

# 흰쥐의 불용성 근위축에 당귀보혈탕이 미치는 영향과 그 기전에 관한 고찰

김범희

동의대학교 한의과대학 해부학교실, 동의대학교 한의학연구소

## The Protective Effects of *Dangguibohyul-tang* (*Dangguibuxuetang*) against Disuse 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

이 논문은 2017학년도 동의대학교  
교내연구비에 의해 연구되었음(과제번호  
201702620001).

RECEIVED September 14, 2017  
REVISED September 28, 2017  
ACCEPTED September 29, 2017

### CORRESPONDING TO

Bum Hoi Kim, Department of  
Anatomy, College of Korean  
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

**Objectives** Oxidative stress, in which antioxidant proteins and scavenger protection are overwhelmed by reactive oxygen species (ROS) production, is recognized as one of central causes of disuse muscle atrophy. In this study, the hypothesis that oral treatment with *Dangguibohyul-tang* (*Dangguibuxuetang*) could attenuate immobilization-induced skeletal muscle atrophy was tested.

**Methods** The hindlimb immobilization was performed with casting tape to keep the left ankle joint in a fully extended position. The Rats in *Dangguibohyul-tang* treated group (DGBHT) (n=10) were orally administrated *Dangguibohyul-tang* water extract, and rats of Control group (n=10) were given with saline only. After 2 weeks of immobilization, the morphology of right and left gastrocnemius muscles in both DGBHT and Control groups were assessed by hematoxylin and eosin staining.

**Results** *Dangguibohyul-tang* water extract represented the significant protective effects against the reductions of the left gastrocnemius muscles weight and average cross section area to compared with Control group. Moreover, the treatment with *Dangguibohyul-tang* extract significantly enhanced the Cu/Zn-SOD activities in gastrocnemius muscle compared with Control group.

**Conclusions** Thses results suggest that *Dangguibohyul-tang* has protective effects against immobilization-induced muscle atrophy by increasing the Cu/Zn-SOD activities in gastrocnemius muscle. (**J Korean Med Rehabil 2017;27(4):1-9**)

**Key words** Disuse muscle atrophy, *Dangguibohyul-tang*, Gastrocnemius, Reactive oxygen species (ROS), Superoxide dismutase (SOD)

## 서론»»»»

오랜 기간의 침상생활이나 물리적 운동부족 등에 의한 근육량의 손실과 기능의 저하는 삶의 질의 저하 뿐 아니라 노령 환자의 사망률을 증가시키는 원인이 되기도 한다<sup>1)</sup>. 불용성 근위축(disuse muscle atrophy)이란 근육의 불사

용 혹은 기능저하에 의해 근육이 위축되는 것을 말한다<sup>2)</sup>. 오랜 기간 근육을 사용하지 않게 되면 전신적으로 최대 산소소모량, 심박출량, 정맥환류, 심근수축력 및 혈액용적이 감소하며 국소적으로 근위축이 초래된다. 이러한 근위축은 주로 하지의 근육에서 뚜렷하게 나타나는 것으로 알려졌다<sup>3)</sup>. 이전의 동물실험 연구결과에 따르면, 불용성 근

위축 손상은 주로 여러 근섬유 유형이 혼합된 근육에서 유발되는데, 예를 들어 slow와 fast myosin-heavy chain 을 모두 가지고 있는 gastrocnemius에서 흔히 나타나는 것을 볼 수 있다<sup>4)</sup>. 이러한 근육 불사용으로 유발되는 근 위축은 단백질 합성의 저하와 동시에 단백질 분해의 촉진에 의해 발생한다. 많은 요인들이 이러한 단백질 생성과 분해의 불균형의 원인이 되는 것으로 여겨지고 있는데, reactive oxygen species (ROS)의 생성에 의해 항산화 단백질이 감소되고 scavenger protection 기능이 저하되어 oxidative stress가 유발되는 것이 불용성 근위축 손상의 주요한 원인인 것으로 밝혀졌다<sup>5,6)</sup>. 나이가 ROS의 과도한 생성은 DNA fragmentation, lipid peroxidation과 protein oxidation을 일으키며 결과적으로 세포의 apoptosis를 유발할 수 있다<sup>7,8)</sup>. 따라서 ROS는 장기적인 근육의 불사용 기간 동안 근육위축을 일으키는 signaling pathway의 중요한 인자가 될 수 있으며, 이러한 ROS의 과도한 생성을 억제하는 것이 불용성 근위축을 막는 치료전략이 된다. 이전의 많은 연구들을 통해 항산화 효과를 지닌 다양한 약제들이 불용성 근위축의 치료제로써 제시되어 왔다<sup>9,12)</sup>. 하지만, 실제 불용성 근위축을 억제하는 효능을 가진 것으로 밝혀진 것은 아직 많지 않은 것이 사실이다.

당귀보혈탕(當歸補血湯)은 李東垣의 <內外傷辨惑論>에 처음 수록된 처방으로 補氣補血의 효능을 가지고 있다<sup>13)</sup>. 처방구성은 당귀와 황기가 1:5의 비율로 구성되어 있으며, 이전 연구를 통해 항산화 효과<sup>14,15)</sup>, 피부의 항염 효과<sup>16)</sup>, 뼈형성과 신생혈관 형성에 대한 효과<sup>17)</sup> 그리고 근육피로<sup>18)</sup> 등에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 당귀보혈탕의 구성 단미(單味)인 당귀(當歸)에 대한 연구로는 항염증<sup>19)</sup> 및 항산화<sup>20)</sup> 효과, 근육피로에 대한 보호효과<sup>21)</sup> 등이 보고되었으며, 황기(黃芪)에 대한 연구로는 항산화 효과<sup>22)</sup>, 허혈성 손상에서의 신생혈관생성 촉진<sup>23)</sup>, 지질과산화 억제<sup>24)</sup>, 근육피로에 대한 개선효과<sup>25)</sup> 및 근위축에 대한 방어 효과<sup>26)</sup> 등이 보고되었다.

본 연구에서는 불용성 근위축에 당귀보혈탕이 미치는 영향을 살펴보기 위하여 2주간 흰쥐에 오른쪽 뒷다리의 발목관절을 casting tape로 고정시키고 당귀보혈탕 물추출액을 경구 투여한 후 체중변화, 근육의 무게, 근섬유의 변화를 측정하였다. 또한 산화적 손상(oxidative stress)과 연관된 지표들의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 불용성 근위축에 당귀보혈탕이 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 20마리를 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: R2017-002).

### 2. 약물의 제조와 실험군의 분리

본 연구에 사용된 당귀보혈탕은 동의대학교 한방병원을 통해 구입하였다. 당귀보혈탕 1첩분량인 240 g을 증류수 2 L와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과액을 감압농축하여 동결건조시켜 물추출액이 56.8 g을 얻었다(Table I). 투여량은 60 kg 일반 성인의 하루 3첩 복용량으로 환산하여, 흰쥐 체중 100 g당 236.7 mg을 음용수에 녹여 경구 투여하였다.

실험군의 분리는 흰쥐를 무작위로 10마리씩 나누어 당귀보혈탕을 투여하는 DGBHT군과 동일량의 생리식염수를 투여한 Control군으로 분리하였으며, 물과 사료는 모든 군에서 전체 실험기간 동안 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

**Table I.** Herbal Composition of Dangguibohyul-tang (Dangguibuxuetang)

Herb name	Scientific name	Weight (g)
當歸	<i>Angelica sinensis</i>	40
黃芪	<i>Astragalus membranaceus</i>	200
Total amount		240

### 3. 불용성 근위축(disuse muscle atrophy) 유발<sup>27)</sup>

흰쥐에서의 만성 불용성 근위축을 유발하기 위해 흰쥐의 왼쪽 발목관절을 완전히 신전(extension)시킨 후 casting tape (type 82002A, 3M, USA)를 이용하여 발목관절을 움직이지 못하게 하였다. Casting tape는 일주일 동안 씩 교체하였으며, 오른쪽 발목에는 아무런 처치도 하지 않아서 자유롭게 움직일 수 있게 하였다. DGBHT에는 매일 오전 정해진 시간에 당귀보혈탕 추출물을 1회 경구 투여 하였으며, Control군에는 동일량의 생리식염수를 같은 방식으로 투여하였다.

### 4. 체중측정 및 근육 중량의 변화

실험동물의 체중은 실험기간동안 매일 오전 정해진 시간에 측정하였으며, 실험 마지막 날에는 부검 직전에 측정하였다. 실험 개시 2주 후 실험동물을 안락사 시킨 후 부검을 통해 실험동물의 오른쪽 후지로부터 gastrocnemius를 분리 채취하여 중량을 측정하였다. 근육의 무게는 실험동물의 체중을 측정한 다음 체중 100 g당 근육 무게를 계산하였다.

각 실험군별 gastrocnemius의 근육위축의 정도는 아래 계산식으로 측정하였다<sup>28)</sup>.

$$\text{근위축비율(\%)} = \frac{\text{우측 근육 중량} - \text{좌측 근육 중량}}{\text{우측 근육 중량}} \times 100$$

이후 근육조직은 근육의 중앙부분에서 약 3~5 mm 정도 두께로 절편하여 -50°C의 dry ice-isopentane 용액으로 동결시키고 -80°C에서 보관하였다.

### 5. 해부조직학적 관찰 및 근육단면적 측정

동결보관된 근육조직 중에 gastrocnemius의 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 측정하였다<sup>20)</sup>. 각 실험군의 근섬유의 평균 면적은 각각의 근육조직의 최소 30개 이상의 근섬유를 관찰함으로써 측정하였다.

### 6. 과산화지질(MDA) 함량 측정

실험군과 대조군의 실험동물에게서 채취된 양측 gastrocnemius를 10% phosphate buffer (pH 7.0)에 균질화시킨 후, 4°C에서 10분간 원심분리(10,000×g)하여 상층액을 분리하였다. Butylated hydroxytoluene, phosphoric acid, TBA reagent와 혼합하여, 60°C 배양기에 1시간 동안 배양시킨 후, 650 μl BuOH을 주입하였다. 상온에서 3분간 원심분리(10,000×g)한 후, BuOH 분획물 520 μl에 1N sodium hydroxide (NaOH) 650 μl을 주입하고, 다시 NaOH 분획물 520 μl을 채취하여 3.7M phosphoric acid 130 μl을 첨가하였다. 흡광도는 532 nm에서 측정하였으며, MDA 함량은 각 gastrocnemius 중량에 비례하여 산출하였으며 측정치는 gastrocnemius 무게의 1 gam 당 nmol MDA로 표시하였다.

### 7. 항산화효소(SOD) 활성도 측정

실험군과 대조군의 양측 gastrocnemius를 9% sucrose buffer (0.25 M sucrose, 10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA)에 균질화시킨 후, 4°C에서 10분간 원심분리(10,000×g)하여 상층액을 분리하였다. 균질액 300 μl에 0.06 U/ml xanthine oxidase, 6 mM xanthine, 60 M cytochrome c를 혼합하여 최종용량이 1.6 ml이 되게 하였다. 1 mM KCN을 첨가하여 mitochondrial Mn-SOD isoform로부터 cytosolic Cu,Zn-SOD isoform을 분리하였다. 흡광도는 550 nm에서 측정하였으며, SOD활성의 1 U은 흡광도에서의 50% 감소로 정의하였다.

### 8. 통계학적 분석

측정된 모든 자료는 student's t-test를 사용하여 p < 0.05 및 p < 0.01의 유의수준으로 검증하였다. 모든 값의 수치는 평균±표준오차(mean±standard error)로 표시하였다.

## 결과»»»»

### 1. 체중의 변화

2주간의 실험기간동안 모든 실험군에서 시간이 지남에 따라 체중이 점차 증가하는 양상이 나타났다. 실험 개시 당시 각 군별 흰쥐의 평균체중은 Control군에서 244.1±1.7 g, DGBHT군에서 242.0±1.1 g이었으며, 2주 후 마지막으로 측정된 체중은 Control군에서 347.2±11.4 g, DGBHT군에서 352.4±14.3 g으로 두 군간에 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다.

### 2. Gastrocnemius 근육 무게의 변화

실험 개시 2주 후 흰쥐의 양쪽 근육 gastrocnemius의 무게를 측정하고 체중 100 g당 근육 무게를 환산하여 비교하였다. 그 결과, Control군에서는 자유롭게 움직임이 가능하게 한 오른쪽 gastrocnemius 근육의 경우 521.6±7.2 mg/100 g로 측정된 반면, 발목관절을 붕대로 압박하여 움직이지 못하게 한 왼쪽의 경우 431.0±7.0 mg/100 g로 측정되어 유의성 있는 감소가 나타났다(p<0.01, Table II). 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 무게의 감소량은 18.3±0.8%로 계산되었다.

한편, 2주간 당귀보혈탕 추출물을 경구 투여한 DGBHT군의 경우는 아무런 처치를 하지 않은 오른쪽 gastrocnemius 근육의 무게가 522.3±5.1 mg/100 g로 측정되었다. 그에 비해 ankle joint를 압박한 왼쪽의 경우는

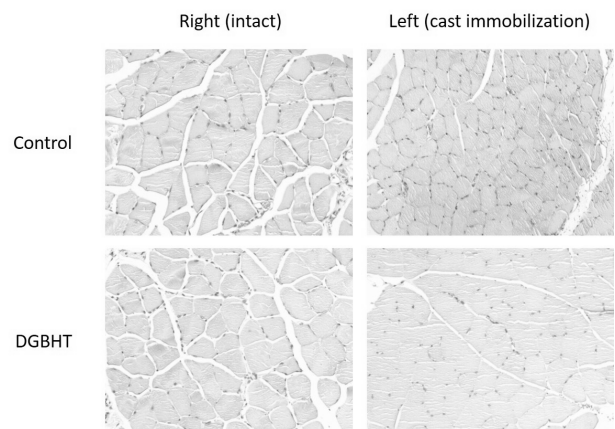
442.3±5.1 mg/100 g로 측정되어 Control군과 마찬가지로 유의성 있는 중량의 감소가 확인되었다(p<0.01, Table II). 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 무게의 감소량을 계산하였을 경우 15.5±0.7%로 관찰되었다.

Control군과 DGBHT군의 근육감소량을 비교해 보면 DGBHT군이 Control군에 비해 근육위축이 회복된 결과를 보였으며, 통계적으로도 유의성 있는 변화를 나타냈다(p<0.05, Table II).

### 3. 근육 단면의 해부조직학적 변화

2주간 흰쥐의 왼쪽 발목관절을 고정시킨 후 gastrocnemius 근육을 채취하여 8 μm 두께로 냉동절편하여 H&E 염색을 통해 근육 단면을 관찰한 결과, Control군에서 왼쪽 gastrocnemius 근섬유의 크기가 오른쪽에 비해 감소된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 근섬유 주변에 핵(nucleus)의 응집이 다수 관찰되었는데, 이것은 근육 내 염증세포의 존재와 근육위성세포의 증식을 보여주는 것이라 할 수 있다.

발목관절을 고정시키고 2주간 당귀보혈탕을 투여한 DGBHT군의 경우에서도 Control군에서와 유사하게 근섬유 크기 감소가 확인되었으나, Control군에 비해 감소가 상대적으로 적은 편이었으며 핵의 응집도 줄어든 양상이었다(Fig. 1).



**Fig. 1.** The cast immobilization decreased myofibers of gastrocnemius in both Control and DGBHT groups. The accumulation of nuclei around the myofibers was observed, suggesting the presence of inflammatory cells. However, the reduction of left myofibrils in the DGBHT group was recovered to compared with that of the Control group.

**Table II.** Effect of DGBHT on Gastrocnemius Weights in Disuse Muscle Atrophy (mg/100 g)

Group	Right (intact)	Left (disuse)	Atrophy ratio (%)
Control	521.6±7.2	426.0±5.0**	18.3±0.8
DGBHT	522.3±5.1	441.5±5.2**	15.5±0.7 <sup>†</sup>

The cast immobilization of left hindlimb resulted in significant reduction of gastrocnemius weight in both Control and DGBHT groups. The mean weight of left gastrocnemius in the DGBHT group was recovered to compared with that of the Control group. The mean ratio of left gastrocnemius to right in the DGBHT group was also significantly recovered to compared with that of the Control group.

\*\*p<0.01 compared with right gastrocnemius. <sup>†</sup>p<0.05 compared with Control group.

#### 4. 근육섬유의 단면적 크기의 변화

해부조직학적 관찰에서 근섬유의 감소가 확인된 gastrocnemius 근육 단면적의 변화를 현미경 하에서 관찰하고 수치화하였다. 영상분석을 통해 근섬유의 단면적을 비교한 결과, Control군에서는 자유롭게 움직임이 가능하게 한 오른쪽 gastrocnemius 근육의 경우  $4,576.3 \pm 67.2 \mu\text{m}^2$ 로 측정된 반면, 발목관절을 붕대로 압박하여 움직이지 못하게 한 왼쪽의 경우  $3,726.1 \pm 82.1 \mu\text{m}^2$ 로 측정되어 유의성 있는 감소가 나타났다( $p < 0.01$ , Table III). 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 단면적의 평균 감소량은 18.6%로 계산되었다.

2주간 당귀보혈탕 추출물을 경구투여한 DGBHT군의 경우는 아무런 처치를 하지 않은 오른쪽 gastrocnemius 근육의 단면적은  $4,586.3 \pm 110.5 \mu\text{m}^2$ 로 측정되었다. 발목관절을 압박한 왼쪽의 경우는  $3,978.5 \pm 84.6 \mu\text{m}^2$ 로 측정되어 Control군과 마찬가지로 유의성 있는 감소가 확인되었다( $p < 0.01$ , Table III). 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 단면적의 평균 감소량을 계산하였을 경우 13.1%로 관찰되었다.

Control군과 DGBHT군의 근육단면적이 감소를 비교해 보면 DGBHT군이 Control군에 비해 근육위축이 회복된 결과를 보였으며, 통계적으로도 유의성 있는 변화를 나타냈다( $p < 0.01$ , Table III).

#### 5. Malondialdehyde (MDA) 함량 변화

흰쥐의 왼쪽 발목관절을 2주간 붕대고정시킨 후 실험

**Table III.** Effect of DGBHT on Cross Sectional Area of Gastrocnemius in Disuse Muscle Atrophy ( $\mu\text{m}^2$ )

Group	Right (intact)	Left (disuse)	Atrophy ratio (%)
Control	$4,576.3 \pm 67.2$	$3,726.1 \pm 82.1^{**}$	$18.6 \pm 0.7$
DGBHT	$4,586.3 \pm 110.5$	$3,978.5 \pm 84.6^{**}$	$13.1 \pm 0.6^{\dagger\dagger}$

The cast immobilization of left hindlimb resulted in significant reduction of Cross Sectional Area of Gastrocnemius in both Control and DGBHT groups. The mean Area of left gastrocnemius in the DGBHT group was recovered to compared with that of the Control group. The mean ratio of left gastrocnemius to right in the DGBHT group was also significantly recovered to compared with that of the Control group.

\*\* $p < 0.01$  compared with right gastrocnemius.  $\dagger\dagger p < 0.01$  compared with Control group.

동물을 희생하여 양측 gastrocnemius를 채취하여 Control군과 CGBHT군의 MDA함량을 분석한 결과, Control군의 경우 오른쪽은  $7.2 \pm 0.4 \text{ mmol/g weight}$ 로 측정되었으며 왼쪽은  $8.2 \pm 0.4 \text{ mmol/g weight}$ 로 측정되었다. DGBHT의 경우에는 오른쪽은  $7.3 \pm 0.6 \text{ mmol/g weight}$ , 왼쪽은  $8.1 \pm 0.5 \text{ mmol/g weight}$ 로 측정되어 Control군과 DGBHT군 모두에서 붕대고정을 시킨 왼쪽 후지에서 아무런 처치도 하지 않은 오른쪽에 비해 gastrocnemius에서의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 하지만, 두 군간의 비교에서 통계학적으로 유의성있는 변화를 나타내지는 않았다.

#### 6. SOD 활성 변화

실험동물의 양측 gastrocnemius를 채취하여 Control군과 CGBHT군의 Cu/Zn-SOD 활성을 측정된 결과, Control군의 경우 오른쪽은  $265.5 \pm 6.3 \text{ U/g weight}$ 로 측정되었으며 왼쪽은  $327.6 \pm 7.8 \text{ mmol/g weight}$ 로 측정되었다. DGBHT의 경우에는 오른쪽은  $267.2 \pm 9.3 \text{ mmol/g weight}$ , 왼쪽은  $349.8 \pm 6.6 \text{ mmol/g weight}$ 로 측정되어 Control군과 DGBHT군 모두에서 붕대고정을 시킨 왼쪽

**Table IV.** Effect of DGBHT on MDA Contents in the Gastrocnemius (mmol/g weight)

Group	Right (intact)	Left (disuse)
Control	$7.2 \pm 0.4$	$8.2 \pm 0.4$
DGBHT	$7.3 \pm 0.6$	$8.1 \pm 0.5$

There was no significant difference between Control and CGBHT groups.

**Table V.** Effect of DGBHT on Cu/Zn-SOD Activities in the Gastrocnemius (U/g weight)

Group	Right (intact)	Left (disuse)
Control	$265.5 \pm 6.3$	$327.6 \pm 7.8^{**}$
DGBHT	$267.2 \pm 9.3$	$349.8 \pm 6.6^{**\dagger}$

In Control and DGBHT groups, the cast immobilization of left hindlimb significantly increased Cu/Zn-SOD Activities in the Gastrocnemius. The Cu/Zn-SOD Activity of the left gastrocnemius was significantly enhanced to compared with that of the Control group.

\*\* $p < 0.01$  compared with right gastrocnemius.  $\dagger p < 0.05$  compared with Control group.

후지에서 아무런 처치도 하지 않은 오른쪽에 비해 gastrocnemius에서 Cu/Zn-SOD 활성이 현저히 증가하는 것으로 관찰되었다. Control군과 DGBHT군에서 봉대고정을 시행한 왼쪽 gastrocnemius의 변화를 비교한 결과에서는 DGBHT군에서의 Cu/Zn-SOD 활성이 Control군에 상대적으로 증가하여 유의성 있는 변화를 나타내었다.

## 고찰»»»»

불용성 근위축(disuse muscle atrophy)은 실험적으로 다양한 방법에 의해 유발될 수 있다. 대표적인 것이 신경 차단(denervation)<sup>29)</sup>, 꼬리매달기(tail suspension)<sup>32)</sup>, 봉대 고정(cast immobilization)<sup>27)</sup> 등의 방법이 있다. 신경차단은 신경기능의 변화가 발생하는 외과적 손상에 대한 병리를 연구할 때 유용한 방법이며, 꼬리매달기 방법은 체중 부하가 없는 상황에서 효과적인 동물모델로써 골격질량을 유지하면서 무중력에 의한 근위축을 연구하기 적합한 모델이다. 봉대고정의 방법은 임상에서 수술 후, 오랜 침상생활 혹은 노년층의 근육의 불사용 등에서 나타나는 불용성 근위축 등을 연구하기 위해 효과적인 방법이다. 본 연구에서는 불용성 근위축에 대한 당귀보혈탕의 보호효과를 검증하기 위해 Udaka J 등<sup>27)</sup>의 방법을 참고하여 봉대고정을 시행하였다. 그 결과, 2주간 왼쪽 발목관절에 봉대고정을 시행하고 각각 동일량의 saline과 당귀보혈탕 추출물을 투여한 Control군과 DGBHT군에서 실험동물의 체중변화는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(Table II). 하지만, gastrocnemius 근육중량의 비교에서 Control군이 봉대고정을 한 왼쪽 gastrocnemius의 중량이 자유롭게 움직임이 가능하게 한 오른쪽에 비하여 약 18.3% 감소되는 결과를 나타내었다(Table II). 종아리 뒤쪽에 위치한 gastrocnemius는 발목관절의 plantar flexion을 일으키는 주요 근육으로써, slow와 fast myosin-heavy chain을 모두 함유하고 있다. 다양한 근섬유 유형의 포함하고 있기 때문에 gastrocnemius에서 관찰된 결과들은 다른 근육들에게도 적용이 가능하므로 근위축 연구에 자주 사용되는 부위이다. 본 연구를 통해 2주간의 발목관절의 고정을 통해 gastrocnemius의 약화를 가져왔음을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 흰쥐의 뒷다리(hind limb)에 봉대고정 후 gastrocnemius 근육중량이 상대적으로 유의성

있게 감소되었다는 이전의 여러 연구결과들과도 일치하는 것이다<sup>3,4)</sup>. 한편, 봉대고정과 동시에 2주간 당귀보혈탕을 경구투여한 DGBHT의 경우는 근위축 비율이 15.5%로 Control군에 비해 감소된 결과를 보였다. 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 중량변화를 측정하기 위하여 Shibaguchi T 등<sup>28)</sup>의 방법에 따라 각각의 비율로 환산한 결과에서도 통계적으로 유의성 있는 변화를 나타냈다(Table II). 이러한 결과는 당귀보혈탕 투여가 불사용 근위축 손상에서 gastrocnemius 근육의 중량감소에 대해 유의한 보호효과를 가지고 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

이전의 연구결과들에서 실험동물의 뒷다리 고정에 의한 근육중량의 감소는 근육 내 근섬유의 감소를 동반한다고 보고되었다<sup>27)</sup>. 본 연구에서도 근위축이 일어난 각 실험군의 gastrocnemius를 채취하여 8 μm 두께로 냉동절편하여 H&E 염색을 통해 근육 단면을 관찰하고 단면적의 크기를 측정하여 비교한 결과, 현미경 하에서 관찰했을 때 Control군과 DGBHT군 모두에서 왼쪽 gastrocnemius 근섬유의 크기가 오른쪽에 비해 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 봉대고정을 시행한 왼쪽 근육만을 비교했을 경우에는 DGBHT군이 Control군에 비해 상대적으로 근섬유 크기의 감소가 적은 편이었으며 핵응집도 상대적으로 적게 관찰되었다. 절단면에서의 단면적의 크기를 측정하여 비교한 결과에서는 Control군에서는 봉대고정을 시행한 왼쪽에서 오른쪽에 비해 18.6%의 감소율을 나타내었다(Table III). 이러한 결과는 실험동물에 인위적인 불용성 근위축을 유발시킨 후, 종아리에 위치한 gastrocnemius, soleus, plantaris 근육의 근섬유의 단면적을 비교하였을 때 정상대조군에 비해 근육단면적의 크기가 현저히 감소되었다는 이전 연구결과<sup>4,27)</sup>와도 일치하는 것이다. 다만, 실험동물의 종과 환경에 따라 각 근육의 감소율은 상이하게 관찰되는 것으로 보고되었다. 당귀보혈탕을 투여한 DGBHT군에서는 gastrocnemius의 단면적 변화가 왼쪽이 오른쪽에 비해 13.1%의 감소율을 나타내었는데, 이는 Control군과 유의성 있는 차이를 보였다. 즉, 당귀보혈탕 투여는 근육의 불사용으로 인한 gastrocnemius의 중량 감소에 대한 보호작용 뿐 아니라, 그 속의 근섬유의 단면적 감소에도 유의한 방어효과를 가지고 있음을 보여주는 것이라 하겠다. 이러한 결과들은 당귀보혈탕이 장기간의 근육 불사용에 따른 gastrocnemius에서의 근육 단백질 감소를 억제함으로써 근섬유의 크기

감소를 줄이고 결국 중량 감소에 보호작용을 나타낸 것으로 사료된다.

골격근에서 단백질의 감소와 근섬유의 위축을 유발하는 가장 중요한 원인은 산화적 손상(oxidative stress)으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 산화적 손상이란 일반적으로 조직 안에서 산화분자(oxidized molecule)의 축적으로 인한 산화촉진제(pro-oxidant)와 항산화제(antioxidant)의 불균형으로 정의된다<sup>9)</sup>. 따라서 근육의 불사용은 산화적으로 변형된 단백질과 지질 등의 축적을 일으키고 이러한 산화적 손상은 근육 안에서의 항산화능(antioxidant capacity)의 감소와 reactive oxygen specie (ROS)의 생성 증가 때문에 발생하는 것으로 알려졌다<sup>6,12)</sup>. 즉, 오랜 기간 동안의 근육의 불사용은 근섬유에서의 ROS의 생성을 증가시키고, 이렇게 생성된 ROS는 다시 단백질 분해를 가속화시키고 새로운 단백질의 생성을 저해하게 되며 항산화 단백질과 scavenger protection이 과도하게 생성된 산화제에 의해 감소되게 된다. 따라서 많은 동물 실험들에서 오랜 기간의 근육 불사용 후에 산화적 스트레스가 촉진됨을 확인하고, 이에 대한 방어작용을 갖는 항산화제를 개발하기 위한 노력이 계속되었다. 예를 들어, 비타민 E와 같은 항산화제 투여는 불용성 근위축을 방지할 수 있는 것으로 보고되었는데<sup>2)</sup>, 흰쥐에 8일간의 후지고정에 의한 근위축에서 비타민 E는 산화손상의 지표인 glutathione 함량을 증가시키고 근섬유 단면적의 감소를 억제함으로써 근위축에 방어적인 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다<sup>31)</sup>. 본 연구에서는 당귀보혈탕의 항산화효과를 검증하기 위하여 근육의 장기적인 불사용에 의한 산화적 손상의 생화학적 지표로서 근육 안에서의 MDA의 함량을 측정하여 비교하였다. MDA는 지질과산화의 척도로써 불용성 근위축 손상에서 상승하는 것으로 보고되었다<sup>32)</sup>. 각 실험동물의 gastrocnemius에서의 MDA함량을 분석한 결과, Control군과 DGBHT군 모두에서 붕대고정을 시킨 왼쪽 후지에서 아무런 처치도 하지 않은 오른쪽에 비해 MDA의 함량이 증가하는 것으로 관찰되었다. 그러나, 유의성 있는 변화는 아니었으며 붕대고정을 시행한 왼쪽 gastrocnemius의 비교에서도 Control군과 DGBHT군 간에 유의성 있는 변화는 나타나지 않았다(Table IV).

이전 연구를 통해 14일간의 불용성 근위축 유발 후에 catalase와 total SOD에 대한 항산화효소의 활성이 변화되는 것으로 보고되었으며, 특히 Cu/Zn SOD가 현저히

증가하는 것으로 밝혀졌다<sup>33)</sup>. Cu/Zn superoxide dismutase (SOD)는 산소에 노출된 모든 세포 주변에서 항산화작용을 하는 효소로써, 상반변화(dismutation)이라 알려진 반응을 통해 superoxide radical을 제거함으로써 산화적 스트레스에 반응하는 중요한 세포인자이다. 본 연구에서 gastrocnemius 속에서의 Cu/Zn-SOD 활성 변화를 관찰한 결과, Control군과 DGBHT군 모두에서 후지고정을 시킨 왼쪽에서 아무런 처치도 하지 않은 오른쪽에 비해 Cu/Zn-SOD 활성이 현저히 증가하는 것으로 관찰되었다(Table V). 붕대고정을 시행한 왼쪽 gastrocnemius의 변화를 비교한 결과에서는 DGBHT군에서의 Cu/Zn-SOD 활성이 Control군에 비해 상대적으로 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 2주간의 당귀보혈탕 투여가 후지 고정으로 유발된 gastrocnemius의 위축에서 Cu/Zn-SOD 활성을 증가시킴으로써 산화적 손상에 대한 방어작용을 나타낸 것이라 할 수 있다. 이는 앞서 언급한 비타민 E의 근위축에 대한 방어효과와 마찬가지로 근육 불사용에 따른 산화적 손상을 억제하여 근위축에 대한 방어작용을 나타낸 것이다. 그에 따라 근섬유 단백질 감소를 억제함으로써 근육 단면적 감소와 근육 중량 감소에 보호작용을 나타낸 것으로 사료된다. 당귀보혈탕에 관한 이전의 실험연구들을 살펴보면, 다양한 질환과 환경에서의 항산화 효과에 대한 연구가 진행되었고, 유의미한 결과들이 보고되었다<sup>14,15)</sup>. 또한 그 구성 단미인 당귀와 황기의 항산화 작용에 대한 연구 또한 상당수 진행되었으며 연구 결과에서도 유의한 효과가 있는 것으로 밝혀졌다<sup>20,22)</sup>. 본 연구에서의 당귀보혈탕 투여가 불용성 근위축의 산화적 손상에 대한 방어효과를 나타낸 것은 이러한 당귀보혈탕 뿐 아니라 그 구성 약재인 당귀 및 황기의 개별적인 항산화 효과에 대한 연구와 깊은 관련성을 가지고 있다 사료된다.

정리하면, 2주간 흰쥐 오른쪽 발목관절을 붕대 고정하여 유발시킨 불용성 근위축에 당귀보혈탕 추출물이 gastrocnemius 근육 중량 감소와 근섬유 단면적 감소에 유의한 방어 작용을 나타내었으며, 그 기전은 Cu/Zn-SOD 활성을 증가시킴으로써 불용성 근위축의 주된 원인으로 주목받는 산화적 손상에 대한 억제에 의한 것임을 확인하였다. 다만, 본 연구에서는 산화적 손상에 대한 방어작용의 지표로서 근육 내에서의 MDA 함량과 SOD 활성만을 확인하였으나, 추후 지속적인 연구를 통해 당귀보혈탕의 항산화 효과 뿐 아니라 다른 지표들 혹은 분자적 차원에서

의 다른 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 예를 들어, 이전 연구결과에 따르면 근위축의 과정에 apoptosis 기전도 관여하는 것으로 알려졌는데<sup>34)</sup>, 황기는 심장 근육세포에서의 apoptosis를 억제하는 효능이 있는 것으로 밝혀졌다<sup>35)</sup>. 이러한 연관성을 통해 당귀보혈탕의 불용성 근위축에 대한 방어효과의 기전 연구가 추가되어야 할 것이다. 또한, 본 연구에서는 gastrocnemius 근육 만의 변화를 관찰하였으나, 그 외에 근위축 연구에 많이 사용되는 근육들 예를 들어, soleus, plantaris 등의 변화에 대해서도 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결론»»»»

본 연구는 불용성 근위축 손상에서 당귀보혈탕이 미치는 보호효과를 검증한 것으로, 흰쥐의 발목관절을 2주간의 붕대 고정하여 근육 불사용 위축의 상황을 유도하고 당귀보혈탕 물추출물을 경구투여하여 체중변화, gastrocnemius 근육의 중량, 근섬유 단면적 변화, 그리고 산화적 손상에 관련된 지표들을 측정하여 얻은 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

당귀보혈탕은 장기간의 근육 불사용으로 인한 실험동물의 체중변화에는 별다른 영향을 미치지 않았으나, gastrocnemius 근육 무게의 감소를 회복시켜주는 효과가 있었으며 동시에 근섬유의 단면적 감소를 억제시키는 것으로 확인되었다. 무게와 단면적 크기의 변화가 나타난 gastrocnemius 근육에서 산화적 손상과 관련된 지표인 MDA 함량과 Cu/Zn-SOD 활성을 측정하여 얻은 결과, MDA의 함량에는 유의한 영향을 미치지 않았으나 Cu/Zn-SOD 활성의 증가를 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 결과로 당귀보혈탕은 근육 불사용에 따른 근위축 변화에 유의한 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

## References»»»»

1. Metter EJ, Talbot LA, Schrager M, Conwit R. Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002;57(10):359-65.
2. Wall BT, van Loon LJ. Nutritional strategies to attenuate muscle disuse atrophy. *Nutr Rev.* 2013;71(4):195-208.
3. Wall BT, Dirks ML, van Loon LJ. Skeletal muscle atrophy during short-term disuse: implications for age-related sarcopenia. *Ageing Res Rev.* 2013;12(4):898-906.
4. Matsumoto Y, Nakano J, Oga S, Kataoka H, Honda Y, Sakamoto J, Okita M. The non-thermal effects of pulsed ultrasound irradiation on the development of disuse muscle atrophy in rat gastrocnemius muscle. *Ultrasound Med Biol.* 2014;40(7):1578-86.
5. Powers SK, Wiggs MP, Duarte JA, Zergeroglu AM, Demirel HA. Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303(1):31-9.
6. Powers SK, Smuder AJ, Judge AR. Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15(3):240-5.
7. Calvani R, Joseph AM, Adhietty PJ, Micheli A, Bossola M, Leeuwenburgh C, Bernabei R, Marzetti E. Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biol Chem.* 2013;394(3):393-414.
8. Marzetti E, Hwang JC, Lees HA, Wohlgemuth SE, Dupont-Versteegden EE, Carter CS, Bernabei R, Leeuwenburgh C. Mitochondrial death effectors: relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800(3):235-44.
9. Powers SK. Can antioxidants protect against disuse muscle atrophy? *Sports Med.* 2014;44:155-65.
10. Magne H, Savary-Auzeloux I, Rémond D, Dardevet D. Nutritional strategies to counteract muscle atrophy caused by disuse and to improve recovery. *Nutr Res Rev.* 2013;26(2):149-65.
11. Desaphy JF, Pierno S, Liantonio A, Giannuzzi V, Digennaro C, Dinardo MM, Camerino GM, Ricciuti P, Brocca L, Pellegrino MA, Bottinelli R, Camerino DC. Antioxidant treatment of hindlimb-unloaded mouse counteracts fiber type transition but not atrophy of disused muscles. *Pharmacol Res.* 2010;61(6):553-63.
12. Kozakowska M, Pietraszek-Gremplewicz K, Jozkowicz A, Dulak J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J Muscle Res Cell Motil.* 2015;36(6):377-93.
13. Lee SI. *Herbal Formula Science.* Seoul: Young Lim Sa; 1990:172.
14. Chiu PY, Leung HY, Siu AH, Poon MK, Dong TT, Tsim KW, Ko KM. Dang-Gui Buxue Tang protects against oxidant injury by enhancing cellular glutathione in H9c2 cells: role of glutathione synthesis and regeneration. *Planta Med.* 2007;73(2):134-41.
15. Li YD, Ma YH, Zhao JX, Zhao XK. Protection of ultra-filtration extract from Danggui Buxue Decoction on oxidative damage in cardiomyocytes of neonatal rats and its mechanism. *Chin J Integr Med.* 2011;17(11):854-9.



16. Gong AG, Li N, Lau KM, Lee PS, Yan L, Xu ML, et al, Calycosin orchestrates the functions of Danggui Buxue Tang, a Chinese herbal decoction composing of Astragali Radix and Angelica Sinensis Radix: An evaluation by using calycosin-knock out herbal extract. *J Ethnopharmacol* 2015;168:150-7.
17. Yang Y, Chin A, Zhang L, Lu J, Wong RW. The role of traditional Chinese medicines in osteogenesis and angiogenesis. *Phytother Res.* 2014;28(1):1-8.
18. Liu Y, Zhang HG, Li XH. A Chinese herbal decoction, Danggui Buxue Tang, improves chronic fatigue syndrome induced by food restriction and forced swimming in rats. *Phytother Res.* 2011;25(12):1825-32.
19. Xu J, E XQ, Liu HY, Tian J, Yan JL. Angelica Sinensis attenuates inflammatory reaction in experimental rat models having spinal cord injury. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):6779-85.
20. Lei T, Li H, Fang Z, Lin J, Wang S, Xiao L, Yang F, Liu X, Zhang J, Huang Z, Liao W. Polysaccharides from Angelica sinensis alleviate neuronal cell injury caused by oxidative stress. *Neural Regen Res.* 2014;9(3):260-7.
21. Yeh TS, Huang CC, Chuang HL, Hsu MC. Angelica sinensis improves exercise performance and protects against physical fatigue in trained mice. *Molecules.* 2014;19(4):3926-39.
22. Shahzad M, Shabbir A, Wojcikowski K, Wohlmuth H, Gobe GC. The Antioxidant Effects of Radix Astragali (Astragalus membranaceus and Related Species) in Protecting Tissues from Injury and Disease. *Curr Drug Targets.* 2016;17(12):1331-40.
23. Zhang L, Yang Y, Wang Y, Gao X. Astragalus membranaceus extract promotes neovascularisation by VEGF pathway in rat model of ischemic injury. *Pharmazie.* 2011;66(2):144-50.
24. Hong CY, Lo YC, Tan FC, Wei YH, Chen CF. Astragalus membranaceus and Polygonum multiflorum protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. *Am J Chin Med.* 1994;22(1):63-70.
25. Yeh TS, Chuang HL, Huang WC, Chen YM, Huang CC, Hsu MC. Astragalus membranaceus improves exercise performance and ameliorates exercise-induced fatigue in trained mice. *Molecules.* 2014;19(3):2793-807.
26. Lu L, Wang DT, Shi Y, Yin Y, Wei LB, Zou YC, Huang B, Zhao Y, Wang M, Wan H, Li CJ, Diao JX. Astragalus polysaccharide improves muscle atrophy from dexamethasone- and peroxide-induced injury in vitro. *Int J Biol Macromol.* 2013;61:7-16.
27. Udaka J, Terui T, Ohtsuki I, Marumo K, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Depressed contractile performance and reduced fatigue resistance in single skinned fibers of soleus muscle after long-term disuse in rats. *J Appl Physiol.* 2011;111(4):1080-7.
28. Shibaguchi T, Yamaguchi Y, Miyaji N, Yoshihara T, Naito H, Goto K, Ohmori D, Yoshioka T, Sugiura T. Astaxanthin intake attenuates muscle atrophy caused by immobilization in rats. *Physiol Rep.* 2016;4(15):1-8.
29. Midrio M. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol.* 2006;98(1):1-21.
30. Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol.* 2002;92(4):1367-77.
31. Appell HJ, Duarte JA, Soares JM. Supplementation of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy. *Int J Sports Med.* 1997;18(3):157-60.
32. Fujita R, Tanaka Y, Saihara Y, Yamakita M, Ando D, Koyama K. Effect of molecular hydrogen saturated alkaline electrolyzed water on disuse muscle atrophy in gastrocnemius muscle. *J Physiol Anthropol.* 2011;30(5):195-201.
33. Lawler JM, Song W, Demaree SR. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(1):9-16.
34. Dupont-Versteegden EE. Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia. *Exp Gerontol.* 2005;40(6):473-81.
35. Luo Z, Zhong L, Han X, Wang H, Zhong J, Xuan Z. Astragalus membranaceus prevents daunorubicin-induced apoptosis of cultured neonatal cardiomyocytes: role of free radical effect of Astragalus membranaceus on daunorubicin cardiotoxicity. *Phytother Res.* 2009;23(6):761-7.