

알콜로 유도된 흰쥐의 근위축에서 葛根의 보호 작용과 그 기전에 대한 고찰

김범희

동의대학교 한의과대학 해부학교실, 한의학연구소

The Protective Effects of *Pueraria Radix* against Chronic Alcohol-induced Muscle Atrophy in Rats

Bum Hoi Kim, K.M.D.

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

Objectives Ethanol is a potent inhibitor of muscle protein synthesis. Muscle mass is regulated by the balance between rates of protein synthesis and protein breakdown. Both acute and chronic alcohol consumption inhibits synthesis to a greater extent than degradation. Protein synthesis is more intensely decreased in type II fibers than in type I fibers. Apoptosis has been shown to occur frequently in a variety of tissues in response to chronic alcohol feeding. Increased muscle fiber apoptosis has been shown in alcoholics with myopathy. *Pueraria radix* has been used for many disorders such as fevers, gastrointestinal disorders, muscle aches, allergies, respiratory problems, skin problems, high blood pressure, migraine headaches, lowering cholesterol and treating chronic alcoholism. We therefore tested the hypothesis that oral treatment with *Pueraria radix* could reduce the ethanol-induced muscle atrophy.

Methods Young male Sprague-Dawley rats were orally given 25% ethanol (5 ml/kg, body weight) daily with Ethanol for 4 weeks. Normal group was similarly administrated with saline. The Rats of *Pueraria radix* treated group (EtOH+PR) were orally administrated *Pueraria radix* water 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. The immunoreactivities of pre-apoptotic BAX and anti-apoptotic Bcl-2 proteins were also measured.

Results The muscles from rats of EtOH group represented a significant reduction in average cross section area compared to Normal group. EtOH+PR group had increased fiber compared to the EtOH group. Moreover, to investigate the ethanol-induced muscular apoptosis, the immunohistochemical analysis of Bax and Bcl-2 was carried out. The treatment with *Pueraria radix* (EtOH+PR) significantly decreased BAX expression and increased Bcl-2 expression 4 weeks after ethanol administration when compared with Normal group.

Conclusions These results suggest that *Pueraria radix* water extract has protective effects on chronic alcohol induced myopathy. (J Korean Med Rehabil 2017;27(2):1-8)

RECEIVED March 21, 2017
REVISED April 5, 2017
ACCEPTED April 7, 2017

CORRESPONDING TO

Bum Hoi Kim, Department of Anatomy, College of Korean Medicine and Research Institute of Oriental Medicine, Dong-eui University, 52-57 Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan 47227, Korea

TEL (051) 850-7411
FAX (051) 850-7435
E-mail bume@deu.ac.kr

Copyright © 2017 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Key words *Pueraria radix*, Alcoholic myopathy, Gastrocnemius, Plantaris, BAX, Bcl-2

서론»»»»

골격근질환은 만성 알콜중독 환자에게서 자주 발견되며 많은 수가 근육위축, 보행장애, 수축력 약화와 같은 근육계 이상을 호소하는데, 실제 이러한 증상들은 알콜중독 환자에 있어 간경변보다 더 많이 발생하는 경향이 있다¹⁾. 알콜성 근질환(Alcohol-induced skeletal muscle disease: AIMD)이란 급성 혹은 만성 알콜섭취로 인해 근육에서 유발되는 분자생물학적, 해부학적, 생리학적 병리상태를 가리킨다²⁾. 근육의 크기는 근육 단백질의 합성과 분해 사이의 균형에 조절되는데, 급·만성 알콜섭취 모두 단백질의 합성을 저해하는 것으로 알려졌다³⁾. 만성적인 알콜섭취로 인한 근육손상에서 Type II (빠른 섬유, 혐기성 섬유) 근 섬유의 위축이 뚜렷이 나타나는 반면, Type I (느린 섬유, 호기성 섬유) 근섬유에는 상대적으로 영향이 적은 것으로 밝혀졌다⁴⁾.

여러 가지 원인에 의한 골격근 위축의 발생기전에 있어 apoptosis가 중요한 역할을 하며 여러 병리적 상황에서 근육에서의 apoptosis가 증가하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 급성 혹은 만성적인 알콜섭취는 간 조직이나 뇌 조직 뿐만 아니라 근육에서도 apoptosis를 유발하여 근육손상이 발생하는 것으로 알려졌다⁶⁾. Apoptosis와 관련된 단백질 중 BAX와 Bcl-2의 발현은 proapoptotic mechanism을 유발과 억제를 측정하는데 주로 사용된다. Apoptosis로 인한 세포사의 과정 중에 mitochondria의 역할이 중요한데, BAX는 mitochondria의 막투과성을 변화시켜 세포사를 촉진하는 역할을 하는 반면⁷⁾, Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 역할을 한다⁸⁾. 즉, pro-apoptotic protein인 BAX와 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 국소적인 비율이 세포사를 결정하는데 있어 중요하다.

葛根(Pueraria Radix)은 쑥(Pueraria Thunbergiana Benth.)의 뿌리를 건조한 것으로, 發散透表, 解肌除熱, 生津止渴하며 散鬱火, 解酒毒하는 효능이 있는 것으로 알려져 있다^{9,10)}. 葛根에 대한 실험적 연구로는 알콜섭취에 따른 간질환에 대한 연구가 많이 이루어져 있으며¹¹⁻¹³⁾, 그 외에 알레르기 염증반응에 미치는 영향¹⁴⁾, 좌골신경 손상에 의한 흰쥐의 근위축에 미치는 영향¹⁵⁾, 흰쥐의 혈관사이세포(mesangial cell)에서의 apoptosis에 미치는 영향¹⁶⁾ 등이 보고되었다. 특히 葛根의 isoflavonoid 성분들이 reactive oxygen species (ROS)를 제거하는 우수한 항산화

효능을 가지고 있어서 apoptosis를 억제한다는 것이 밝혀졌다¹⁷⁾. 또한 최근 연구결과에 따르면 갈근은 마우스의 비만모델에서 비만 뿐만 아니라 이에 따른 근위축을 감소시키는 것으로 밝혀졌다¹⁸⁾.

따라서 본 연구에서는 알콜투여로 유발된 근육 손상에 葛根이 미치는 영향을 살펴보기 위하여 4주간 흰쥐에 EtOH를 투여하고 葛根 물추출액을 경구 투여한 후 체중 변화, 간의 생화학적 변화 및 근육의 무게, 근섬유의 변화를 측정하였다. 또한 알콜성 근육손상의 세포사에서 apoptosis에 관련된 BAX 및 Bcl-2 단백질 변화를 면역조직화학법을 통해 관찰하였다. 그 결과, 葛根이 유의한 방어효과를 나타내었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 실험동물

본 연구에서는 (주)샘타코 (경기도, 대한민국)에서 구입한 10주령, 약 250 g 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 갈근(Pueraria Radix: PR)은 동의대학교 한방병원을 통해 구입하였다. 갈근 300 g을 증류수 2 L와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과액을 감압농축하여 동결건조시켜 물추출액기스 48.2 g을 얻었다. 투여량은 흰쥐 체중 100 g 당 4.6 mg을 음수수에 녹여 경구 투여하였다.

실험군의 분리는 흰쥐를 무작위로 10마리씩 나누어 Normal, EtOH, EtOH+PR 세 군으로 분리하였으며, 물과 사료는 모든 군에서 전체 실험기간 동안 자유롭게 섭취할

수 있도록 하였다.

3. 만성 알콜성 손상의 유발과 약물투여

흰쥐에서의 만성 알콜성 간손상은 25%의 EtOH (Sigma-Aldrich Chem. Co., St. Louis, Missouri, USA) 용액을 5 ml/kg, bw/day의 수준으로¹⁹⁾, 4주간 매일 오전 일정한 시간에 경구투여함으로써 유발시켰다. EtOH군, EtOH+PR군의 모든 실험동물에 EtOH을 경구투여 하였으며, Normal군에는 동일량의 생리식염수를 투여하였다. EtOH 투여 후 30분 후에 EtOH+PR군에는 葛根 추출물을, EtOH군에는 동일량의 생리식염수를 경구투여하였다.

4. 혈액생화학적 검사

실험 개시 4주후 실험동물을 안락사 시킨 후 심장 혹은 하대정맥에서 혈액을 채혈하였다. 혈액을 냉장고에 2 시간정도 방치한 후 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 채취한 혈청 내 AST (Aspartate Aminotransferase), ALT (Alanine Aminotransferase) 등의 수치를 측정하였다.

5. 체중측정 및 근육 중량의 변화

실험기간동안 매일 오전 정해진 시간에 실험동물의 체중을 측정하였으며, 실험 마지막 날에는 부검 직전에 측정하였다. 부검을 통해 실험동물의 오른쪽 후지로부터 gastrocnemius, soleus 및 plantaris를 분리 채취하여 중량을 측정하였다. 근육의 무게는 실험동물의 체중을 측정한 다음 체중 100 g당 근육 무게를 계산하였다. 이후 근육조직은 근육의 중앙부분에서 약 3~5 mm 정도 두께로 절편하여 -50°C의 dry ice-isophentan 용액으로 동결시키고 -80°C에서 보관하였다.

6. 해부조직학적 관찰 및 근육절단면 면적 측정

동결보관된 근육조직 중에 gastrocnemius와 plantaris의 중앙부분(mid-belly)을 연속적으로 8 μ m 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 단면

의 면적(cross section area)을 측정하였다²⁰⁾. 각 실험군의 근섬유의 평균 면적은 각각의 근육조직의 최소 30개 이상의 근섬유를 관찰함으로써 측정하였다.

7. 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.

8. 통계학적 분석

측정된 모든 자료는 SAS (version 9.1.3, SAS Institute Inc., USA)를 사용하여 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 \pm 표준오차(mean \pm standard error)로 표시하였다.

결과»»»»

1. 체중의 변화

4주간의 실험기간동안 모든 실험군에서 시간이 지남에 따라 체중이 점차 증가하는 양상이 나타났다. 실험 개시 당시 각 군별 흰쥐의 평균체중은 Normal군, EtOH군, EtOH+PR군에서 각각 247.8 \pm 1.6 g, 248.1 \pm 2.4 g, 247.5 \pm 2.4 g이었으며, 4주후 마지막으로 측정된 체중은 Normal군에서 418.5 \pm 10.7 g, EtOH군에서 368.5 \pm 7.3 g, EtOH+PR군에서는 381.6 \pm 8.6 g으로 측정되어 EtOH군과 EtOH+PR군에서 Normal군에 비해 체중 증가의 유의성 있는 차이가 관찰되었다. 다만, EtOH+PR군에서 체중

감소가 EtOH군에 비해 상대적으로 회복되었으나 유의성 있는 차이는 아니었다(Fig. 1).

2. 간기능에 미치는 영향

AST값의 변화를 살펴보면 4주간의 알콜 투여 후 Normal군에서 78.34 ± 9.23 IU/L, EtOH군에서 130.00 ± 10.12 IU/L, EtOH+PR군에서는 98.16 ± 7.64 IU/L로 측정되어, EtOH군에서 Normal군에 비해 유의성 있는 상승을 나타냈다($p < 0.01$). 반면 EtOH+PR군은 EtOH군에 비해 상대적으로 감소된 수치를 나타내었다($p < 0.05$).

ALT의 변화에서도 Normal군에서 40.86 ± 1.69 IU/L, EtOH군에서 59.63 ± 4.31 IU/L, EtOH+PR군에서는 47.63 ± 1.81 IU/L로 EtOH군이 Normal군에 비해 유의성 있는 증가가 나타났는데($p < 0.01$), EtOH+PR군에서는 EtOH군에 비

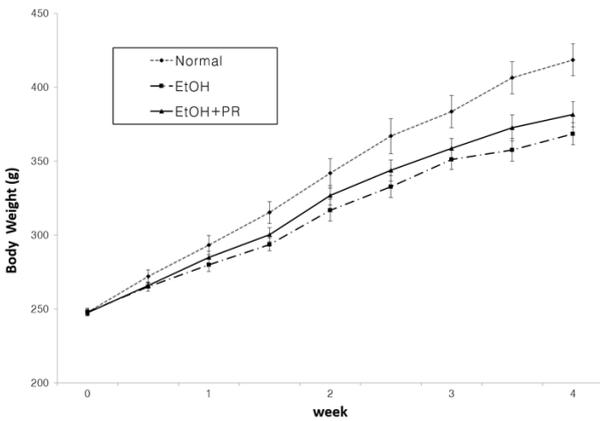


Fig. 1. Body weight changes of male SD rats during the 4 weeks. The mean body weights of both EtOH and EtOH+PR group were decreased significantly compared with Normal group. But, EtOH+PR group was recovered as compared with EtOH group. Data shown as mean \pm S.E.

Table I. Blood Serum Chemistry Values in Rats of Normal, EtOH and EtOH+PR Groups

Group	Normal	EtOH	EtOH+PR
AST (GOT) (IU/L)	78.34 ± 9.23	$130.00 \pm 10.12^*$	$98.16 \pm 7.64^\dagger$
ALT (GPT) (IU/L)	40.86 ± 1.69	$59.63 \pm 4.31^*$	$47.63 \pm 1.81^\dagger$

Data shown as mean \pm S.E. were analysed by the Student's t-test, * $p < 0.01$ compared with Normal group, $^\dagger p < 0.05$ compared with Normal group, $^\ddagger p < 0.05$ compared with EtOH group. ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase.

해 유의성 있는 감소가 관찰되었다($p < 0.05$) (Table I).

3. 근육 중량의 변화

실험 개시 4주 후 흰쥐의 오른쪽 종아리에 위치한 3종류의 근육 무게를 측정하고 체중 100 g당 근육 무게를 환산하여 비교하였다. 그 결과, gastrocnemius의 경우 Normal군에서 552.2 ± 6.4 mg/100 g, EtOH군에서는 517.8 ± 5.8 mg/100 g로 측정되어 EtOH군이 Normal군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.01$). EtOH+PR군에서는 538.7 ± 5.9 mg/100 g으로 측정되어 EtOH군에 비해 근육 무게 감소의 유의성 있는 회복이 관찰되었다($p < 0.05$).

Soleus의 경우에는 Normal군에서 56.6 ± 1.3 mg/100 g, EtOH군에서 52.8 ± 1.3 mg/100 g, EtOH+PR군에서는 54.1 ± 1.1 mg/100 g로 측정되어, EtOH군과 EtOH+PR군에서 모두 Normal군에 비해 근육 무게가 감소되었으며, EtOH+PR군은 EtOH군에 비해 상대적으로 근육 무게 감소의 회복이 관찰되었으나 세 군에서 모두 유의성 있는 차이를 나타내지는 못하였다.

Plantaris의 경우에는 Normal군에서 129.6 ± 3.4 mg/100 g, EtOH군에서는 114.5 ± 2.4 mg/100 g로 측정되어 EtOH군에서 Normal군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다($P < 0.01$). EtOH+PR군에서는 120.3 ± 2.3 mg/100 g으로 측정되어 EtOH군에 비해 상대적으로 근육 무게 감소의 회복이 관찰되었으나 유의성 있는 변화는 아니었다(Table II).

4. 근육섬유의 단면적 변화

근육 무게의 변화에서 알콜 투여로 인한 뚜렷한 변화를 보인 gastrocnemius와 plantaris의 근육세포를 H&E 염

Table II. Muscle Weights of Gastrocnemius (GT), Soleus (SOL), Plantaris (PLT) in Rats of Normal, EtOH and EtOH+PR Groups (mg/100 g body weight)

Group	Normal	EtOH	EtOH+PR
GT	552.2 ± 6.4	$517.8 \pm 5.8^*$	$538.7 \pm 5.9^\dagger$
SOL	56.6 ± 1.3	52.8 ± 1.2	54.1 ± 1.1
PLT	129.6 ± 3.4	$114.5 \pm 2.4^*$	120.3 ± 2.3

Data shown as mean \pm S.E. were analysed by the Student's t-test.

* $p < 0.05$ compared with EtOH group, $^\dagger p < 0.01$ compared with Normal group.

색 후 현미경으로 관찰한 결과, gastrocnemius와 plantaris 모두 Normal군과 비교하여 EtOH군에서 근섬유의 위축이 발견되었으며(Fig. 2B, E), EtOH+PR군에는 회복되는 경향이 나타났(Fig. 2C, F).

실제, 영상분석을 통해 근섬유의 단면적을 비교한 결과에서도 gastrocnemius의 경우 Normal군에서 $5,745.8 \pm 178.3 \mu\text{m}^2$, EtOH군에서 $4,786.7 \pm 246.8 \mu\text{m}^2$ 로 측정되어 EtOH군이 Normal군에 비해 근섬유 단면적 감소에 유의성 있는 변화가 나타났(p < 0.01). 반면, EtOH+PR군에서는 $5,425.8 \pm 146.3 \mu\text{m}^2$ 로 측정되어, EtOH군에 비해 근섬유 단면적 감소에 유의성 있는 회복이 나타났(p < 0.05, Table III).

Plantaris의 경우에는 Normal군에서 $4,551.7 \pm 133.6 \mu\text{m}^2$, EtOH군에서 $4,055.4 \pm 127.1 \mu\text{m}^2$ 로 측정되어 EtOH군이 Normal군에 비해 근섬유 단면적의 유의성 있는 감소가 관찰되었다(p < 0.05). EtOH+PR군에서는 $4,351.1 \pm 138.9 \mu\text{m}^2$ 로 EtOH군에 비해 단면적 감소가 회복되는 경향을 나타냈으나 유의성 있는 변화는 아니었다(Table III).

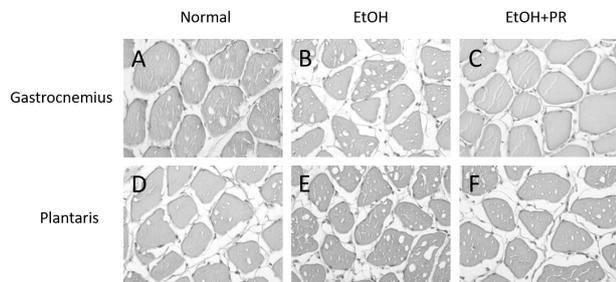


Fig. 2. Representative hematoxylin & eosin stained of gastrocnemius and plantaris muscles in Rats of Normal, EtOH and EtOH+PR Groups. EtOH group displayed a significant reduction in average cross section area of gastrocnemius and plantaris muscles compared to Normal group. The muscle fiber of rats in EtOH+PR group was recovered to compared with EtOH group (Magnification, $\times 400$).

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

Group	Normal	EtOH	EtOH+PR
GT	$5,745.8 \pm 178.3$	$4,786.7 \pm 246.8^*$	$5,425.8 \pm 146.3^\dagger$
PLT	$4,551.7 \pm 133.6$	$4,055.4 \pm 127.1^\#$	$4,351.1 \pm 138.9$

Data shown as mean \pm S.E. were analysed by the Student's t-test. *p < 0.01 compared with Normal group, † p < 0.05 compared with EtOH group.

5. 면역조직화학적 염색

면역조직화학적 염색법을 통해 gastrocnemius에서의 BAX와 Bcl-2 단백질의 발현변화를 관찰한 결과, BAX단백질의 경우 EtOH군에서 Normal군에 비해 뚜렷하게 발현이 증가한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3B). 반면, EtOH+PR군에서는 EtOH군에 비해 상대적으로 발현이 감소되었다(Fig. 3C). 양성반응 세포수를 측정하여 수치화한 결과에서도 Normal군에서는 단위면적 당 평균 26.1 ± 3.6 개/ $10^5 \mu\text{m}^2$, EtOH군에서 40.4 ± 3.0 개/ $10^5 \mu\text{m}^2$ 로, EtOH군이 Normal군에 비해 면역 양성 반응세포가 유의성 있게 증가하였으며(p < 0.01), EtOH+PR군에서는 31.5 ± 2.4 개/ $10^5 \mu\text{m}^2$ 로 EtOH군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(p < 0.05, Table IV).

Bcl-2 단백질의 경우에는 현미경으로 관찰한 결과에서 EtOH군이 Normal군에 비해 발현이 약간 증가되는 경향을 보였으나(Fig. 3E), EtOH+PR군에서는 뚜렷이 증가되

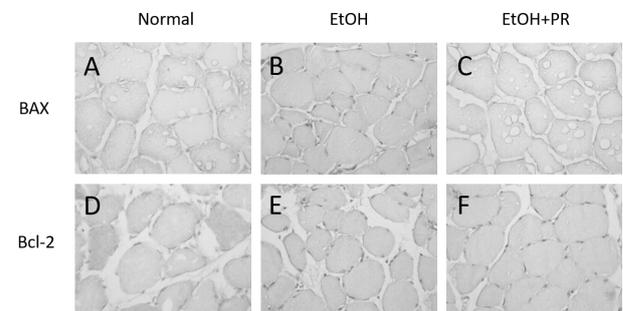


Fig. 3. Representative photographs of BAX & Bcl-2 immunoactivities of gastrocnemius muscles in Rats of Normal, EtOH and EtOH+PR Groups. The increased level of BAX protein was observed in the EtOH group. Whereas, the expressions of BAX protein in EtOH+PR group were decreased significantly compared with EtOH group. Whereas, the Bcl-2 expression of EtOH+PR group was increased in comparison with EtOH group (Magnification, $\times 400$).

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

Group	Normal	EtOH	EtOH+PR
BAX	26.1 ± 3.6	$40.4 \pm 3.0^*$	$31.5 \pm 2.4^\dagger$
Bcl-2	40.8 ± 1.4	46.3 ± 3.0	$54.9 \pm 2.6^\dagger$

Data shown as mean \pm S.E. were analysed by the Student's t-test. *p < 0.01 compared with Normal group, † p < 0.05 compared with EtOH group.

는 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 3F). 정량화한 결과에서도 면적 양성 세포수는 Normal군에서 평균 40.8 ± 1.4 개/ $10^5 \mu m^2$, EtOH군에서 46.3 ± 3.0 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 Normal군과 EtOH군 간에 유의성 있는 차이를 나타내지는 못하였으나, EtOH+PR군에서는 54.9 ± 2.56 개/ $10^5 \mu m^2$ 로 측정되어 EtOH군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다($p < 0.05$, Table IV).

고찰»»»»

알콜성 근위축(alcoholic myopathy)은 대다수의 알콜 중독 환자들에게서 관찰되는 근육의 변화로 일부 환자에게는 전체 골격근의 30% 이상이 손상되며 근력의 손실을 동반한다. 한의학에서는 알콜에 의한 근육손상에 대해 〈黃帝內經·素問〉에 “酒入於胃 … 精氣竭, 則不營其四肢也”²¹⁾라 하여 알콜섭취가 신체근육에 영향을 미치게 된다고 하였다. 본 연구에서는 Lieber-Decarli model²²⁾을 이용하여 흰쥐에 4주간 에탄올을 경구 투여함으로써 알콜성 근위축을 유발하였는데, 그 결과 알콜을 투여한 EtOH군이 Normal군에 비해 4주후에 체중의 증가량이 유의성 있게 감소되었다. 이러한 결과는 이전의 선행연구결과 뿐만 아니라 임상에서의 관찰결과와도 일치하는 것으로, 체중 감소의 원인은 영양불균형 및 체내 단백질 감소 때문인 것으로 사료된다²³⁾. 4주간 알콜투여 후 葛根 물추출물을 경구투여한 EtOH+PR군의 경우에서도 EtOH군과 마찬가지로 전체 실험기간동안 Normal군에 비해 체중이 감소되는 경향을 나타내었다. 그러나, EtOH군에 비해서는 체중 감소가 회복되었으나 유의성 있는 변화는 아니었다.

알콜이 체내에 흡수되면 일차적으로 간에 영향을 미치게 되는데, 이를 확인하는 다양한 지표들이 존재한다. 그 중에 혈청 amino-transferase는 심장, 간, 근육, 혈구 등에 다량 존재하며, 조직이 손상되면 혈중으로 유리되어 활성이 증가하므로, 혈중 AST (GOT)와 ALT (GPT)는 간질환의 진단에 이용되는 중요한 지표이다²⁴⁾. 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 있다²⁵⁾. 본 연구에서 4주간의 알콜 투여 후 AST 및 ALT의 수치가

EtOH군에서 모두 Normal군에 비해 유의성 있는 급격한 상승이 나타났는데, 이는 알콜로 인한 간 손상 유발물질이 간의 대사에 이상을 초래하고 간세포를 손상시킨 것으로 볼 수 있다. 알콜을 투여한 후 葛根 추출물을 경구투여한 EtOH+PR군에서는 AST와 ALT의 수치가 EtOH군에 비해 감소되는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 葛根이 다양한 독성물질에 의한 간질환에 보호효과가 있으며, 특히 알콜섭취로 인한 간질환에 유의한 방어효과가 있다는 이전 연구 결과와도 일치하는 결과이다.

알콜을 다량 섭취하게 되면 근육세포에서 단백질 합성이 감소되어 근육량의 줄어들게 되는데, 특히 Type II 근섬유에는 알콜로 인한 근육 위축이 뚜렷이 나타나는 반면, Type I 근섬유에는 상대적으로 영향이 적은 편으로 알려져 있다⁴⁾. 본 연구에서는 4주간의 만성적인 알콜섭취로 인한 근육의 변화를 알아보기 위하여 전체근육계통 변화의 지표로 자주 사용되는 비복근(gastrocnemius), 가자미근(soleus) 및 족척근(plantaris) 세 종류의 근육을 관찰하였다. Soleus에는 Type I 근섬유가 많이 존재하며 gastrocnemius와 plantaris에는 Type II 근섬유가 많이 존재하므로, 일반적으로 Type I 근섬유의 변화를 관찰하기 위해서는 soleus, Type II 근섬유를 관찰하기 위해서는 gastrocnemius와 plantaris 근육을 측정한다. 흰쥐에서 4주간의 알콜 투여 후 이 세 종류의 근육무게를 측정할 결과, gastrocnemius와 plantaris 근육이 Normal군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다. Soleus 근육 또한 Normal군에 비해 감소된 결과는 나타내었으나 유의성 있는 변화는 아니었다. 이러한 결과는 만성적인 알콜 투여로 인해 Type II 근섬유가 다량 존재하는 gastrocnemius와 plantaris가 유의성 있는 감소를 나타낸 것으로 해석할 수 있다. EtOH+PR군도 EtOH군과 마찬가지로 알콜 섭취로 인해 세 근육의 무게가 모두 감소되었으나, EtOH군에 비해서는 감소폭이 적은 것으로 확인되었다. 특히 gastrocnemius는 유의성 있는 회복을 나타내었는데, 이러한 결과는 같은 추출물이 알콜 섭취로 인한 근육량 감소에 유의한 보호효과가 있음을 나타내는 것이라 할 수 있다.

근육무게의 변화 뿐 아니라 근섬유의 변화를 측정하기 위해, 본 연구에서는 알콜 투여로 인해 유의성 있는 변화를 일으킨 gastrocnemius와 plantaris 근육을 H&E 염색 후 평균 단면적 측정하였다²⁶⁾. 그 결과, gastrocnemius와 plantaris 모두에서 EtOH군이 Normal군에 비해 근육 단

면적에 유의성 있는 감소가 나타났다. 이러한 결과는 알콜 투여로 인한 근육무게의 감소가 단백질 합성 저하로 인한 근육량의 감소에 기인한 것임을 보여주는 것이며 특히 Type II 근섬유가 다량 존재하는 근육에 주로 영향을 미친다는 이전 결과와도 일치하는 것이다. EtOH+PR군에서는 gastrocnemius와 plantaris 모두 Normal군에 비해 단면적 감소가 회복되는 결과를 나타내는데, 특히 gastrocnemius에서는 통계적으로 유의성 있는 회복이 관찰되었다. 이러한 결과는 葛根이 만성적인 알콜 섭취로 인한 근섬유 위축에 유의한 방어효과가 있음을 나타내는 것이라 할 수 있다. 또한 좌골 신경 손상에 의한 근위축에 葛根이 보호효과를 가진다는 이전 연구결과 및 마우스의 비만 모델에서 葛根이 근위축을 감소시켰다는 연구결과와 비교해 볼 때, 비록 질병과 동물모델의 차이점은 있으나 같은 다양한 원인에 의한 근위축에 방어효과가 있다는 점에서 관련성을 가진다고 할 수 있겠다.

앞서 언급한 바와 같이 만성적인 알콜 섭취로 인한 근위축의 기전에서 apoptosis가 관여하고 있음이 밝혀졌는데, 본 연구에서는 apoptosis 발생 여부와 그 정도를 확인하기 위하여 pro-apoptotic protein인 BAX와 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 발현 변화를 관찰하였다. 특히 알콜에 의한 단백질대사의 이화작용에 민감한 것으로 알려져 있으며²⁷⁾, 위의 실험결과 근육 무게 및 단면적 변화에서 유의성 있는 감소를 나타낸 gastrocnemius 근육세포에서 BAX와 Bcl-2의 발현을 측정하여 수치화 하였다. 그 결과, BAX와 Bcl-2 모두 EtOH군에서 Normal군에 비해 발현이 증가하였다. 특히 BAX의 경우 유의성 있는 뚜렷한 증가가 관찰된 반면 Bcl-2의 증가량은 이보다는 적은 편이어서 유의성 있는 변화는 나타내지 못했다. 이러한 결과는 만성적인 알콜 투여 후 BAX와 Bcl-2의 발현이 증가한다는 이전 연구결과와도 일치하는 것으로²⁸⁾, 알콜 섭취로 인해 근육 내에서 apoptosis가 유발되었음을 보여주는 것이라 할 수 있다. EtOH+PR군에서는 BAX의 경우 EtOH군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났으며, 반면에 Bcl-2의 경우에는 EtOH군에 비해 오히려 유의성 있는 증가가 나타났다. 이는 葛根이 알콜 섭취로 유발된 근육에서의 apoptosis에서 이를 촉진하는 BAX 단백질의 발현을 감소시키는 동시에, apoptosis를 억제하는 Bcl-2 단백질을 증가 시킴으로써 결과적으로 apoptosis를 억제하는 효과를 나타낸 것으로 생각할 수 있다. 이를 통해 알콜로 유발되는 근

위축을 감소시키는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 앞서 흰쥐의 혈관사이세포(mesangial cell)에서의 apoptosis에 미치는 영향 및 葛根의 isoflavonoid 성분들이 apoptosis를 억제한다는 이전 연구결과와도 관련이 있다고 할 수 있다.

본 연구의 결과들을 종합하면 葛根 물추출물은 알콜로 발생하는 간손상 뿐만 아니라 근위축에도 상당한 방어효능이 있음을 알 수 있다. 특히 葛根이 알콜로 인한 간손상에 미치는 보호효과에 관해서는 이전에 많은 임상적·실험적 연구가 시행되었으나, 알콜성 근위축에 대한 보호효과에 관해서는 최초의 시도라 할 수 있다. 다만 본 연구에서는 葛根의 물추출물의 효과만을 검증하였는데, 이후 연구를 통해 다른 형태의 추출물 혹은 葛根 유효성분의 효과 또한 검증할 필요가 있으며, 근위축의 기전 중에 관여하는 성장인자나 호르몬 단백질 변화도 추후 검증할 필요가 있다고 사료된다. 또한, 한의학에서는“肝主筋”이라 하여 근육이 肝의 기능을 외부로 발현하는 생리기능계통으로 여겨지고 있는데²⁹⁾, 본 연구에서는 解酒毒의 효능을 가진 葛根이 알콜로 인한 肝손상뿐 아니라 근육질환에도 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과는 肝과 근육의 관련성을 좀 더 구체적으로 밝히려는 노력 중에 하나의 과정이라 할 수 있으며, 이를 통해 한의학 기초이론의 실험적 입증 뿐 아니라 근골격계통 질환에 대한 한방 치료에서 다양한 임상적 활용이 가능하리라 기대해 본다.

결론»»»»

본 연구는 4주간의 알콜 투여로 유발된 근위축 손상에서 葛根이 미치는 보호효과를 관찰한 것으로, 흰쥐에 EtOH 투여 후 葛根 물추출물을 경구투여하고 4주후 체중 변화, 간에서의 AST, ALT 수치 변화 및 종아리 근육의 무게, 근섬유와 apoptosis 관련단백질 변화를 측정한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

葛根은 장기간의 알콜섭취로 인한 체중감소를 회복시켜주는 효과가 있었으며, 간에서의 AST 및 ALT의 상승을 유의성 있게 감소시켰다. 또한, 알콜섭취로 유발된 종아리 근육 무게 감소와 근섬유의 단면적 감소에 보호효과가 있었으며, 특히 gastrocnemius의 근육무게 감소와 근섬유 단면적 감소에 유의성 있는 방어효과를 나타내었다. gastrocnemius에서 apoptosis 관련 단백질인 BAX와 Bcl-2의

발현변화를 관찰한 결과에서는 BAX의 유의성 있는 감소와 Bcl-2의 유의성 있는 증가가 나타났다. 따라서, 알콜성 근위축에 대한 葛根의 이러한 방어효과는 BAX의 발현 억제와 Bcl-2의 발현 촉진에 의한 것으로 생각된다. 이와 같은 결과로 葛根은 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):549-55.
- 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):677-87.
- Preedy VR, Paice A, Mantle D, Dhillon AS, Palmer TN, Peters TJ. Alcoholic myopathy: biochemical mechanisms. *Drug Alcohol Depend*. 2001;63(3):199-205.
- Martin F, Ward K, Slavin G, Levi J, Peters TJ. Alcoholic skeletal myopathy, a clinical and pathological study. *Q J Med*. 1985;55(218):233-51.
- Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol*. 2002;27(1):63-8.
- Urbano-Marquez A, Fernandez-Sola J. Effects of alcohol on skeletal and cardiac muscle. *Muscle Nerve*. 2004; 30(6):689-707.
- 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):553-60.
- Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*. 1997;3(6):614-20.
- Lee SI. *Herbology*. Seoul: Eui Hak Sa; 1997:65-6.
- Kim HC. *Herbal pharmacology*. Seoul: Jip Moon Dang; 2001:92-4.
- Wang S, Shi XL, Feng M, Wang X, Zhang ZH, Zhao X, Han B, Ma HC, Dai B, Ding YT. Puerarin protects against CCl₄-induced liver fibrosis in mice: possible role of PARP-1 inhibition. *Int Immunopharmacol*. 2016;38:238-45.
- Li R, Liang T, He Q, Guo C, Xu L, Zhang K, Duan X. Puerarin, isolated from Kudzu root (Willd.), attenuates hepatocellular cytotoxicity and regulates the GSK-3 β /NF- κ B pathway for exerting the hepatoprotection against chronic alcohol-induced liver injury in rats. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(1):71-8.
- Chen X, Li R, Liang T, Zhang K, Gao Y, Xu L. Puerarin improves metabolic function leading to hepatoprotective effects in chronic alcohol-induced liver injury in rats. *Phytomedicine*. 2013;20(10):849-52.
- Kim HB, Kang KH, Hwang WD, Lyu SA, Lee SY. The Effects of Puerariae Radix on Allergic Inflammation. *J Korean Oriental Pediatrics*. 2009;23(3):217-31.
- Jang SW, Kim YS. Effect of Puerariae Radix on Hind Limb Muscle Atrophy of Sciatic Nerve Transected Rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2009;23(2):405-11.
- Hong JE, Shin JY, Ju SM, Jeon BH, Lee SH. Effects of Puerariae Radix extract on Cisplatin-Induced Apoptosis of Rat Mesangial Cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2010;24(2):220-7.
- Gao Y, Wang X, He C. An isoflavonoid-enriched extract from Pueraria lobata (kudzu) root protects human umbilical vein endothelial cells against oxidative stress induced apoptosis. *J Ethnopharmacol*. 2016;193:524-30.
- Jung HW, Kang AN, Kang SY, Park YK, Song MY. The Root Extract of Pueraria lobata and Its Main Compound, Puerarin, Prevent Obesity by Increasing the Energy Metabolism in Skeletal Muscle. *Nutrients*. 2017;9(1):1-13.
- Fujii H, Ohmachi T, Sagami I, Watanabe M. Liver microsomal drug metabolism in ethanol-treated hamsters. *Biochem Pharmacol*. 1985;34(21):3881-4.
- 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): 842-8.
- Lee SI. *Herbal Formula Science*. Seoul: Young Lim Sa; 1990:97.
- Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology*. 1989;10(4):501-10.
- Mezey E. Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *Am J Clin Nutr*. 1980;33(12):2709-18.
- Woods SE, Hitchcock M, Meyer A. Alcoholic hepatitis. *Am Fam Physician*. 1993;47(5):1171-8.
- Herlong HF. Approach to the patient with abnormal liver enzymes. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1994;29(11):32-8.
- Otis JS, Guidot DM. Procyte stimulates expression of key anabolic factors and reduces plantaris atrophy in alcohol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33(8):1450-9.
- 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):887-98.
- 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):1182-9.
- Shin MK, Hong MC, Ryu DG, Kwon KB, Kim KJ, Kwon YK et al. *Oriental Medical Physiology*. Seoul:Jip Moon dang 2008:217.