



Original Article / 원저

흰쥐의 만성 알콜성 근위축에 柴胡疎肝散이 미치는 효과

김범희*

동의대학교 한의과대학 한의학과, 동의대학교 한의학연구소

The Effects of Shihosogan-san on Alcohol-induced Muscle Atrophy in Rats

Bum Hoi Kim*

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

ABSTRACT

Chronic or acute alcohol abuse often leads to liver injury associated with alcoholic hepatitis, liver fibrosis, cirrhosis, and liver cancer. In addition to the liver, alcohol abuse also induces a variety of other tissue injuries including pancreatitis, cardiomyopathy, neurotoxicity and muscle loss. Chronic skeletal muscle myopathy, independent of peripheral neuropathy, is well recognised in alcoholic patients. Several mechanisms may be involved in the pathogenesis of alcoholic myopathy. Ethanol is a potent inhibitor of muscle protein synthesis. Gastrocnemius and plantaris muscles are Type II fiber-predominant and usually considered representative of the musculature as a whole. Whereas, soleus muscle is Type I fiber predominant.

Shihosogan-san is a traditional Korean medicine that is widely employed to treat indigestion and liver diseases. Muscle diseases are often related to liver diseases and conditions. We therefore tested the hypothesis that treatment with Shihosogan-san could ameliorate the ethanol-induced changes in muscle protein synthesis. Young male Sprague-Dawley rats were orally given 25% ethanol (5ml/kg, body weight) daily with Ethanol for 28 days. Normal group was similarly administrated with saline. In Shihosogan-san treated group, rats were orally administrated Shihosogan-san extract, and rats of EtOH group were given with the vehicle only. After 4 week, the

morphology of gastrocnemius and plantaris muscles were assessed by hematoxylin and eosin staining. For comparative purposes, liver function was also investigated. The muscles from rats of EtOH group displayed a significant reduction in average cross section area compared to Normal group. Shihosogan-san treated group had increased fiber compared to the EtOH group. Moreover, Shihosogan-san treated group compared with EtOH group showed significantly decreased pro-apoptotic BAX expression and increased anti-apoptotic Bcl-2 expression. In conclusion, Shihosogan-san extract showed ameliorating effects on chronic alcohol toxicity in skeletal muscle.

Key words : Shihosogan-san, muscle atrophy, gastrocnemius, plantaris, BAX, Bcl-2

I. 서론

장기간의 알콜섭취는 인체의 여러 장기에 영향을 미치는데, 간, 심장, 신경계통, 소화계통 뿐 아니라 인체 골격근육에도 영향을 미치게 된다. 알콜중독 환자의 많은 수가 근육위축, 보행장애, 수축력 약화와 같은 근육계 이상을 호소한다¹⁾. 이러한 골격계통 증상은 말초신경병증과는 독립적으로 발생하는데, 알콜성 근질환(Alcohol-induced skeletal muscle disease :AIMD)이란 급성 혹은 만성 알콜섭취로 인해 근육에서 유발되는 분자생물학적, 해부학적, 생리학적 병리상태를 가리킨다²⁾.

여러 가지 기전들이 알콜에 의한 근육 손상에 관여하는데, 특히 알콜은 근육 단백질 합성에 강력한 방해인자로 알려져 있다³⁾. 따라서 장기간의 알콜섭취는 근육세포에서의 단백질 합성을 감소시키는 것으로 밝혀졌다⁴⁾. 알콜에 의한 직접적인 영향 이외에도 단백질생성 부족으로 인해 발생하는 insulin-like growth factor-I(IGF-1), testosterone 및 corticosterone과 같은 호르몬 변화도 근육의 감소에 영향을 미치게 된다⁵⁾.

만성적인 알콜섭취로 인한 근육손상에서 Type II(빠른 섬유, 혐기성 섬유) 근섬유의 위축이 뚜렷이 나타나는 반면, Type I(느린 섬유, 호기성 섬유) 근섬유에는 상대적으로 영향이 적은 것으로 밝혀졌다⁶⁾. 종아리 뒤쪽에 위치한 비복근(gastrocnemius), 가자미근(soleus) 및 족척근(plantaris) 세 종류의 근육은 전체근육계통 변화의 지표로 자주 사용되는데, gastrocnemius와

plantaris에는 Type II 근섬유가 많이 존재하며, 반대로 soleus에는 Type I 근섬유가 많이 존재하는 것으로 알려져 있다⁷⁾.

柴胡疎肝散은 疎肝行氣하고 和血止痛하는 효능이 있어 肝氣鬱結로 인한 氣血瘀滯로 脇肋이 疼痛하고 寒熱往來하는 등의 증상을 치료한다⁸⁾. 柴胡疎肝散에 대한 실험적 연구로는 알콜성 스트레스로 인한 위점막 손상에 대한 방어효과⁹⁾, 흰쥐에서 스트레스¹⁰⁾와 Thioacetamide¹¹⁾로 유발된 간손상의 회복, 수영스트레스 부하 후 혈액 변화에 미치는 영향¹²⁾과 스트레스로 인한 기억저하 및 우울행동에 미치는 영향¹³⁾, 柴胡疎肝散 약침이 뇌의 serotonin함량에 미치는 변화¹⁴⁾ 등에 관한 연구가 진행되었다. 즉, 柴胡疎肝散은 주로 정서적, 육체적 스트레스에 의한 肝과 胃와 같은 소화계통 손상 및 신경계 변화에 유의한 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 위에 언급한 알콜성 스트레스로 인한 근육 손상에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 알콜투여로 유발된 근육 손상에 柴胡疎肝散이 미치는 영향을 살펴보기 위하여 4주간 흰쥐에 EtOH를 투여하고 柴胡疎肝散 추출액을 경구 투여한 후 체중변화, 간의 생화학적 변화 및 근육의 무게, 근섬유의 변화를 측정하였다. 또한 알콜성 근육 손상의 세포사에서 apoptosis에 관련된 Bcl-2(B-cell lymphoma 2) 및 BAX(Bcl-2 associated X) 단백질 변화를 면역조직화학을 통해 관찰하였다. 그 결과, 柴胡疎肝散이 유의한 방어효과를 나타내었기에 이를 보고하는 바이다.

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

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

• Received : October 28, 2016 / Revised : November 26, 2016 / Accepted : November 28, 2016



II. 실험방법

1. 실험동물

본 연구에서는 (주)샘타코 (경기도, 대한민국)에서 구입한 10주령, 약 250g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 30마리를 사용하였다. 흰쥐는 온도 23~24°C, 습도 40~60%, 조명 12시간 명/암이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균 음수와 사료를 자유롭게 공급하여 사육하고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

본 연구의 모든 과정은 동의대학교 동물실험윤리위원회의 규정 및 방침에 따라 진행되었다(승인번호: R2016-029).

2. 약물의 제조와 실험군의 분리

본 연구에 사용된 柴胡疎肝散(Shihosogan-san: SHSGS)은 동의대학교 한방병원을 통해 구입하였으며, 약물 조성은 Table 1과 같다. 柴胡疎肝散 5첩 분량인 157.5g을 증류수 2 L와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과액을 감압농축하여 동결건조시켜 물추출액기스 36.7g을 얻었다. 투여량은 흰쥐 체중 100g당 31.5mg을 음용수에 녹여 경구 투여하였다.

실험군의 분리는 흰쥐를 무작위로 10마리씩 나누어 Normal, EtOH, EtOH+SHSGS 세 군으로 분리하였다.

3. 만성 알콜성 손상의 유발과 약물투여

흰쥐에서의 만성 알콜성 간손상은 25%의 EtOH(Sigma-Aldrich Chem. Co., St. Louis, Missouri, USA) 용액을 5ml/kg, bw/day의 수준으로¹⁵⁾, 4주간 매일 오전 일정한 시간에 경구투여함으로써 유발시켰다. EtOH군, EtOH+SHSGS군의 모든 실험동물에 EtOH을 경구투여 하였으며, Normal군에는 동일량의 생리식염수를 투여하였다. EtOH 투여 후 30분 후에 EtOH+SHSGS군에는 柴胡疎肝散 추출물을, EtOH군에는 동일량의 생리식염수를 경구투여하였다.

물과 사료는 모든 군에서 전체 실험기간 동안 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

4. 체중 측정

실험동물의 체중은 전체 실험기간동안 매일 오전 측정하였으며, 실험 마지막 날에는 부검 직전에 체중을

측정하였다.

5. 혈액생화학적 검사

실험동물을 안락사 시킨 후 심장 혹은 하대정맥에서 혈액을 채혈하였다. 혈액을 냉장고에 2시간정도 방치한 후 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 채취한 혈청내 AST(Aspartate Aminotransferase), ALT(Alanine Aminotransferase) 등의 수치를 측정하였다.

6. 근육 중량의 변화

실험동물의 오른쪽 후지로부터 gastrocnemius, soleus 및 plantaris를 분리 채취하여 중량을 측정하였다. 근육의 무게는 실험동물의 체중을 측정한 다음 체중 100g당 근육 무게를 계산하였다. 이후 근육조직은 근육의 중앙부분에서 약 3~5mm 정도 두께로 절편하여 -50°C의 dry ice-isophentan 용액으로 동결시키고 -80°C에서 보관하였다.

7. 해부조직학적 관찰 및 근육절단면 면적 측정

동결보관된 근육조직 중에 gastrocnemius 와 plantaris m.의 중앙부분(mid-belly)을 연속적으로 8 μm 두께로 냉동절편하여 H&E 염색법을 시행 후, 현미경 하에서 관찰하고 사진촬영 후 영상분석용 Axiovision LE software (Carl Zeiss Vision, ver 4.2 USA)를 이용하여 근육 단면의 면적(cross section area)을 측정하였다¹⁶⁾. 각 실험군의 근섬유의 평균 면적은 각각의 근육조직의 최소 30개 이상의 근섬유를 관찰함으로써 측정하였다.

8. Immunohistochemistry

면역조직화학염색방법은 자유부유법(free-floating)을 사용하였다. Primary antibody는 anti-BAX (ab7977, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; ABcam), anti-Bcl-2 (sc-783, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; Santacruz)로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 12시간 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 1시간씩 반응시켰다.

면역반응의 결과를 정량화하기 위해 현미경 하에서 동일한 일정면적 내의 면역 양성반응 세포수를 측정하여 수치화하였다.

9. 통계학적 분석

측정된 모든 자료는 ANOVA 분석을 통해 유의성 여부를 확인 후, student's t-test를 사용하여 $P < 0.05$ 및 $P < 0.01$ 의 유의수준으로 검증하였다. 모든 값의 수치는 평균±표준오차(mean±standard error)로 표시하였다.

III. 결과

1. 체중의 변화

실험초기에 최초로 측정된 실험동물의 체중은 Normal군, EtOH군, EtOH+SHSGS군에서 각각 $264.4 \pm 1.1g$, $246.3 \pm 1.5g$, $244.5 \pm 1.7g$ 이었으며, 4주간의 실험기간동안 모든 실험군에서 시간이 지남에 따라 체중이 증가하는 양상을 나타내었다. 하지만, 전반적으로 EtOH군과 EtOH+SHSGS군에서 모두 Normal군에 비해 체중의 증가량이 현저히 적은 편이었다. 4주후 실험이 완료된 시기에 마지막으로 측정된 체중은 Normal군에서 $434.7 \pm 11.8g$, EtOH군에서 $383.8 \pm 7.4g$, EtOH+SHSGS군에서는 $394.8 \pm 10.1g$ 으로 측정되어, EtOH+SHSGS군에서의 체중 증가량이 EtOH군 보다 높은 편이었으나 유의성 있는 차이는 아니었다.

2. 간기능에 미치는 영향

AST값의 변화를 살펴보면 4주간의 알콜투여 후 Normal군에서 $79.51 \pm 9.87IU/L$, EtOH군에서 $127.00 \pm 15.82IU/L$ 로 측정되어, EtOH군에서 Normal군에 비해 유의성 있는 상승이 나타났다. EtOH+SHSGS군에서는 $103.50 \pm 9.92IU/L$ 로 EtOH군에 비해 감소되었으나, 유의성 있는 변화는 아닌 것으로 관찰되었다.

ALT의 변화에서도 Normal군에서 $47.38 \pm 3.33IU/L$, EtOH군에서 $68.88 \pm 4.80IU/L$ 로, EtOH군이 Normal군에 비해 유의성 있는 증가가 나타났는데, EtOH+SHSGS군에서는 $53.25 \pm 3.83IU/L$ 로 측정되어 EtOH군에 비해 유의성 있는 감소가 관찰되었다.

3. 근육 중량의 변화

각 실험군에서 오른쪽 후지의 근육의 무게를 측정된 결과, 4주 후 gastrocnemius는 Normal군에서 $559.4 \pm 6.1mg/100g$, 알콜을 경구투여한 EtOH군에서는 $522.0mg/100g$ 로 측정되어 EtOH군이 Normal군에 비해 유의성있는 감소를 나타내었다. 반면 EtOH+SHSGS군에서는 541.8 ± 6.0

$mg/100g$ 으로 측정되어 EtOH군에 비해 중량감소가 줄어든 것을 확인할 수 있었다.

한편, soleus와 plantaris의 중량변화에서는 Normal군에서 각각 $57.8 \pm 1.7mg/100g$, $128.7 \pm 4.6mg/100g$ 로 측정되었고, EtOH군에서는 각각 $55.7 \pm 1.1mg/100g$, $124.2 \pm 5.4mg/100g$ 로 EtOH군에서 두 근육의 중량이 모두 감소되었음을 확인할 수 있었다. EtOH+SHSGS군에서는 각각 $56.0 \pm 0.8mg/100g$, 126.7 ± 5.9 으로 중량감소의 회복이 관찰되었으나 유의성 있는 변화는 아니었다.

4. 근육섬유의 단면적 변화

Gastrocnemius와 plantaris의 근육세포를 H&E 염색 후 현미경으로 관찰한 결과, Normal군에서는 균일한 다각형의 근섬유가 관찰되었으며, 4주간 알콜을 투여한 EtOH군의 경우에는 근섬유의 크기가 위축되는 변화가 나타났다. 알콜투여후 시호소간산을 투여한 EtOH+SHSGS군의 경우에도 근섬유 위축이 관찰되었으나 EtOH군에 비해 변화가 적은 편이었다. 모든 군에서 근섬유 변성, 괴사, 염증, 또는 섬유화 등의 변화는 관찰되지 않았다.

각 근육의 근섬유의 단면적을 측정하여 비교한 결과에서는, gastrocnemius의 경우 EtOH군에서 $4,761.7 \pm 254.1 \mu m^2$ 으로 측정되어 $5,792.7 \pm 196.6 \mu m^2$ 으로 측정된 Normal군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다. 반면 EtOH+SHSGS군에서는 $5,477.0 \pm 196.6 \mu m^2$ 로 EtOH군에 비해 유의성 있는 회복이 나타났다. plantaris의 경우에는 Normal군에서 $4,675.8 \pm 180.9 \mu m^2$ 로, EtOH군에서 $4,056.6 \pm 189.4 \mu m^2$ 로 측정되어 마찬가지로 EtOH군이 Normal에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다. EtOH+SHSGS군에서는 $4,242.2 \pm 158.8 \mu m^2$ 로 EtOH군에 비해 증가하였으나 유의성 있는 변화는 아니었다.

5. 면역조직화학적 염색

1) BAX

EtOH군에서 BAX 단백질의 발현은 단위면적 당 평균 61.4 ± 3.5 개/ $10^5 \mu m^2$ 로, 평균 27.1 ± 3.6 개/ $10^5 \mu m^2$ 의 발현을 나타낸 Normal군에 비해 현저한 증가가 관찰되었다. 반면, EtOH+SHSGS군에서는 49.4 ± 2.9 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 EtOH군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다.

2) Bcl-2

Normal군에서 Bcl-2 단백질의 발현은 평균 46.4 ± 2.5 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 관찰되었으며, EtOH군에서는 52.0 ± 2.8 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 Normal군과 비교하여 약간 증가하였으나, 유의성 있는 차이는 발견되지 않았다. 그러나 EtOH+SHSGS군에서는 71.9 ± 4.1 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 측정되어 EtOH군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다.

IV. 고찰

본 연구의 목적은 만성적인 알콜섭취로 인해 근육위축이 나타남을 확인하고 이에 대한 한의학적 처치가 유효한 효과를 나타내는지를 검증하기 위한 것이다. <黃帝內經·素問>에 알콜섭취에 의한 손상에 대해서는 “酒入於胃 ... 精氣竭, 則不營其四肢也¹⁷⁾”라 하여 알콜과 신체근육과의 관련성을 제시하였고, 또한“肝이 인체의 筋을 주관한다”하여 한의학에서 筋은 肝의 기능을 외부로 발현하는 생리기능계통에 해당되는 것으로 여겨지고 있다¹⁸⁾. 이 점에 착안하여 다양한 한의학 적 치료 중에서 전통적으로 임상적인 간질환에 대응되어 왔으며, 실험적으로도 간손상에 치료효과가 입증^{10,11)}된 柴胡疎肝散이 알콜로 인한 근육손상에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 이전 연구를 통하여 시호 소간산은 stress로 인한 흰쥐에 간손상에 유의한 보호 효과 있음이 밝혀졌으며¹⁰⁾, thioacetamide 약물중독에 의한 흰쥐의 간손상에도 유의한 효과가 있음이 알려졌다¹¹⁾. 간손상뿐 아니라 알콜에 의한 생쥐의 위점막 손상에도 방어효과가 있는 것으로 밝혀졌다⁹⁾.

본 연구에서는 알콜투여로 실제 근육손상이 일어나는지를 확인하기 위해 Lieber-DeCarli model¹⁹⁾을 기반으로 4주간 흰쥐에 에탄올을 경구투여하였다. 그 결과 4주의 실험기간 동안 알콜을 투여한 EtOH군과 EtOH+SHSGS군에서 Normal군에 비해 체중의 증가량이 유의성 있게 감소된 것으로 관찰되었다. 이는 장기적인 알콜로 인해 일반적으로 체중감소가 나타난다는 임상결과와 일치하는 것으로^{6,20)}, 알콜섭취로 인한 영양불균형과 체내 단백질 감소에 기인한 것으로 사료된다²¹⁾. 비록 유의성 있는 차이는 아니었지만, EtOH+SHSGS군에서의 체중 증가량이 EtOH군 보다는 높은 것으로 관찰되었다.

약물에 의한 간손상을 나타내주는 다양한 지표들이

존재하는데, 특히 혈중 AST(GOT)와 ALT(GPT)는 간 질환의 진단에 이용되는 중요한 지표이다²²⁾. 과도한 알콜은 AST와 ALT의 활성을 증가시키는데, AST는 알콜 등의 약물로 인해 미토콘드리아를 손상시키는 경우에 급격히 증가하게 되며 ALT는 간세포질 괴사가 심한 경우 그 괴사 정도를 예민하게 반영하는 것으로 알려져 있다²³⁾. 본 연구에서 4주간의 알콜투여 후 AST 및 ALT의 수치가 EtOH군에서 모두 Normal군에 비해 유의성 있는 급격한 상승이 나타났는데, 이는 알콜로 인해 간세포의 손상이 발생했음을 직접적으로 나타내 주는 것이라 할 수 있다. 알콜을 투여하기 전 柴胡疎肝散 추출물을 경구투여한 EtOH+SHSGS군에서는 AST의 수치가 EtOH군에 비해 감소되는 결과를 나타내었으며, ALT의 경우에도 EtOH군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다. 이는 柴胡疎肝散이 알콜로 유발된 간손상에 방어효과가 있음을 나타내주는 결과로써, 柴胡疎肝散이 stress 혹은 약물에 의한 간손상에 유의한 효과가 있다는 연구결과와도 관련성이 있다 할 수 있다^{10,11)}.

앞서 언급한 바와 같이, 만성적인 알콜섭취는 근육세포에서의 단백질 합성을 감소시키는 데 Type II 근섬유에는 알콜로 인한 근육 위축이 뚜렷이 나타나는 반면, Type I 근섬유에는 상대적으로 영향이 적은 편이다⁶⁾. 붉은 색이며 호기성이고, 느린 섬유인 Type I 근섬유는 일차적인 알콜섭취에 대해 큰 변화를 나타내지 않지만, 만성적으로 높은 수준의 알콜에는 마찬가지로 근섬유의 위축이 나타나는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 이러한 알콜로 인한 근섬유 유형들의 위축은 결과적으로 신체의 총근육량(total muscle mass)과 체질량지수(body mass index)의 감소²⁵⁾ 및 근력약화를 동반하게 된다²⁶⁾. 본 연구에서 4주간의 실험기간 후 실험동물의 오른쪽 종아리의 gastrocnemius, soleus 및 plantaris 근육의 무게를 측정된 결과, 4주간 알콜을 투여한 EtOH군이 세 개의 근육 모두에서 Normal군에 비해 감소된 결과를 나타내었다. 이전의 실험적 연구를 통하여 만성적인 알콜섭취로 인해 단백질 합성이 저해되어 근육량이 줄어들게 되며^{27,28)}, 특히 gastrocnemius가 알콜에 의한 단백질대사의 이화작용에 민감한 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 본 연구에서도 상대적으로 중량이 큰 gastrocnemius에서 근육량의 감소가 뚜렷이 나타났으며, 통계적으로도 유의성 있는 변화를 나타내었다. 한편, 알콜을 투여하기 전 柴胡疎肝散 추출물을

투여한 EtOH+SHSGS군에서는 EtOH군에 비해 근육 무게의 감소가 줄어든 것을 확인할 수 있었으며, 특히 gastrocnemius에서는 EtOH군에 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 柴胡疏肝散이 알콜로 유발된 근육량 감소에 유의한 방어효과가 있는 것을 나타내는 것이라 할 수 있다.

근육무게의 변화를 확인한 후 근섬유의 직경변화를 측정하기 위해, 본 연구에서는 특히 알콜에 의한 변화가 큰 Type II 근섬유가 주로 존재하는 gastrocnemius와 plantaris 근육의 평균 단면적을 H&E 염색법을 통하여 측정하였다³⁰⁾. 그 결과, gastrocnemius와 plantaris 모두에서 4주간 알콜을 투여한 EtOH군이 Normal군에 비해 근육의 단면적이 유의성 있게 줄어드는 결과가 나타났다. 이는 알콜섭취로 인해 근섬유가 위축되는 결과를 보여주는 것이라 할 수 있으며, 본 연구에서는 plantaris에서보다 gastrocnemius에서 근섬유 단면적의 감소가 더욱 뚜렷이 나타났다. 한편, 柴胡疏肝散을 투여한 EtOH+SHSGS군에서는 gastrocnemius의 경우 단면적의 감소를 EtOH군에 비해 유의성 있게 억제시켰으며, plantaris의 경우에도 비록 유의성 있는 변화는 아니었으나 EtOH+SHSGS군이 EtOH군에 비해 단면적 감소를 억제시키는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 柴胡疏肝散이 만성적인 알콜섭취로 인한 근섬유 위축에 유의한 방어효과가 있음을 나타내는 것이라 할 수 있다.

알콜로 인한 근육위축에는 근섬유 단백질 생성감소, 지질과산화(lipid peroxidation) 증가 등 여러 기전이 관여하는 것으로 알려져 있는데, 최근 연구결과에 따르면 알콜로 인한 세포 손상에 apoptosis가 관여하고 있음이 밝혀졌다³¹⁾. 만성적으로 알콜을 섭취하게 되면 심장근육과 골격근육의 근세포에 apoptosis가 유발되어, 알콜성 근위축(alcoholic skeletal myopathy)을 일으키는 주요 병리기전이 되는 것으로 알려졌다³²⁾. Apoptosis와 관련된 단백질 중 BAX와 Bcl-2의 발현은 proapoptotic mechanism의 유발과 억제를 측정하는데 주로 사용된다. Apoptosis로 인한 세포사의 과정 중에 mitochondria의 역할이 중요한데, BAX는 mitochondria의 막투과성을 변화시켜 세포사를 촉진하는 역할을 하는 반면³³⁾, Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 역할을 한다³⁴⁾. 즉, pro-apoptotic protein인 BAX와 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 국소적인 비율이 세포사를 결정하는데 있어 중요하다. 이전 연

구에 따르면, 만성 알콜투여에 의해 BAX와 Bcl-2의 발현이 증가하는 것으로 알려졌는데³⁵⁾, 본 연구에서도 BAX와 Bcl-2 모두 4주간 알콜을 투여한 EtOH군이 Normal군에 비해 발현이 증가하였다. 다만, BAX는 유의성 있는 현저한 증가가 나타났으나 Bcl-2의 경우에는 약간 증가하여 유의성 있는 차이는 없었다. 알콜 투여 후 柴胡疏肝散을 투여한 EtOH+SHSGS군에서는 BAX의 경우 EtOH군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났으며, 반면에 Bcl-2의 경우에는 EtOH군에 비해 유의성 있는 뚜렷한 증가가 나타났다. 이는 柴胡疏肝散 투여가 알콜로 유발된 근육에서 apoptosis를 촉진하는 BAX 단백질의 발현을 감소시키는 동시에, apoptosis를 억제하는 Bcl-2 단백질을 감소시킴으로써 결과적으로 apoptosis를 억제하는 효과를 나타낸 것으로 생각할 수 있다. 이를 통해 알콜로 유발되는 근육위축을 감소시키는 것으로 사료된다.

요약하면, 본 연구의 결과는 이미 임상적·실험적으로 간질환에 유의한 효과가 있는 것으로 입증된 柴胡疏肝散이 알콜로 인한 직접적인 간손상 뿐만 아니라 이차적으로 발생하는 근육 손상에도 상당한 방어효능이 있음을 입증한 것이다. 다만 본 연구에서는 4주간의 알콜투여로 인한 근육 위축에 대해서만 관찰하였는데, 좀 더 장기간의 알콜 투여에 따른 근위축에 한의학적 처치가 미치는 영향에 대해서도 살펴 볼 필요가 있을 것이다. 또한 알콜로 인한 근위축의 과정 중에 관여하는 성장인자나 호르몬 단백질 변화도 추후 검증할 필요가 있다고 사료된다. 본 연구는 알콜로 인한 근위축에 肝과 관련된 한약물이 미치는 영향에 대해 관찰한 시험적인 연구라 할 수 있으며, 앞으로 추가적인 연구를 통하여 肝과 관련된 다양한 한의학적 처치들이 간질환 뿐 아니라 근육질환에 미치는 효과를 검증하여, 차후 임상에서의 활용에 기여할 수 있기를 기대한다.

V. 결론

본 연구는 알콜투여로 유발된 근육 손상에 柴胡疏肝散이 미치는 방어효과를 검증하기 위하여 것으로, 흰쥐에 EtOH 투여 후 柴胡疏肝散 추출액을 경구투여하고 4주 후에 체중변화, 간의 생화학적 변화 및 종아리 근육의 무게, 근섬유와 관련된 단백질 변화를 측정하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.



柴胡疎肝散은 만성적인 알콜섭취로 인한 체중의 감소를 완화시켜주는 효과가 있었으며, 알콜로 인한 간에서의 AST의 상승을 감소시켰으며, ALT의 상승을 유의성 있게 감소시켰다. 뿐만 아니라, 알콜섭취로 유발된 후지근육 위축에 따른 근육 무게 감소와 근섬유의 단면적 감소에 억제효과가 있었으며, 특히 gastrocnemius의 경우 근육무게와 단면적 감소에 유의성 있는 방어효과를 나타내었다. 이러한 근위축에 대한 방어효과는 apoptosis 관련 단백질인 BAX의 발현 억제와 Bcl-2의 발현 촉진에 의한 것으로 생각된다. 이와 같은 결과로 柴胡疎肝散은 만성적인 알콜투여로 인한 간손상뿐 아니라, 알콜로 인한 근육의 위축변화에도 유의한 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

References

- Romero JC, Santolaria F, Gonzalez-Reimers E, Diaz-Flores L, Conde A, Rodriguez-Moreno F, Batista N. Chronic alcoholic myopathy and nutritional status. *Alcohol*. 1994;11(6):549-555.
- Preedy VR, Adachi J, Ueno Y, Ahmed S, Mantle D, Mullatti N, Rajendram R, Peters TJ. Alcoholic skeletal muscle myopathy: definitions, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis. *Eur J Neurol*. 2001;8(6):677-687.
- Preedy VR, Paice A, Mantle D, Dhillon AS, Palmer TN, Peters TJ. Alcoholic myopathy: biochemical mechanisms. *Drug Alcohol Depend*. 2001;63(3):199-205.
- Preedy VR, Peters TJ. The effect of chronic ethanol ingestion on protein metabolism in type-I and type-II fibre-rich skeletal muscles of the rat. *Biochem J*. 1988;254(3):631-639.
- Gonzalez Reimers E, Duran Castellon MC, Lopez Lirola A, Santolaria Fernandez F, Abreu Gonzalez P, Alvisa Negrin J, Sanchez Perez MJ. Alcoholic myopathy: vitamin D deficiency is related to muscle fibre atrophy in a murine model. *Alcohol*. 2010;45(3):223-230.
- Martin F, Ward K, Slavin G, Levi J, Peters TJ. Alcoholic skeletal myopathy, a clinical and pathological study. *Q J Med*. 1985;55(218):233-251.
- Reilly ME, Patel VB, Peters TJ, Preedy VR. In vivo rates of skeletal muscle protein synthesis in rats are decreased by acute ethanol treatment but are not ameliorated by supplemental alpha-tocopherol. *J Nutr*. 2000;130(12):3045-9.
- Lee SI. Herbal Formula Science. Seoul: Young Lim Sa; 1990:97.
- Kong KH. Effects of Daegeum-eumja, Igwi-tang and Sihosogan-san on Gastric Mucosal Lesions Induced by Alcohol, Indomethacin and Burn-stress in Mice. *J Korean Oriental Med*. 2007;28(2):166-184.
- Koo YB, Choi DY. Experimental Study on the Recovery of Sihosogan-San on the Injury of Liver in Rat Induced by Stress. *Korean Journal of Oriental Medical Pathology*. 1988;3(1):63-70.
- Hong YS. Effect of Shihosogansan on Thioacetamide-Induced Rat Liver Injury. Master's Thesis. Seoul, Graduate School of Korean Medicine Kyung Hee University. 1984.
- Jung YS. Effects of Sihosogansan on blood changes after swimming stress. *The Journal of Traditional Korean Medicine*. 1993;3:115-132.
- Jung MH. Anti-stress effects of Sihosogansan in the passive avoidance test and the forced swimming test. Doctoral Thesis. Gyeonggi-do, Graduate School of Korean Medicine Gachon University. 2007.
- Choi MS. Effects of Shihosogansan and Jeungmi-Shihosogansan on Serotonin Content of Stress. Master's Thesis. Gyeonggi-do, Graduate School of Korean Medicine Gachon University. 1999.
- Fujii H, Ohmachi T, Sagami I, Watanabe M. Liver microsomal drug metabolism in ethanol-treated hamsters. *Biochem Pharmacol*. 1985;34(21):3881-3884.
- Otis JS, Brown LA, Guidot DM. Oxidant-induced atrogen-1 and transforming growth factor-beta1 precede alcohol-related myopathy in rats. *Muscle Nerve*. 2007;36(6):842-848.
- Hong WS. Yellow Emperor's Inner Canon. Institute of Traditional Culture. 1994:269
- Shin MK, Hong MC, Ryu DG, Kwon KB, Kim KJ, Kwon YK *et al*. *Oriental Medical Physiology*.

- Seoul:Jip Moon dang 2008:217.
19. Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology*. 1989;10(4):501-510.
 20. World MJ, Ryle PR, Thomson AD. Alcoholic malnutrition and the small intestine. *Alcohol Alcohol*. 1985;20(2):89-124.
 21. Mezey E. Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *Am J Clin Nutr*. 1980;33(12):2709-2718.
 22. Woods SE, Hitchcock M, Meyer A. Alcoholic hepatitis. *Am Fam Physician*. 1993;47(5):1171-1178.
 23. Herlong HF. Approach to the patient with abnormal liver enzymes. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1994;29(11):32-38.
 24. Adachi J, Asano M, Ueno Y, Niemela O, Ohlendieck K, Peters TJ, Preedy VR. Alcoholic muscle disease and biomembrane perturbations (review). *J Nutr Biochem*. 2003;14(11):616-625.
 25. Duane P, Peters TJ. Nutritional status in alcoholics with and without chronic skeletal muscle myopathy. *Alcohol Alcohol*. 1988;23(4):271-277.
 26. Hickish T, Colston KW, Bland JM, Maxwell JD. Vitamin D deficiency and muscle strength in male alcoholics. *Clin Sci (Lond)*. 1989;77(2):171-176.
 27. Nakahara T, Hashimoto K, Hirano M, Koll M, Martin CR, Preedy VR. Acute and chronic effects of alcohol exposure on skeletal muscle c-myc, p53, and Bcl-2 mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(6):E1273-1281.
 28. Preedy VR, Adachi J, Ueno Y, Ahmed S, Mantle D, Mullatti N, Rajendram R, Peters TJ. Alcoholic skeletal muscle myopathy: definitions, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis. *Eur J Neurol*. 2001;8(6):677-687.
 29. Korzick DH, Sharda DR, Pruznak AM, Lang CH. Aging accentuates alcohol-induced decrease in protein synthesis in gastrocnemius. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;304(10):R887-898.
 30. Otis JS, Guidot DM. Procysteine stimulates expression of key anabolic factors and reduces plantaris atrophy in alcohol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33(8):1450-1459.
 31. Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol*. 2002;27(1):63-68.
 32. Urbano-Marquez A, Fernandez-Sola J. Effects of alcohol on skeletal and cardiac muscle. *Muscle Nerve*. 2004;30(6):689-707.
 33. Hajnoczky G, Csordas G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Sinha Roy S, Yi M. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium*. 2006;40(5-6):553-560.
 34. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*. 1997;3(6):614-620.
 35. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med*. 1996;335(16):1182-1189.

Table 1. Herbal Composition of Shihosogan-san

Herb name	Botanical name	weight(g)
Siho	Bupleuri Radix	6
Jinpi	Citri Unshius Pericapium	6
Cheongung	Cnidii Rhizoma	4.5
Baekjagyak	Paeoniae Radix Alba	4.5
Jigak	Aurantii Fructus	4.5
Hyangbuja	Cyperi Rhizoma	4.5
Gamcho	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	1.5
Total amount		31.5

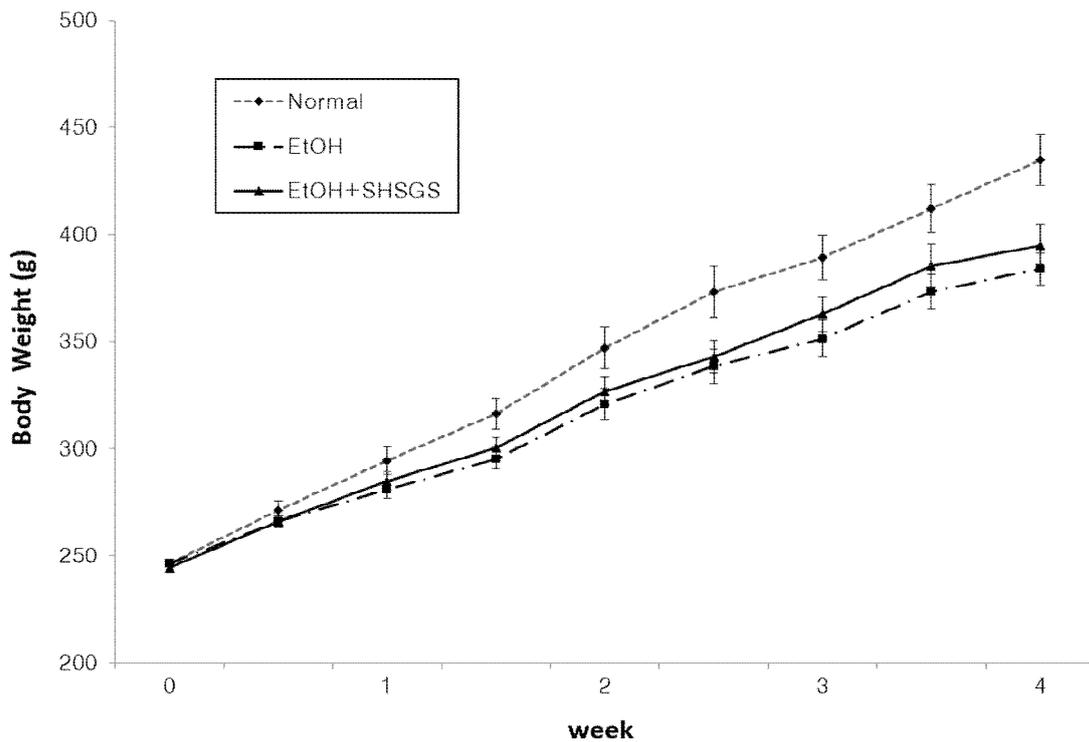


Fig. 1. Body weight changes of male SD rats during the 4 weeks toxicological assessment.

EtOH group was administrated with 25% ethanol (5ml/kg, body weight) for 4 weeks. EtOH+SHSGA group was administrated Shihosogan-san extract after ethanol injection. Compared with Normal group, mean body weight of both EtOH and EtOH+SHSGS group were decreased for whole 4 weeks.

Table 2. Blood Serum Chemistry Values in Rats of Normal, EtOH and EtOH+SHSGS Groups

Group	Normal	EtOH	EtOH+SHSGS
AST(GOT) (IU/L)	79.51±9.87	127.00±15.82 [#]	103.50±9.92
ALT(GPT) (IU/L)	47.38±3.33	68.88±4.80 ^{##}	53.25±3.83 [*]

EtOH group was administrated with 25% ethanol (5ml/kg, body weight) for 4 weeks. EtOH+SHSGA group was administrated Shihosogan-san extract after ethanol injection. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase. Data shown as mean±S.E. were analysed by the Student's t-test.

(^{##}: P<0.01 compared with Normal group. [#]: P<0.05 compared with Normal group. ^{*}: P<0.05 compared with EtOH group.)

Table 3. Muscle Weights of Gastrocnemius(GT), Soleus(SOL), Plantaris(PLT) in Rats of Normal, EtOH and EtOH+SHSGS Groups

Group	(mg/100g body weight)		
	Normal	EtOH	EtOH+SHSGS
GT	559.4 ± 6.1	522.0 ± 6.8 ^{##}	541.8 ± 6.0 [*]
SOL	57.8 ± 1.7	55.7 ± 1.1	56.0 ± 0.8
PLT	128.7 ± 4.6	124.2 ± 5.4	126.7 ± 5.9

EtOH group was administrated with 25% ethanol (5ml/kg, body weight) for 4 weeks. EtOH+SHSGA group was administrated Shihosogan-san extract after ethanol injection. Data shown as mean±S.E. were analysed by the Student's t-test.

(^{##}: P<0.01 compared with Normal group. ^{*}: P<0.05 compared with EtOH group.)

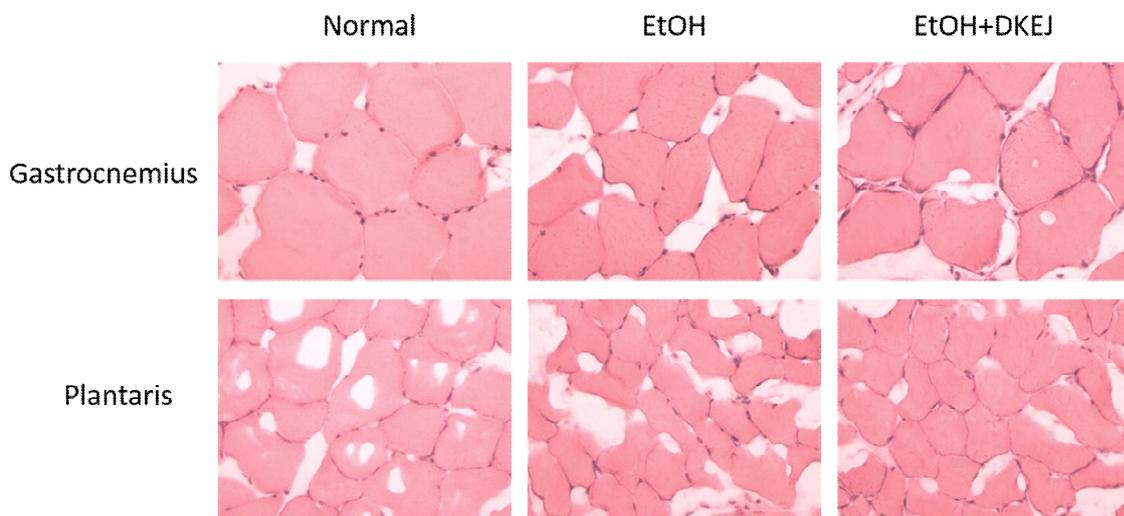


Fig. 2. Representative hematoxylin & eosin stained of gastrocnemius and plantaris muscles in Rats of Normal, EtOH and EtOH+SHSGS Groups.

EtOH group displayed a significant reduction in average cross section area compared to Normal group. EtOH+SHSGS group had increased fiber compared to the EtOH group. (Magnification, x400)

Table 4. Muscle Fiber Areas of Gastrocnemius(GT), Plantaris(PLT) in Rats of Normal, EtOH and EtOH+SHSGS Groups (μm^2)

Group	Normal	EtOH	EtOH+SHSGS
GT	5,792.7 ± 196.6	4,761.7 ± 254.1 ^{##}	5,477.0 ± 196.6 [*]
PLT	4,675.8 ± 180.9	4,056.6 ± 189.4 [#]	4,242.2 ± 158.8

EtOH group was administrated with 25% ethanol (5ml/kg, body weight) for 4 weeks. EtOH+SHSGA group was administrated Shihosogan-san extract after ethanol injection. Data shown as mean±S.E. were analysed by the Student's t-test.

(^{##}: P<0.01 compared with Normal group. ^{*}: P<0.05 compared with EtOH group.)

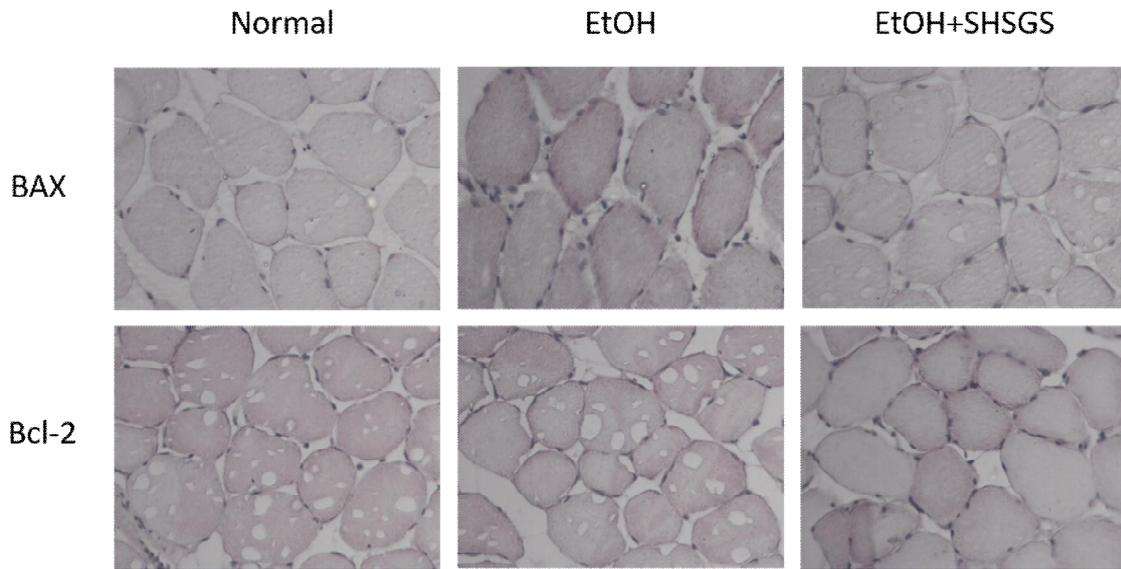


Fig. 3. Representative photographs of BAX & Bcl-2 immunoactivities of gastrocnemius muscles in Rats of Normal, EtOH and EtOH+SHSGS Groups.

The increased level of BAX protein was observed in the EtOH group. Whereas, the expressions of BAX protein in EtOH+SHSGS group were decreased to compared with EtOH group. Bcl-2 expression of EtOH+SHSGS group was increased to compared with EtOH group. (Magnification, x400)

Table 5. The BAX & Bcl-2 immunoactivities of Gastrocnemius in Rats of Normal, EtOH and EtOH+SHSGS Groups (count/ $10^5 \mu\text{m}^2$)

Group	Normal	EtOH	EtOH+SHSGS
BAX	27.1 ± 3.6	61.4 ± 3.5 ^{##}	49.4 ± 2.9 [*]
Bcl-2	46.4 ± 2.5	52.0 ± 2.8	71.9 ± 4.1 ^{**}

EtOH group was administrated with 25% ethanol (5ml/kg, body weight) for 4 weeks. EtOH+SHSGA group was administrated Shihosogan-san extract after ethanol injection. Data shown as mean±S.E. were analysed by the Student's t-test. (^{##}: P<0.01 compared with Normal group. ^{**}: P<0.01 compared with EtOH group. ^{*}: P<0.05 compared with EtOH group.)