수 있도록 입구를 만들고 절단한 다음, 총경동맥의 혈류를 일시적으로 차단한 상태에서, 약 4 cm 길이의 나일론 수술실(4-0 monofilament, Ethicon, Edinburgh, Scotland)을 내경동맥을 통하여 약 20 mm 까지 천천히 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부가 폐쇄되도록 하였다. 나일론 수술실의 삽입부 끝은 약 0.3 mm 크기로 둥글게 만들었으며, 실험 당일에 0.1% poly-L-lysine으로 코팅하여 사용하였다. 삽입된 나일론 수술실은 혈관과 함께 고정하고, 한쪽 끝은 피부 봉합부위 외부로 약간 노출되도록 한 상태로 전경부의 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다. 혈류의 재개통을 위하여, 폐쇄 2시간 후에 다시 마취한 상태에서 피부 봉합부위 밖으로 노출된 나일론 수술실을 조심스럽게 당겨내어 혈류를 재개통시키고 곧바로 마취에서 깨어나게 하였다<sup>19)</sup>.

### 5. 뇌경색 체적의 측정

뇌경색 유발과 약물투여 4주 후 실험동물을 pentobarbital sodium으로 깊게 마취한 상태에서 단두하여 희생시키고, 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 흰쥐용 brain matrix(ASI, USA)를 사용하여 2 mm 두께의 뇌조직 절편으로 만들었다. 뇌조직 절편을 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC)로 염색하고<sup>20)</sup>, digital camera로 촬영한 다음 'NIH Image J' software를 사용하여 각 절편으로부터 뇌경색 면적을 측정하여 체적을 계산하였다.

### 6. 근육조직의 채취

뇌경색 유발과 약물투여 4주 후 실험동물을 pentobarbital sodium으로 깊게 마취한 상태에서 단두하여 희생시키고, 뇌경색을 유발시킨 대뇌반구의 동측(unaffected side, UnAf) 및 반대측(affected side, Af) 후지로부터 비복근(gastrocnemius muscle)을 채취하여 -50℃의 dry ice-isophentan 용액으로 동결시키고 -80℃에 보관하였다. 근육조직의 일부분은 western blotting 용으로, 일부분은 cryocut을 사용하여 20µm 두께의 횡

단절편을 만들어서 면역조직화학염색에 사용하였다.

### 7. 근섬유형의 구분

근육조직 절편을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10-15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain)과 bovine serum albumin (Sigma)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 myosin heavy chain-I (MHC-I, anti-mouse monoclonal, 1:20, Novocastra, UK)를 사용하였다. 이후 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4℃에서 overnight으로 반응시킨 다음 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immuno-peroxidase의 방법(ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O(Sigma, USA)를 섞은 diaminobenzidine tetrachloride (Sigma, USA)에서 5분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다. MHC-I antibody에 반응하여 검은색으로 염색된 근섬유는 type-I로, 반응하지 않고 흰색으로 남아있는 근섬유는 type-II로 구분하였다<sup>21)</sup>. 근육조직의 염색 및 관찰은 근육의 중앙부위를 기준으로 하였다.

### 8. 근섬유형별 비율 및 단면적 굵기의 측정

염색된 근육조직을 CCD 카메라가 부착된 광학현미경 하에서 200배율로 사진 촬영하여 컴퓨터에 저장하고, 'NIH Image J' software를 사용하여 사진의 동일한 면적(137,600 µm<sup>2</sup>)에서 type-I 근섬유와 type-II 근섬유를 계수하여 type-I/type-II의 비율을 계산하였다. 단면적의 굵기는 각각 근섬유의 경계를 세밀하게 그린 다음 'NIH Image J' software를 사용하여 면적을 측정하였다.

### 9. MyoD 발현의 면역조직화학염색

MyoD의 면역조직화학염색은 MHC-I의 면역조직화학염색과 동일한 방법으로 하였으며, primary antibody는 MyoD(M-318, sc-760, anti-rabbit polyclonal, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 사용하였다<sup>22)</sup>.

### 10. MyoD 단백질의 western blotting

냉동 근육조직(시료 당 100 mg)을 액화질소 분쇄

법을 이용하여 분말형태로 만든 후, 냉장 용해 완충액(3  $\mu$ l/mg)을 사용하여 균질화하고, 20분씩(15,000 g, 4 $^{\circ}$ C) 두 번 원심분리한 후, 상청액만을 단백질 분석 시료로 사용하였다. 단백질 분석에 사용한 질량은 상청액 중 각각 20  $\mu$ g을 사용하였다. SDS-PAGE 10% 중합체를 사용하여 단백질을 전기영동하여 분리한 후, PVDF 막으로 분리된 단백질을 전이하고, 단백질이 전이된 PVDF 막을 5% 탈지분유 용액을 이용하여 blocking한 후, MyoD에 대한 primary antibody(M-318, sc-760, anti-rabbit polyclonal, 1:400, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 사용하여 1시간 동안 상온에서 배양하였다. 이후 0.5% TBS-T 용액으로 10분씩 3번 교반하여, 남아있는 잔여항체들을 제거하고, HRP가 표지된 anti-rabbit antibody를 사용 (1 : 3,500)하여 1차 항체에 반응하도록 1시간 동안 상온에서 배양한 후, 0.5% TBS-T 용액으로 10분씩 3번 교반하여, 남아있는 잔여항체들을 제거한다. 화학발광 용액을 사용하여 반응한 후, 각 시료의 발현정도를 감광막에 정착하여 분석하였다<sup>33)</sup>. 발현의 정량은 필름을 scan하여 컴퓨터에 저장하고, 'NIH Image J' software를 사용하여 optical density를 측정하여 정상대조군에 대한 상대비율을 계산하였다.

11. 통계처리

실험결과는 통계 프로그램 SPSS® for windows (version 10.0, SPSS, Inc., Chicago, USA)를 사용하여 oneway ANOVA를 실시하였으며, 유의수준 P value<0.05인 경우 유의성이 있다고 평가하였고 post hoc test로서 Scheffe's test를 시행하였다.

결 과

1. 뇌경색 체적의 변화

뇌경색 체적을 측정한 바 sham군은 뇌경색이 유발되지 않았고, control군은 482.6 $\pm$ 41.5 mm<sup>3</sup>이었으며, sample군은 445.7 $\pm$ 38.8 mm<sup>3</sup>으로 control군에 비하여 통계학적 차이가 없었다(Table 1).

2. 근섬유형 비율의 변화

비복근에서 type-I과 type-II 근섬유 비율의 변화를 측정한바, 뇌경색이 유발된 대뇌반구와 동측(unaffected side)의 하지에서 sham군은 type-I이 32.5 $\pm$ 1.9%, type-II

Table 1. Effect of Dipsaci Radix on Infarct Volume at 4 Weeks After MCAO Rats

Groups	Infarct Volume (mm <sup>3</sup> )
Sham	0
Control	482.6 $\pm$ 41.5
Sample	445.7 $\pm$ 38.8

Sham: sham operated group of the MCAO.  
Control: infarct group with the MCAO.  
Sample: treated group with water-extract of Dipsaci radix after the MCAO.  
Data presented as mean  $\pm$  standard error (n=6).  
Statistical significance was calculated between the control and the sample with Student's T-test.

가 67.5 $\pm$ 1.9%이었으며, control군은 type-I이 26.2 $\pm$ 1.5%, type-II가 73.8 $\pm$ 1.5%로 type-I 비율이 감소하고 type-II 비율이 증가하는 경향을 나타내었다. Sample군은 type-I이 27.8 $\pm$ 1.6%, type-II가 72.2 $\pm$ 1.6%로 control군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 1, 2). 뇌경색이 유발된 대뇌반구 반대측(affected side)의 하지에서 sham군은 type-I이 33.1 $\pm$ 1.6%, type-II가 66.9 $\pm$ 1.6%이었으며, control군은 type-I이 21.7 $\pm$ 1.1%, type-II가 78.3 $\pm$ 1.1%로 type-I 비율이 감소하고 type-II 비율이 증가하였다. Sample군은 type-I이 25.8 $\pm$ 1.5%, type-II가 74.2 $\pm$ 1.5%로 control군에 비하여 P<0.05의 유의한 type-I 비율의 증가와 type-II 비율의 감소가 관찰되었다(Fig. 1, 2).

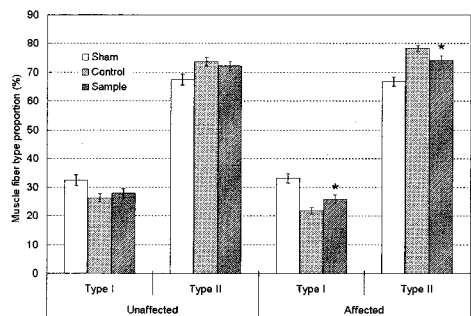


Fig. 1. Changes of type-I and type-II muscle fiber proportions in gastrocnemius muscle of the MCAO rats

Dipsaci radix treatment(sample group) demonstrated significant increase of type-I fibers in gastrocnemius muscle of the affected side hind limb of the MCAO rats(\*, P<0.05).

3. 근섬유형별 단면적 굵기의 변화

비복근에서 type-I과 type-II 근섬유의 단면적 변화를 측정한바, 뇌경색이 유발된 대뇌반구와 동측

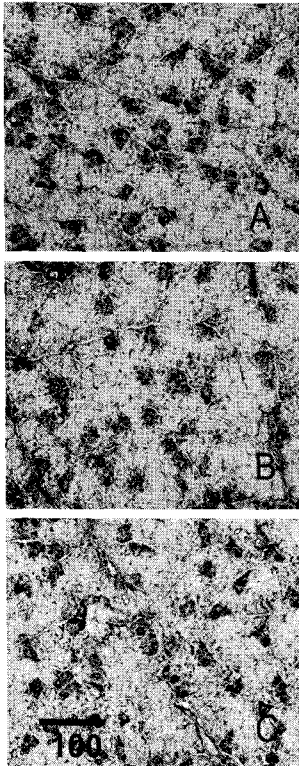


Fig. 2. Representative gastrocnemius muscle sections of the affected side hind limb of the MCAO rats stained with MHC-I (A, Sham; B, Control; C, Sample, x100)

Dark muscle fibers indicate type-I and white muscle fibers are type-II. Dipsaci radix treatment (sample section) demonstrates significant increase of type-I fiber proportion and increase of cross-sectioned area of type-I and -II fibers as compared to the control section.

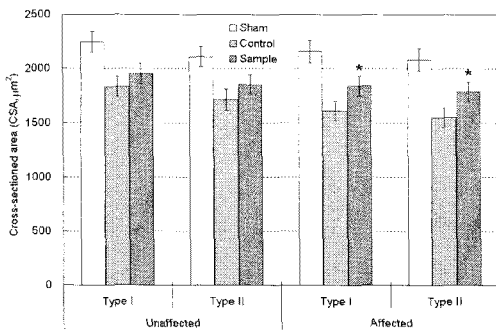


Fig. 3. Changes of the cross-sectioned area of muscle fibers in gastrocnemius muscle of the MCAO rats

Dipsaci radix treatment (sample group) demonstrated significant attenuation of the decrease of cross-sectioned area of type-I and type-II muscle fibers in gastrocnemius muscle of the affected side hind limb of the MCAO rats (\*, P<0.05).

(unaffected side)의 하지에서 sham군은 type-I이  $2245.2 \pm 93.7 \mu\text{m}^2$ , type-II는  $2108.3 \pm 92.5 \mu\text{m}^2$ 이었고, control군은 type-I이  $1833.5 \pm 92.5 \mu\text{m}^2$ , type-II는  $1715.5 \pm 98.2 \mu\text{m}^2$ 로 sham군에 비하여 18.3%와 18.6% 감소하였다. Sample군은 type-I이  $1955.7 \pm 94.3 \mu\text{m}^2$ , type-II는  $1855.2 \pm 87.8 \mu\text{m}^2$ 로 sham군에 비하여 각각 12.9%와 12.0%만 감소하였으나 control군에 비하여는 유의한 차이가 없었다(Fig. 2, 3). 뇌경색이 유발된 대뇌반구 반대측(affected side)의 하지에서 sham군은 type-I이  $2158.9 \pm 105.2 \mu\text{m}^2$ , type-II는  $2082.4 \pm 103.1 \mu\text{m}^2$ 이었고, control군은 type-I이  $1610.5 \pm 88.3 \mu\text{m}^2$ , type-II는  $1553.2 \pm 89.2 \mu\text{m}^2$ 로 sham군에 비하여 25.4% 감소하였다. Sample군은 type-I이  $1843.2 \pm 89.1 \mu\text{m}^2$ , type-II는  $1789.3 \pm 83.6 \mu\text{m}^2$ 로 sham군에 비하여 각각 14.6%와 14.1%만 감소하였으며, control군에 비하여 type-I과 type-II 근섬유 모두 P<0.05의 유의한 근섬유 단면적 감소의 억제를 나타내었다(Fig. 2, 3).

#### 4. MyoD 양성반응 세포수의 변화

비복근에서 MyoD 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바, 뇌경색이 유발된 대뇌반구와 동측(unaffected side)의 하지에서 sham군은 10.3±0.8개를 나타내었고, control군은 8.2±1.1개로 감소하였다. Sample군은 10.8±1.3개로 control군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 4, 5). 뇌경색이 유발된 대뇌반구 반대측(affected side)의 하지에서 sham군은 10.9±0.9개를 나타내었고, control군은 6.5±0.8개로 감소하였다. Sample군은 9.3±1.1개로 control군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 양성반응 세포수의 증가를 나타내었다(Fig. 4, 5).

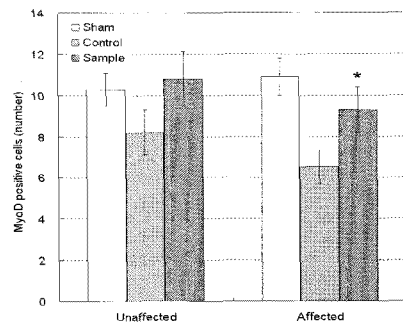


Fig. 4. Changes of MyoD immunopositive cells in gastrocnemius muscle of the MCAO rats

Dipsaci radix treatment(sample group) demonstrated significant increase of MyoD immunopositive cells in gastrocnemius of the affected side hind limb of the MCAO rats (\*, P<0.05).

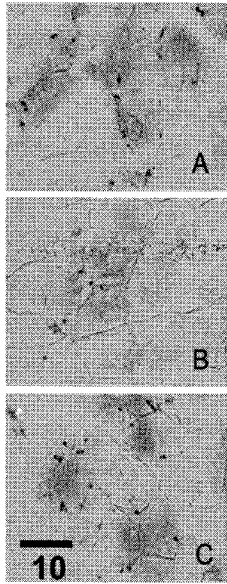


Fig. 5. Representative gastrocnemius muscle sections of the affected side hind limb of the MCAO rats stained with MyoD immunohistochemistry (A, Sham; B, Control; C, Sample, x200)

Dark brown spots are MyoD immunolabeled nuclei. *Dipsaci radix* treatment (sample section) demonstrates significant increase of MyoD immunopositive cells as compared to the control section.

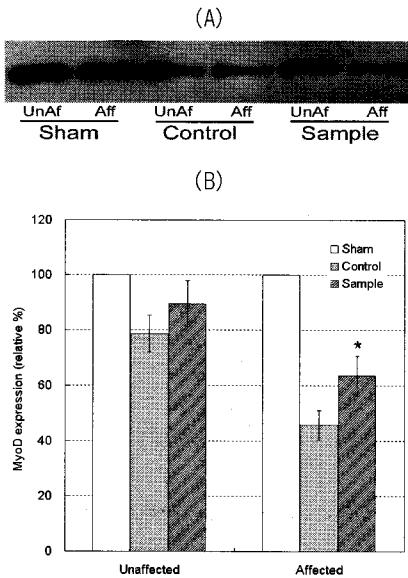


Fig. 6. Representative section of MyoD expressions (A) and changes of MyoD expressions in gastrocnemius muscles of MCAO rats (B)

*Dipsaci radix* administration (sample group) demonstrated significant increase of MyoD expressions in the affected side hind limb of the MCAO rats (\*,  $P < 0.05$ ).

### 5. MyoD 발현의 변화

비복근에서 MyoD 단백질 발현을 western blotting으로 측정하면, 뇌경색이 유발된 대뇌반구와 동측 (unaffected side)의 하지에서 sham군을 100%로 하였을 때 control군은  $78.7 \pm 6.8\%$ 로 감소하였고, sample군은  $89.5 \pm 8.3\%$ 로 증가하였다. 뇌경색이 유발된 대뇌반구 반대측(affected side)의 하지에서 sham군을 100%로 하였을 때 control군은  $45.8 \pm 5.3\%$ 로 감소하였으며, sample군은  $63.5 \pm 7.2\%$ 로 control군에 비하여  $P < 0.05$ 의 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 6).

### 고찰

골격근에 대한 탈신경지배는 근섬유 굵기 감소, 근섬유형 조성 변화, 근섬유 수축력 감소, 근육피로 저항력 감소 및 근육단백질 감소 등을 특징으로 하는 근육위축을 유발시킨다<sup>11,12</sup>. 본 실험에서는 흰쥐에 근육위축을 유발하기 위하여 중대뇌동맥을 폐쇄하는 방법(middle cerebral artery occlusion, MCAO)을 사용하였다. MCAO 방법은 실험동물에서 뇌경색을 유발하는 가장 적절한 방법 중 하나로, 대뇌피질은 물론 선조체에 뇌경색을 유발시킴으로써 후지의 편마비를 유발한다<sup>22</sup>. 흰쥐에서는 뇌경색 유발 약 1주일 이후부터 마비측 후지의 근육총량 감소, 근섬유 굵기 감소 및 근육단백질 감소의 근육위축이 시작된다고 하였다<sup>23</sup>.

본 실험에서 흰쥐에 중대뇌동맥을 폐쇄하는 방법에 의하여 뇌경색을 유발하고, 이후 4주간 續斷 물 추출 엑기스를 경구투여한 다음 일차적으로 뇌경색의 크기 변화를 관찰하였다. 그 결과 續斷 물 추출 엑기스 투여에 의하여 뇌경색 크기가 감소하는 경향을 나타내기는 하였으나 통계학적인 유의성을 갖지 못하여 續斷의 뇌경색 유발 억제효능은 인정되지 않았다. 이전의 연구들에서 續斷은 뇌세포의 손상에 대해서 일정한 보호효능을 가지고 있다고 보고된바 있다. 이러한 결과의 차이는 이전의 연구들에서는 주로 續斷으로부터 추출된 caffeoylquinic acid 유도체<sup>24</sup>, total saponin<sup>25</sup> 등에 대한 신경세포 수준에서의 결과이고, 본 실험에서는 직접적인 MCAO 뇌경색에 대한 효능을 관찰한 방법의 차이에 의한 것으로 생각된다.

뇌졸중에 의한 마비측의 근육은 type-I과 type-II 근섬유 모두에 위축이 유발되며<sup>26</sup>, 발병 이후 이른 시기에 즉시적으로 근육위축이 시작된다고 하였다<sup>27</sup>. 조직화학적 염색에 의하여, 골격근을 구성하는 근섬

유는 3종류의 근섬유형으로 구분할 수 있다. 지근섬유(slow-twitch or type-I)는 수축속도가 느리지만 피로저항력이 강하며, 기능적으로 유산소대사에 의하여 낮은 수준의 에너지를 얻으므로 보행이나 자세유지에 사용되는 근육에 많이 분포하고 있다. 속근섬유(fast-twitch or type-II)는 빠른 수축속도와 낮은 피로저항력이 특징이며, 다시 type-II A와 type-II B로 구분한다. Type-II B는 피로에 매우 취약하나 무산소대사에 의하여 강한 수축력을 발휘하며, type-II A는 type-II B와 type-I의 중간적 특성을 가지고 있다<sup>28)</sup>. 또한 마비에 의하여 근육을 사용하지 않으면 type-I 지근섬유가 type-II 속근섬유로 바뀌는 “slow-to-fast shift” 현상이 일어난다<sup>29,30)</sup>. 후지체공에 의하여 근육을 사용하지 못하도록 하였을 때, 약 2주후에 근섬유들의 굵기가 심하게 위축되고, type-I 근섬유 비율이 감소하고 type-II 근섬유 비율이 증가하는 것이 보고되어 있다<sup>31)</sup>. 또한 척수신경 차단, tetrodotoxin 처치 등 각종 방법을 사용한 근육의 신경지배 차단에 의하여 유발되는 근섬유의 위축과 비율의 변화에 대한 연구는 많이 보고되어 있다<sup>32,33)</sup>.

비복근(Gastrocnemius)은 type-I 지근섬유와 type-II 속근섬유 모두를 일정 비율로 포함하고 있는 근육이며, activity-dependent한 영향에 민감하므로 근섬유형별 위축의 정도를 비복근에서 관찰하였다<sup>34)</sup>. MHC-I antibody를 사용한 면역조직화학염색으로 type-I과 type-II 근섬유를 구분하고 그 비율과 각각의 근섬유 굵기의 변화를 측정본 실험의 결과를 살펴보면, 뇌경색이 유발된 대뇌반구와 동측(unaffected side)의 하지에서 續斷 물추출 액기스를 투여한 sample군은 control군에 비하여 단면적 감소가 심하지 않았으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 뇌경색이 유발된 대뇌반구 반대측(affected side)의 하지에서 sample군은 control군에 비하여 type-I과 type-II 근섬유 모두 P<0.05의 유의한 근섬유 단면적 감소의 억제력을 나타내었다. 또한 뇌경색이 유발된 대뇌반구와 동측(unaffected side)의 하지에서 control군은 type-I 비율이 감소하고 type-II 비율이 증가하는 경향을 나타내었으며, 續斷 물추출 액기스를 투여한 sample군 또한 control군과 유의한 차이가 없었다. 이에 비하여, 뇌경색이 유발된 대뇌반구 반대측(affected side)의 하지에서 sample군은 control군에 비하여 P<0.05의 유의한 type-I 비율의 증가와 type-II 비율의 감소가 관찰되었다. 이러한 결과는 續斷이 근섬유 위축의 억제와 근섬유형의 “slow-to-fast shift” 현상을 억제하는 효능이 있음을 보여주는

것이다.

근육의 생성과 근섬유의 분화는 MyoD, myogenin, Myf5, MRF4 등의 근육생성조절인자(myogenic regulatory factors, MRFs)에 의하여 작용에 의한다<sup>35)</sup>. MyoD는 골격근의 탈신경지배, 스트레치와 전기자극, 근육손상, 과부하, 운동 등 다양한 자극에 의하여 근육세포의 핵과 satellite cell에서 발현되어 골격근의 가소성(plasticity)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>18,35)</sup>. 탈신경지배된 골격근에서는 MyoD mRNA와 단백질의 발현이 증가하고<sup>18)</sup>, MyoD 발현 증가는 근육세포의 apoptosis를 억제하는 기전을 통하여 탈신경지배에 의한 근육의 위축을 억제하며, 골격근의 비대와 재생에도 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>18,36)</sup>. 또한 MyoD는 주로 type-II 근섬유와, myogenin은 주로 type-I 근섬유와 관련된 것으로 보고되어 있다<sup>37)</sup>.

뇌경색 유발 후 비복근에서 MyoD의 발현을 면역조직화학염색과 western blotting으로 관찰한 본 실험의 결과, 뇌경색이 유발된 대뇌반구 반대측(affected side)의 하지에서 續斷 물추출 액기스를 투여한 sample군은 control군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 MyoD 양성반응 세포수의 증가를 나타내었으며, western blotting으로 측정된 MyoD 단백질 발현의 변화에서도, sample군은 control군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 續斷이 MyoD 발현에 매우 강력한 영향을 가지고 있다는 것을 보여주는 결과로서, 續斷이 근육세포의 apoptosis를 억제하는 기전을 통하여 탈신경지배에 의한 근육의 위축을 억제하는 것으로 생각된다. 이러한 續斷의 효능을 재검증하기 위해서는 추가적으로 보다 세밀한 근육세포에 대한 in vitro 실험이 필요하리라 생각된다.

본 연구의 결과들을 총괄하면, 續斷은 뇌경색 유발을 억제하지는 못하였지만 중추신경계 손상에 의한 근육위축의 경우 type-I 근섬유가 type-II 근섬유로 변화되는 “slow-to-fast shift” 현상을 억제하며, 근섬유 위축을 억제하고, MyoD 발현을 증가시킴으로써 근육위축에 의한 운동기능 회복에 유의한 효능을 발휘하는 것으로 생각된다.

## 결 론

뇌경색에 의하여 유발되는 근육위축에 대한 續斷의 효능을 실험적으로 관찰하고자 흰쥐에 중대뇌동맥을 폐쇄하는 방법에 의하여 뇌경색을 유발하고, 4주간 續斷 물추출 액기스를 경구투여한 다음 뇌경색

크기의 변화, 하지 비복근에서 근섬유 위축 및 근육 세포 성장촉진인자인 MyoD 단백질 발현의 변화를 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 續斷은 증대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌경색 크기를 감소시키지는 못하였다.
  2. 續斷은 뇌경색에 의한 손상측 하지 비복근에서 type-I 비율을 유의하게 증가시키고 type-II 비율을 유의하게 감소시켰다.
  3. 續斷은 뇌경색에 의한 손상측 하지 비복근에서 type-I과 type-II 근섬유 단면적의 감소를 유의하게 억제하였다.
  4. 續斷은 뇌경색에 의한 손상측 하지 비복근에서 MyoD 양성반응 세포 수를 유의하게 증가시켰다.
  5. 續斷은 뇌경색에 의한 손상측 하지 비복근에서 MyoD 발현을 유의하게 증가시켰다.
- 이상의 결과들로 보아 續斷은 중추신경계 손상에 따른 근육위축을 억제하는 효능이 있으며, 이는 근육 세포 apoptosis를 억제하는 기전을 통하여 나타나는 것으로 판단된다.

## 감사의 글

이 연구는 (주)함소아제약 R&D센터의 지원에 의한 결과임

## 참고문헌

1. 김호철. 한약약리학. 서울 : 집문당. 2001 : 450.
2. 안덕균, 최연수. 續斷이 흰쥐의 난소적출로 유발한 골다공증에 미치는 영향. 본초분과학회지. 1994 ; 9 : 181-6.
3. 임강현, 전훈. 續斷의 흰쥐장골 길이성장에 미치는 영향에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2001 ; 15 : 983-8.
4. 이영준, 최희인, 김윤철, 신형식, 유형근. 속단의 dichloromethane 분획물이 태아골모세포의 골형성 유도에 미치는 효과. 대한치주학회지. 2003 ; 33 : 259-69.
5. Ishiguro K, Yamaki M, Takagi S, Ikeda Y, Kawakami K, Ito K, Nose T. Studies on iridoid-related compounds. V. Antitumor activity of iridoid dervs. periodate oxidation products. J Pharmacol. 1988 ; 11 : 131-6.
6. Hung TM, Na M, Thuong PT, Su ND, Sok D, Song KS, Seong YH, Bae K. Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. J Ethnopharmacol. 2006 ; 108 : 188-92.
7. Zhang ZJ, Qian YH, Hu HT, Yang J, Yang GD. The herbal medicine *Dipsacus asper* wall extract reduces the cognitive deficits and overexpression of beta-amyloid protein induced by aluminum exposure. Life Sci. 2003 ; 73 : 2443-54.
8. Li DQ, Li Y, Liu Y, Bao YM, Hu B, An LJ. Catalpol prevents the loss of CA1 hippocampal neurons and reduces working errors in gerbils after ischemia-reperfusion injury. Toxicol. 2005 ; 46 : 845-51.
9. Ishihara A, Roy RR, Ohira Y, Iyata Y, Edgerton VR. Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increasing loads. J Appl Physiol. 1998 ; 84 : 2183-9.
10. Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR. Nerve activity independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. Am J Physiol Cell Physiol. 2003 ; 285 : C1161-73.
11. Finol HJ, Lewis DM, Owens R. The effects of denervation on contractile properties of rat skeletal muscle. J Physiol. 1981 ; 319 : 81-92.
12. Goldspink DF. The effects of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. Biochem J. 1976 ; 156 : 71-80.
13. Dupont-Versteegden EE. Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. World J Gastroenterol. 2006 ; 12 : 7463-6.
14. Adams V, Jiang H, Yu J, Mobius-Winkler S, Fiehn E, Linke A, Weigl C, Schuler G, Hambrecht R. Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. J Am Coll Cardiol. 1999 ; 33 : 959-65.
15. Tews DS, Goebel HH, Meinck HM. DNA-fragmentation and apoptosis-related proteins of muscle cells in motor neuron disorders. Acta Neurol Scand. 1997 ; 96 : 380-6.
16. Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ.



Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res.* 2000 ; 302 : 235-41.

17. Dupont-Versteegden EE, Murphy RJ, Houle JD, Gurley CM, Peterson CA. Activated satellite cells fail to restore myonuclear number in spinal cord transected and exercised rats. *Am J Physiol.* 1999 ; 277 : C589-97.

18. Ishido M, Kami K, Masuhara M. In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 ; 287 : C484-93.

19. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989 ; 20 : 84-91.

20. Clark RK, Lee EV, Fish CJ, White RF, Price WJ, Jonak ZL, Feuerstein GZ, Barone FC. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull.* 1993 ; 31 : 565-72.

21. Sant'ana Pereira JA, Wessels A, Nijtmans L, Moorman AF, Sargeant AJ. New method for the accurate characterization of single human skeletal muscle fibres demonstrates a relation between mATPase and MyHC expression in pure and hybrid fibre types. *J Muscle Res Cell Motil.* 1995 ; 16 : 21-34.

22. Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H, Schmid-Elsaesser R. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res.* 2000 ; 863 : 94-105.

23. Choe MA, An GJ, Lee YK, Im JH, Choi-Kwon S, Heitkemper M. Effect of early low-intensity exercise on rat hind-limb muscles following acute ischemic stroke. *Biol Res Nurs.* 2006 ; 7 : 163-74.

24. Kim SS, Park RY, Jeon HJ, Kwon YS, Chun W. Neuroprotective effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid on hydrogen peroxide-induced cell death in

SH-SY5Y cells. *Phytother Res.* 2005 ; 19 : 243-5.

25. Qian YH, Liu Y, Hu HT, Ren HM, Chen XL, Xu JH. The effects of the total saponin of *Dipsacus asperoides* on the damage of cultured neurons induced by beta-amyloid protein 25-35. *Anat Sci Int.* 2002 ; 77 : 196-200.

26. Hachisuka K, Umezumi Y, Ogata H. Disuse atrophy of lower limbs in hemiplegic patients. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997 ; 78 : 13-8.

27. Choe MA, An GJ, Lee YK, Im JH, Choi-Kwon S, Heitkemper M. Effect of inactivity and undernutrition after acute ischemic stroke in a rat hindlimb muscle model. *Nurs Res.* 2004 ; 53 : 283-92.

28. Sher J, Cardasis C. Skeletal muscle fiber types in the adult mouse. *Acta Neurol Scand.* 1976 ; 54 : 45-56.

29. Stevens L, Firinga C, Gohlsch B, Bastide B, Mounier Y, Pette D. Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 ; 279 : C1558-63.

30. Ishihara A, Kawano F, Wang XD, Ohira Y. Responses of neuromuscular systems under gravity or microgravity environment. *Biol Sci Space.* 2004 ; 18 : 128-9.

31. Desaphy JF, Pierno S, Liantonio A, De Luca A, Didonna MP, Frigeri A, Nicchia GP, Svelto M, Camerino C, Zallone A, Camerino DC. Recovery of the soleus muscle after short- and long-term disuse induced by hindlimb unloading: effects on the electrical properties and myosin heavy chain profile. *Neurobiol Dis.* 2005 ; 18 : 356-65.

32. Chatzistiriou AS, Kapoukranidou D, Gougoulas NE, Albani M. Effect of neonatal spinal transection and dorsal rhizotomy on hindlimb muscles. *Brain Res Dev Brain Res.* 2005 ; 157 : 113-23.

33. Dupont-Versteegden EE, Houle JD, Gurley CM, Peterson CA. Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am J Physiol.* 1998 ; 275 : C1124-33.

34. Roy RR, Zhong H, Siengthai B, Edgerton VR. Activity-dependent influences are greater for

fibers in rat medial gastrocnemius than tibialis anterior muscle. *Muscle Nerve*. 2005 ; 32 : 473-82.

35. Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2005 ; 16 : 585-95.

36. Ishido M, Kami K, Masuhara M. Localization of MyoD, myogenin and cell cycle

regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles. *Acta Physiol Scand*. 2004 ; 180 : 281-9.

37. Walters EH, Stickland NC and Loughna PT. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J Muscle Res Cell Motil*. 2000 ; 21 : 647 - 53.