



## 대방풍탕의 흰 쥐 비복근 불용성 근위축에 대한 억제 효과

김재훈<sup>ID</sup> · 이정희<sup>ID</sup> · 이초인<sup>ID</sup> · 이봉효<sup>ID</sup> · 이윤규<sup>ID</sup> · 이현종<sup>ID</sup> · 김재수<sup>ID</sup>

대구한의대학교 부속 한방병원 침구의학과

## The Suppressive Effects of *Daebangfung-tang* against Disuse Muscle Atrophy in Gastrocnemius of Rats

Jae Hoon Kim, Jung Hee Lee, Cho In Lee, Bong Hyo Lee, Yun Kyu Lee, Hyun-Jong Lee, Jae Soo Kim

Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

**Objectives :** The aim of this study is to evaluate the effect of *Daebangfung-tang* (DBFT) on suppressing muscle atrophy followed by immobilization. **Methods :** Twenty young male Sprague-Dawley rats were randomized into two groups. The rats in experimental group (DBFT group) were orally administrated DBFT once a day for 2 weeks, and the rats in control group were given normal saline in the same manner. The immobilization on left leg was carried out using casting tape. The morphologies of gastrocnemius in both groups were assessed. The cross sectional area of them was measured by image analyzer. Immunohistochemical staining was implemented and the numbers of immunopositive cells implying the expression of TNF- $\alpha$  were measured and quantified. **Results :** DBFT represented the significant suppressive effects against the weight loss of the left gastrocnemius muscle and the reduction in cross sectional area of the left gastrocnemius muscle compared with normal saline. Also the treatment with DBFT significantly reduced the expression of TNF- $\alpha$  in gastrocnemius compared with normal saline. **Conclusions :** DBFT is thought to have the significant suppressive effect against muscle atrophy followed by immobilization.

**Key words :** disuse muscle atrophy, *Daebangfung-tang*, gastrocnemius, TNF- $\alpha$

### 서론

근위축은 근육량 및 근력의 감소를 특징으로 하며, 관련 부위 운동능력 등의 기능상실을 초래하는 질환이다<sup>1)</sup>. 오랜 침상생활, 골절부위 고정 등 신체부위의 미사용 기간 동안에는 근위축이 발생한다. 이 기간 동안 골격근의 섬유 위축이 일어나며 전체적인 약화가 이루어진다.

다양한 요인으로 인하여 근육에 가해지게 되는 산화적 스트레스(oxidative stress)와 그로 인해 방출되기 시작하는 염증유발 사이

토카인(cytokine)들은 근육 세포의 감소 및 근육 조직의 손상을 유발한다. 이와 같이 근육이 약화되고 근육 단백질이 감소되는 과정은 모두 세포 내의 메커니즘과 관련이 있다고 알려져 있다<sup>2)</sup>. 여러 세포 내 메커니즘 중에서도 Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )에 주목하는 cytokine signaling pathway가 최근 조명받고 있다. TNF- $\alpha$ 는 활성화되면 근재생(myogenesis)을 억제하고 단백질 가수분해(proteolysis)를 유발하게 되는데, 이것이 결과적으로 근육의 감소 및 위축을 유발한다는 연구 결과들이 보고되고 있다<sup>3)</sup>. Kim<sup>4)</sup>, Chung 등<sup>5)</sup>, Fujita 등<sup>6)</sup>의 동물 실험 연구들은 근위축의

Received November 13, 2020, Revised December 7, 2020, Accepted December 11, 2020

Corresponding author: **Jae Soo Kim**

Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Daegu Oriental Hospital of Daegu Haany University, 136 Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu 42158, Korea

Tel: +82-53-770-2108, Fax: +82-53-770-2055, E-mail: jaice@daum.net

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Reactive Oxygen Species (ROS)의 생성이 증가하게 되면 근육세포의 세포자멸사(apoptosis) 진행이 촉진되어 위축이 진행된다는 기전을 연구하였고, Choi 등<sup>7)</sup>은 caspase cascade 활성화에서 이어지는 근육세포의 apoptosis의 기전을, Kim 등<sup>8)</sup>은 apoptosis를 유도하는 caspase-3와 근육세포를 분화시켜 근재생에 영향을 주는 Myoblast Determination protein (MyoD)의 상호작용을 평가하여 근위축 기전을 연구하였다. 이처럼 다양한 선행연구들이 근위축의 기전을 연구하였지만 국내에서의 기존 근위축의 연구들은 골격근에서의 산화 스트레스와 근육세포의 apoptosis를 연관시킨 기전 연구들 위주로 발표되었으며<sup>4,5)</sup>, TNF- $\alpha$ 를 중심으로 근위축을 평가한 연구는 미미한 실정이다.

대방풍탕은 宋代 의서인 《太平惠民和劑局方》에서 “但存皮骨, 如鶴膝之節. 拘攣跼蹙, 不能屈伸, 大防風湯主之”라고 기록된 이래 《醫學入門》, 《醫學正傳》, 《東醫寶鑑》 등의 의서에 소개되는 처방이다. Koo 등<sup>9)</sup>, Sung 등<sup>10)</sup>의 기존의 대방풍탕 연구들은 관절염 모델 및 관절염에 대한 효과를 중심으로 발표되었다.

하지가 약해지는 질환인 학슬풍(鶴膝風)에 쓰이는 대표적인 처방들 중 하나인 대방풍탕(大防風湯, *Daebangfung-tang*)은 풍을 몰아내고 기를 잘 돌게하며 혈맥을 잘 통하게 하고 근육과 뼈를 튼튼하게 하는 효능이 《東醫寶鑑》<sup>11)</sup>에 소개되어 있다. 국내외에서 대방풍탕을 근위축 및 痿證의 양상과 연관지어 설명한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 불용성 근위축(disuse muscle atrophy)에 대방풍탕이 미치는 영향을 확인하기 위하여 2주간 casting tape를 이용, 고정하여 유발된 흰 쥐의 불용성 근위축 모델에 매일 동일량의 대방풍탕을 경구투여 한 후 근육 증량의 측정, 해부조직학적 변화 관찰 및 면역조직화학염색, 근육의 변화 과정과 관련된 사이토카인들이 포함된 양상을 관찰하여 근위축에 대한 유의성 있는 억제 효과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

10주령, 약 250 g 가량의 Sprague-Dawley 흰 쥐 수컷을 (주)샘타코(경기도 오산, 대한민국)에서 구입하여 모델로 사용하였다. 23~24°C의 온도와 40~60%의 습도 및 12시간 명/암이 자동으로 조절되는 시설을 갖춘 사육실에서 무균 처리된 물과 사료를 공급하여 사육하였다. 흰 쥐들은 연구 이전 사육실 환경에 1주 이상 적응하게 한 후 연구모델로 사용하였다.

동의대학교 동물실험윤리위원회의 규정 및 방침에 따른 승인 하에 본 연구의 모든 과정이 진행되었음을 밝힌다(승인번호: R2019-012).

### 2. 군의 분리

대방풍탕을 투여하는 실험군(*Daebangfung-tang* group, 이하 DBFT 혹은 DBFT group)과 동일조건에서 동일량의 생리식염수를 투여하는 대조군(Control group 혹은 Control)으로 무작위로 흰 쥐들을 10마리씩 배정하여 분리하였다. 전체 실험기간 동안 물과 사료는 두 군 모두에서 자유롭게 섭취할 수 있게 환경을 조성하였다.

### 3. 약물의 제조 및 투여

연구에 사용된 대방풍탕은 《東醫寶鑑》<sup>11)</sup>에 기재된 용량에 준하여 사용하였다(Table 1). 연구에 사용된 대방풍탕의 구성 약제<sup>12)</sup>는 (주)나눔제약(경북 영천, 대한민국)을 통해 구입하였다. 4첩 분량인 200 g을 증류수 2 L와 함께 round flask에 담은 이후 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 가량 전탕하였다. 이후 얻어진 추출액을 여과지로 여과 후 감압농축, 동결건조시켰다. 이를 물 추출하여 추출액 37.4 g을 얻었다. 이 과정에서의 수득률은 약 18.7%였다.

실험 개시로부터 2주 동안 실험군에는 매일 오전 정해진 시간에 대방풍탕 물 추출액을 1회씩, 대조군에는 동일량의 생리식염수를 동일한 방식으로 경구투여 하였다. 투여량은 70 kg 체중의 일반 성인이 하루에 2첩을 복용할 때를 기준으로 정하여 이를 흰 쥐 체중당 복용분으로 환산하여 사용하였다. 위 방법에 따라 계산하여

Table 1. Herbal composition of *Daebangfung-tang*

Scientific name (herb)	weight (g)
Rehmannia glutinosa Liboschitz ex Steudel	6
Atractylodes japonica Koidzumi	4
Saposhnikovia divaricata Schischkin	4
Angelica gigas Nakai	4
Paeonia lactiflora Pallas	4
Eucommia ulmoides Oliver	4
Astragalus membranaceus Bunge	4
Aconitum carmichaeli Debeaux	2
Cnidium officinale Makino	2
Achyranthes japonica Nakai	2
Ostericum koreanum Maximowicz	2
Panax ginseng C. A. Meyer	2
Glycyrrhiza glabra Linne	2
Zingiber officinale Roscoe	4
Zizyphus jujuba Miller var. inermis Rehder	4
Total amount	50

흰 쥐 체중 100 g 당 26.7 mg을 1 ml 음용수에 녹여 경구 투여용 주사기를 이용하여 경구 투여하였다.

#### 4. 불용성 근위축 유발

흰 쥐의 왼쪽 발목관절을 2주 간 신전시켜 casting tape (type 82002A, 3M, USA)를 이용하여 고정, 불용성 근위축을 유발하였다. Casting tape는 일주일마다 한 번씩 교체하였다. 오른쪽 발목관절에는 아무런 처치도 하지 않았다.

#### 5. 체중 및 근육 무게의 변화 측정

매일 약물을 투여하기 직전에 실험동물의 체중 측정을 시행하였으며, 마지막 날에는 부검 직전에 시행하였다. 실험 개시 2주 후 실험 동물들의 안락사 과정을 거쳤으며, 이후 부검을 통해 실험동물의 양측 비복근을 분리 채취하여 중량을 측정하였다. 해당 실험동물의 체중을 측정한 이후 체중 100 g당 근육 무게를 계산하여 평가하였다. 각 실험군 별 비복근 근위축의 정도는 아래 계산식<sup>13)</sup>으로 측정하였다.

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

측정 이후의 근육조직은 해부조직학적 관찰 및 근육단면적 측정을 위해 근육의 중앙부분에서 약 3~5 mm 정도의 두께로 절편한 후 Dry ice에서 -50°C로 차갑게 만든 isopentane 용액에 동결시킨 후 -80°C에서 보관하였다.

#### 6. 해부조직학적 관찰 및 근육단면적 측정

동결 보관 근육조직에서 비복근의 중앙부분을 8 μm 두께로 연속하여 냉동 절편하였다. 이후 H&E 염색법을 시행, 현미경 관찰하에 사진촬영 하였다. 이후 영상분석용 Axiovision LE software (Carl Zeiss Vision, ver 4.2 USA)를 이용하여 해당 근육의 단면적 (cross sectional area)을 측정하였다. 각각의 근육조직의 근섬유를 최소 30개 이상 관찰, 측정된 것을 기준으로 각 실험군의 근섬유 평균 단면적을 평가하였다.

#### 7. 면역조직화학염색

자유부유(free floating)법<sup>14)</sup>을 사용하여 염색을 시행하였다. Primary antibody는 anti-TNF-α (ab7977, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; Abcam)를 사용, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석하였다. 이를 4°C에서 12시간 반응시킨 후 조직을 PBS로 씻어낸 다음, avidin-biotin immunoperoxidase의 방법(ABC

Vectastain Kit)<sup>15)</sup>을 통해 각 조직을 1시간 씩 반응시켰다.

면역반응 결과의 정량화 및 평가를 위해 200배 현미경 관찰하에서 동일한 면적 내의 면역 양성반응 세포 수의 측정값을 수치화하였다.

#### 8. 통계학적 분석

SAS (version 9.1.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 측정된 모든 자료를 통계 분석하였으며, Student's t-test를 통해  $p < 0.05$  및  $p < 0.01$ 의 유의수준으로 검증하였다. 평균±표준편차 (mean±standard deviation)로 모든 값을 표기하였다.

## 결 과

### 1. 체중의 변화

각 실험군의 흰 쥐에 발목고정 후 2주간의 실험기간 동안 대조군과 실험군 모두에서 시간에 따라 체중이 증가하는 양상을 보였다. 실험 시작일 평균 체중값은 대조군에서 247.2±8.9 g, 실험군에서 247.6±7.0 g이었으며, 2주 후 측정된 평균 체중값은 대조군에서 343.9±16.1 g, 실험군에서 347.9±30.6 g이었다. 실험군이 대조군에 비해 약간 증가하였으나 두 군 값 간 유의성 있는 차이는 없었다(Fig. 1).

### 2. 비복근 무게의 변화

실험 개시 2주 후 각 군별 양측 근육 비복근의 무게를 측정하고 그 값을 체중 100 g당으로 계산하여 비교하였다. 그 결과, 대조군에서는 오른쪽 비복근의 경우 512.7±25.1 mg/100 g로, 왼쪽 비복근의 경우 378.9±25.8 mg/100 g로 측정되었으며, 이는 유의성 있는 감소로 나타났다( $p < 0.01$ ). 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 무게의 감소량은 26.0±5.5%로 계산되었다.

한편, 2주 간 대방풍탕 추출물을 경구 투여한 실험군의 경우는 오른쪽 비복근의 무게가 516.9±25.3 mg/100 g, 왼쪽이 416.2±26.2 mg/100 g로 드러나 대조군과 마찬가지로 유의성 있는 감소가 나타났다( $p < 0.01$ ). 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 무게의 감소량은 19.3±6.2%로 계산되었다.

대조군과 실험군의 근육 무게의 감소량을 비교해 보면 실험군이 대조군에 비해 근위축의 정도에서 유의성 있는 차이를 나타냈다( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

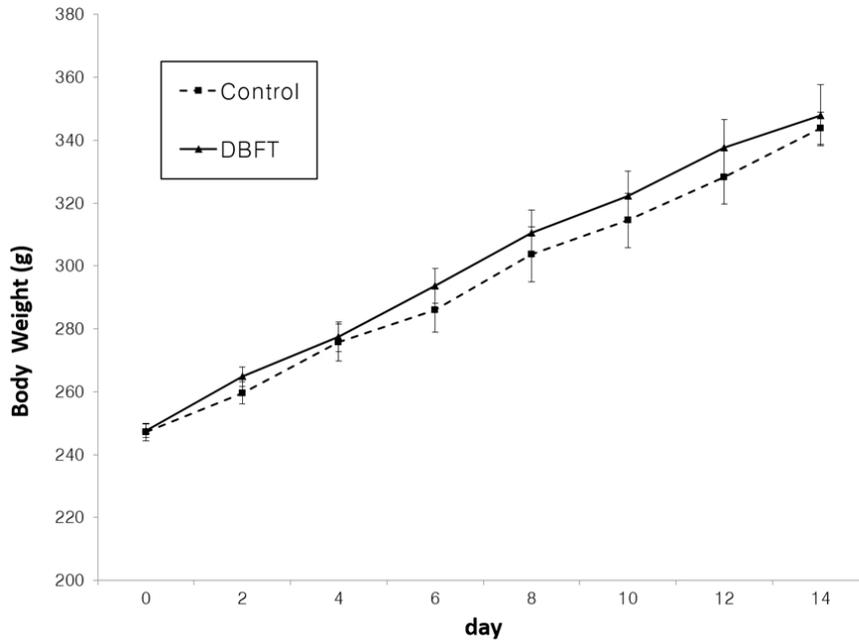


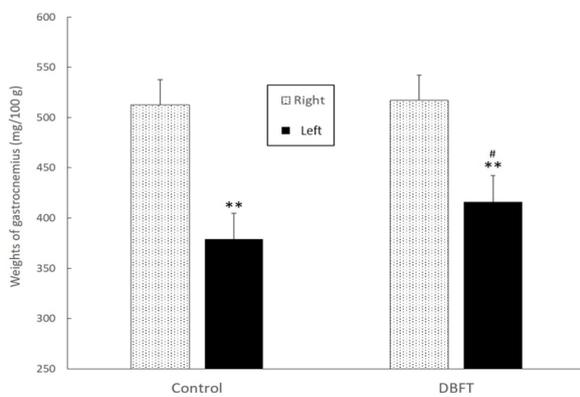
Fig. 1. Change in body weight after ankle joint fixation with casting tape (g).

Data were expressed as mean± standard deviation.

DBFT : group treated with *Daebangfung-tang* extract by freeze-drying and decompression concentration,

Control : group treated with normal saline.

Group	0	2	4	6	8	10	12	14
Control	247.2 ±8.9	259.6 ±11.3	275.7 ±18.7	285.9 ±22.1	303.7 ±27.4	314.5 ±27.3	328.2 ±27	343.9 ±16.1
DBFT	247.6 ±7.0	264.8 ±9.8	277.5 ±14.8	293.7 ±17.4	310.6 ±22.9	322.2 ±25	337.7 ±28	347.9 ±30.6



Group	Right (intact)	Left (disuse)	Atrophy ratio (%)
Control	512.7±25.1	378.9±25.8**	26.0±5.5
DBFT	516.9±25.3	416.2±26.2**	19.3±6.2*

Fig. 2. The effect of *Daebangfung-tang* on mean weights of left gastrocnemius in disuse muscle atrophy (mg/100 g).

Data were expressed as mean±standard deviation.

DBFT : group treated with *Daebangfung-tang* extract by freeze-drying and decompression concentration,

Control : group treated with normal saline.

\*\* $p < 0.01$  compared with right gastrocnemius by Student's t-test, # $p < 0.05$  compared with control group by Student's t-test.

### 3. 근육 단면의 해부조직학적 변화

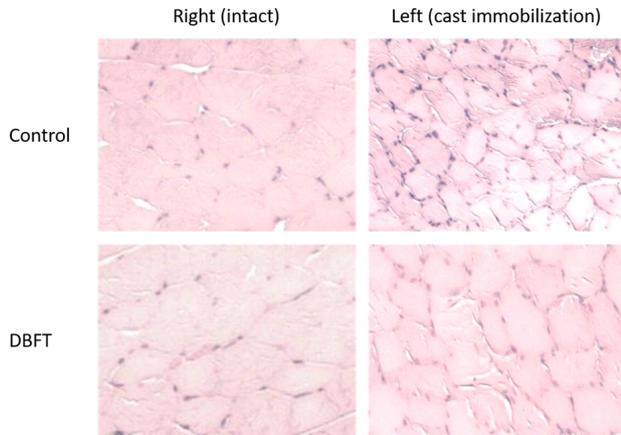
2주 간의 고정 후 채취한 비복근을 8  $\mu\text{m}$  두께로 냉동절편한 후, H&E 염색과정을 거쳐 근육 단면을 관찰한 결과, 대조군에서 오른쪽에 비해 왼쪽 비복근 근섬유의 크기가 감소된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 근섬유 주변에 핵(nucleus)의 응집이 다수 확인되어 전형적인 근위축 소견이 관찰되었다.

발목관절을 고정시키고 2주 간 대방풍탕을 투여한 실험군의 경우에서도 근섬유 크기 감소가 확인되었으나, 상대적으로 대조군에 비해 감소된 정도가 적은 편이었다. 또한, 핵의 응집도 줄어드는 양상으로 나타났다(Fig. 3).

### 4. 근섬유의 단면적 크기의 변화

채취한 비복근을 영상분석을 통해서 근섬유 단면적을 비교한 결과, 대조군의 오른쪽 비복근의 경우 4,426.2±81.3  $\mu\text{m}^2$ 로 측정된 반면, 고정했던 왼쪽 비복근의 경우 3,630.7±99.1  $\mu\text{m}^2$ 로 측정되어 유의성 있는 감소를 보였다( $p < 0.01$ ). 오른쪽에 대한 왼쪽의 평균 근육 단면적 감소량은 18.0±2.6%로 계산되었다.

실험군의 경우는 오른쪽 비복근의 단면적은 4,392.4±64.7  $\mu\text{m}^2$ 로, 왼쪽의 경우는 3,748.9±121.3  $\mu\text{m}^2$ 로 측정되어 대조군과 같



**Fig. 3. Photomicrographs of gastrocnemius sections in disuse muscle atrophy. H&E staining (×200 magnification).**

DBFT : group treated with *Daebangfung-tang* extract by freeze-drying and decompression concentration,  
Control : group treated with normal saline.

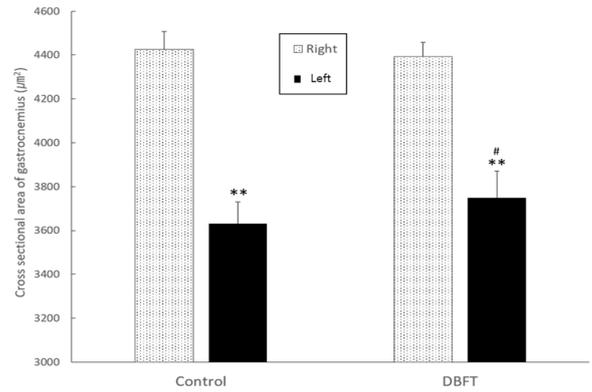
이 유의성 있는 감소를 보였다( $p < 0.01$ ). 오른쪽에 대한 왼쪽의 근육 단면적의 평균 감소량은  $14.6 \pm 3.4\%$ 로 계산되었다.

대조군과 실험군의 근육 단면적의 감소를 비교해 보면 실험군이 대조군에 비해 근위축의 정도에 유의성 있는 차이가 나타났다( $p < 0.05$ ) (Fig. 4).

### 5. TNF- $\alpha$ 의 변화

면역조직화학 염색을 통해 TNF- $\alpha$ 의 발현을 관찰한 결과, 대조군의 경우 고정했던 왼쪽 비복근에서 오른쪽에 비해 TNF- $\alpha$ 의 발현의 증가가 나타났다. 실험군에서도 마찬가지로 왼쪽 비복근에서 오른쪽에 비해 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가된 결과를 보였으나 대조군에 비해 유의성 있는 차이가 나타났다(Fig. 5).

또한 TNF- $\alpha$ 의 발현 정도를 정량화하기 위해 면역양성반응 세포수를 측정, 수치화하였다. 대조군의 경우 오른쪽 비복근에서  $13.8 \pm 1.6/105 \mu\text{m}^2$ , 왼쪽 비복근에서는  $23.1 \pm 2.6/105 \mu\text{m}^2$ 로 유의성 있는 증가가 나타났다( $p < 0.01$ ). 실험군의 경우에서도 오른쪽 비복근에서  $14.6 \pm 1.4/105 \mu\text{m}^2$ , 왼쪽 비복근에서  $19.6 \pm 3.4/105 \mu\text{m}^2$ 로 관찰되어 대조군에서도 마찬가지로 유의성 있는 증가를 보였다( $p < 0.01$ ). 대조군과 실험군을 비교한 결과, 오른쪽 비복근에서는 두 군 간 발현의 유의성 있는 차이는 나타나지 않았으나, 왼쪽 비복근에서는 실험군이 대조군에 비해 유의성 있는 차이가 나타났다( $p < 0.05$ ) (Fig. 6).



Group	Right (intact)	Left (disuse)	Atrophy ratio (%)
Control	4,426.2±81.3	3,630.7±99.1**	18.0±2.6
DBFT	4,392.4±64.7	3,748.9±121.3**	14.6±3.4#

**Fig. 4. Effect of *Daebangfung-tang* on cross sectional area of gastrocnemius in disuse muscle atrophy ( $\mu\text{m}^2$ ).**

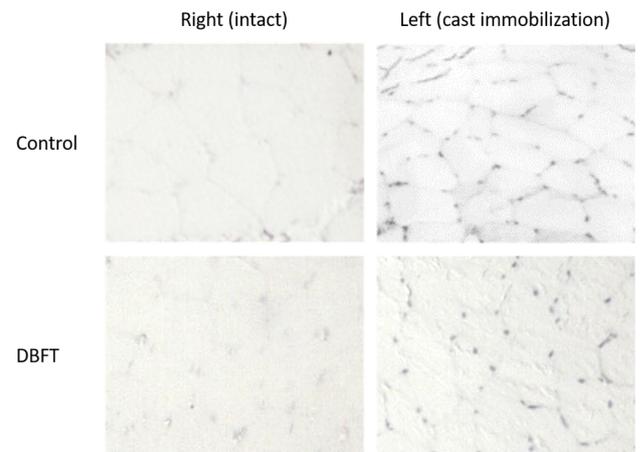
Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

DBFT : group treated with *Daebangfung-tang* extract by freeze-drying and decompression concentration,

Control : group treated with normal saline.

\*\* $p < 0.01$  compared with right gastrocnemius by Student's t-test,

# $p < 0.05$  compared with control group by Student's t-test.



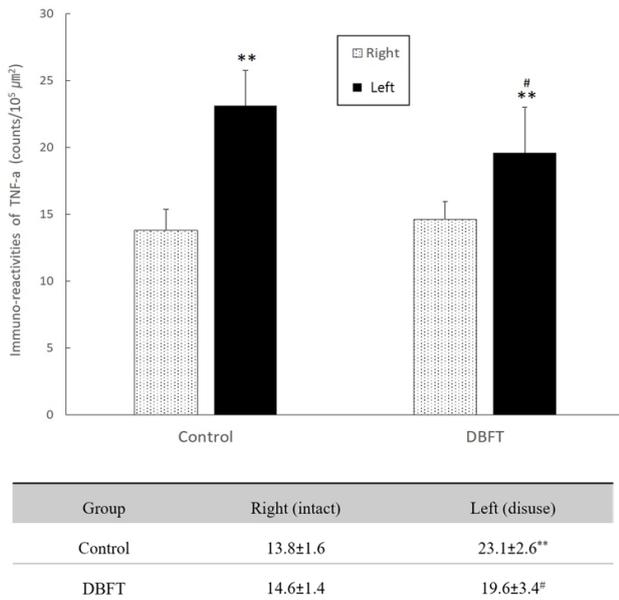
**Fig. 5. Representative photographs of TNF- $\alpha$  immunoreactivities of gastrocnemius muscles in disuse muscle atrophy (×200 magnification).**

DBFT : group treated with *Daebangfung-tang* extract by freeze-drying and decompression concentration,

Control : group treated with normal saline, TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$ .

### 고찰

근위축은 약물, 말초신경의 손상, 특정 질환 등의 여러 상황에서 유발될 수 있다. 근위축에 영향을 주는 많은 인자들 중 신체부위 고정 및 활동제한, 즉 불용(不用)으로 근육에 주어지는 자극 감소가



**Fig. 6. Quantitative analysis of TNF- $\alpha$  immunoactivities of gastrocnemius muscles in disuse muscle atrophy (counts/10<sup>5</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup>).** Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. DBFT : group treated with *Daebangfung-tang* extract by freeze-drying and decompression concentration, Control : group treated with normal saline, TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$ , \*\* $p$ <0.01 compared with right gastrocnemius by Student's t-test, # $p$ <0.05 compared with control group by Student's t-test.

원인이 되는 불용성 근위축은 임상에서 골절치료를 위한 관절 고정 후 흔하게 발생한다<sup>4-6)</sup>. 이 근위축은 환자의 일상생활 영위에 필요한 최소한의 활동에도 제한을 끼치며 삶의 질 저하를 유발하는 등의 문제가 있지만<sup>7)</sup>, 이차적으로 관절손상, 골조소증과 같은 합병증이 일어날 수 있어 임상적으로 주의를 요한다.

근위축은 근재생의 저하 및 단백질 가수분해의 촉진의 상호 작용과 그 기전이 연관된다고 알려져 있다<sup>8,16)</sup>. 염증반응 및 면역반응을 매개하고 유도하는 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 도 최근 근위축 및 손실의 기전에 영향을 준다는 연구들이 보고되고 있다<sup>3,17)</sup>.

근위축은 한의학적인 관점으로 보았을 때 '痿證'에 해당된다.痿證은 四肢 筋脈의 이완, 手足의 痿軟無力과, 근육이 위축되는 증상을 특징으로 하며, 대부분의 경우에 진행성의 경과를 보인다<sup>18)</sup>.痿證은 비단 위축에만 국한되지 않고, 현대의학에서 근육의 痿弱이 주 증상이 되는 신경병증, 관절, 근육 혹은 신경에 유발되는 염증, 파킨슨병, 중풍 후유증 등에도 해당된다고 보고 있다<sup>19)</sup>.

따라서 본 연구에서는 불용성 근위축에 대방풍탕이 미치는 영향을 확인하기 위하여 2주간 casting tape를 이용, 고정하여 유발된 흰 쥐의 비복근 불용성 근위축 모델을 사용하였다. 대방풍탕을 경

구로 투여한 실험군과 생리식염수를 투여한 대조군으로 나누어 근육 증량의 측정, 해부조직학적 변화 및 면역조직화학염색을 통한 TNF- $\alpha$ 의 발현 정도를 관찰하여 대방풍탕의 근위축에 미치는 영향을 평가하였다.

비복근은 slow와 fast myosin-heavy chain의 근섬유 유형을 모두 포함하고 있는 근육이다. 불용성 근위축은 여러 근섬유 유형이 혼합된, 비복근과 같은 근육에서 상대적으로 많이 유발된다고 보고된 바 있다<sup>20,21)</sup>. 게다가 비복근을 통한 연구 결과는 다른 근육들에도 쉽게 적용해 볼 수 있다는 장점까지 있어, 비복근 이외 근육들로 근위축을 평가한 여러 연구들<sup>22,23)</sup>에도 연관되어 볼 수 있다. 이런 이유로 근위축 연구 모델에서는 비복근을 주로 평가에 이용하게 된다고 알려져 있다<sup>20,21)</sup>.

2주 간의 실험 기간동안 두 군에서 체중 변화에 유의성 있는 차이는 보이지 않았다(Fig. 1). 또한 대조군과 실험군에서 모두 오른쪽 비복근에 비해 왼쪽 비복근 무게가 유의성 있는 감소를 보였다. 또한 왼쪽 비복근의 무게는 실험군에서 대조군에 비해 근육 무게의 감소가 유의성 있게 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 2). Shibaguchi 등<sup>13)</sup>의 방법에 따른 오른쪽에 대한 왼쪽 비복근 무게를 평가하기 위하여 근위축 비율을 계산 후 비교한 결과에서도 유의성 있는 차이를 보였다(Fig. 2).

체중의 비교로 해당 근육의 무게가 체중의 감소로 인한 영향을 배제할 수 있다. 실험 결과 상 체중의 변화에는 유의성 있는 차이가 없었으며, 왼쪽 비복근을 비교한 근위축 비율에서 실험군에 유의성 있는 억제 효과가 나타났다. 이로 보았을 때 비복근 무게의 감소는 체중으로 인한 것이 아니며, 대방풍탕이 비복근 무게의 감소를 유의성 있게 억제하였기 때문이라고 사료된다.

대조군과 실험군에서 채취한 왼쪽 비복근의 해부조직학적 변화를 관찰한 결과에서도 실험군이 대조군에 비해 상대적으로 근섬유 크기의 감소가 적고, 근섬유 주변 핵의 응집도 비교적 적게 나타나는 결과를 보였다(Fig. 3). 비복근 단면적의 변화를 측정, 비교한 결과에서는 대조군은 왼쪽 비복근이 오른쪽 비복근에 비해 유의성 있는 단면적 감소율을 보였으며, 실험군도 대조군에 비해 더 낮은, 유의성 있는 단면적의 감소를 보였다. 대조군과 실험군을 비교했을 때 실험군이 대조군에 비해 근육 단면적 감소를 유의성 있게 억제하였다고 사료된다(Fig. 4).

근섬유에서의 핵 응집의 발현이 증가하는 것은 근육 기능의 결손 혹은 감소의 결과를 제시한다고 할 수 있다<sup>24)</sup>. 핵 응집의 발현이 감소되었다는 것은 실험군의 비복근 기능의 감소가 억제되며 근위축이 유의성 있게 억제되는 소견과 부합한다.

실험동물의 뒷다리 고정에 의한 근육 증량의 감소는 근섬유의

감소 때문이라는 연구 보고가 있다<sup>22)</sup>. 이는 해부조직학적 변화를 관찰 했을 때 근섬유의 단면적 크기 변화에 유의성 있는 차이가 있는 본 실험 결과와 부합한다. 비복근 무게의 감소는 근섬유의 감소로 인한 것으로 사료된다.

TNF- $\alpha$ 는 TNF Receptor-1 (TNFR1)과 TNF Receptor-2 (TNFR2)와 결합하여 여러 반응을 유도한다. 이 중 TNFR1이 근위축 및 손실 반응을 주로 매개하며, 이는 두 가지 경로를 통해 작용한다.

TNFR1이 활성화되면 TNFR1-associated via death domain (TRADD)를 통해서 Fas associated protein with death domain (FADD)/Caspase 8 pathway를 통하여 apoptosis를 유발하여 근위축을 유발하게 되는 것이 첫 번째 경로이다. 다른 경로를 통해서 TNFR1이 활성화되면 TRADD에서 Receptor Interacting Protein (RIP)/TNFR-Associated Factor-2 (TRAF2)/Inhibitor- $\kappa$   $\beta$  Kinase complex (IKK) 경로를 통하여 NF- $\kappa$   $\beta$ 를 활성화 시킬 수 있다. NF- $\kappa$   $\beta$ 는 활성화 되면 ubiquitin-proteasome pathway를 통해서 단백질의 가수분해를 유발하고 MyoD를 억제하여 근재생을 담당하는 근육위성세포의 활성화를 억제하게 되어 근위축이 이루어지게 된다.

TNFR2는 death domain이 없어 caspase pathway를 따라 apoptosis를 일으키지는 못하지만 TRAF2를 직접 자극하여 NF- $\kappa$   $\beta$ 를 활성화 시키거나 NF- $\kappa$   $\beta$  Inducing Kinase (NIK)를 통하여 IKK 경로를 통해 NF- $\kappa$   $\beta$ 를 활성화 시켜 근위축을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>17,25,26)</sup>. 최근 연구결과를 통해 TNFR2는 Endothelial tyrosine kinase (Etk) 경로를 통해 근재생에 기여한다는 것이 밝혀졌지만, TNFR2만 자극한 쥐에게서도 근육량이 감소하였다는 연구결과가 있어 TNFR2의 경로가 TNF- $\alpha$ 로 인해 활성화 되어 근위축을 유발한다는 사실에는 변함이 없음으로 보고되었다<sup>25,26)</sup>.

대조군의 경우 고정했던 왼쪽 비복근에서 TNF- $\alpha$ 의 발현을 의미하는 양성반응세포수가 증가하였다. 실험군의 경우에도 오른쪽에 비해 증가한 결과값이 도출되었지만, 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 보였다. 왼쪽 비복근에서의 TNF- $\alpha$ 의 발현을 비교하면, 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5, 6). 따라서 대방풍탕은 TNF- $\alpha$ 의 발현 정도를 유의성 있게 억제하는 기전을 통해 불용성 근위축에 억제 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

위와 같이 본 연구에서 흰 쥐의 불용성 근위축 모델에 대방풍탕을 경구투여 한 후, 체중변화, 비복근 근육의 무게, 근섬유 단면적 변화, 그리고 apoptosis와 연관된 TNF- $\alpha$ 의 변화를 관찰한 결과,

대방풍탕은 근위축에 대한 유의성 있는 억제 효과가 있는 것으로 사료된다.

근위축에 대한 다른 기전들이 지속적으로 보고되고 있는 실정에서, 대방풍탕의 근위축을 억제하는 다른 기전에 대한 추가적인 연구도 필요하다. 본 연구에서 논한 TNF- $\alpha$  및 그 수용체와 관련된 기전, 그 이외 기전에 대해서도 대방풍탕의 구체적인 기전 연구가 필요할 것으로 사료된다. 동물 실험에서 불용성 근위축은 apoptosis 및 단백질 가수분해의 증가, 근재생 감소의 두 가지가 주된 원인이며, 인체에서는 단백질 합성의 감소가 근위축의 주된 원인이라는 연구결과<sup>27)</sup>가 있어 대방풍탕의 단백질 합성에 관한 연구 또한 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구는 불용성 근위축에 대방풍탕이 미치는 효과를 알아보기 위하여, 흰 쥐의 발목관절을 2주간의 고정을 통해 불용성 근위축의 상황을 유도하고 대방풍탕을 투여하였다. 체중변화, 비복근 근육의 무게, 근섬유 단면적 변화, 그리고 apoptosis와 연관된 TNF- $\alpha$ 의 변화를 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대방풍탕은 흰 쥐에서 왼쪽 비복근의 고정 이후 나타난 체중의 변화에 영향을 미치지 않았다.
  2. 대방풍탕은 비복근 근육 무게의 감소를 유의성 있게 억제하였다.
  3. 대방풍탕은 비복근 근섬유의 단면적 감소를 유의성 있게 억제하였다.
  4. 대방풍탕은 TNF- $\alpha$ 의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
- 이와 같은 결과로 대방풍탕은 불용성 근위축 억제에 유의성 있는 효과가 있는 것으로 사료된다.

## Acknowledgement

None.

## Funding

None.

## Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

## Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

## References

1. Alway SE, Bennett BT, Wilson JC, Sperringer J, Mohamed JS, Edens NK, et al. Green tea extract attenuates muscle loss and improves muscle function during disuse, but fails to improve muscle recovery following unloading in aged rats. *J Appl Physiol*. 2015 ; 118(3) : 319-30. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00674.2014>
2. Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2006 ; 33(2) : 155-65. <https://doi.org/10.1002/mus.20442>
3. Hur J, Kim M, Choi SY, Jang YJ, Ha TY. Isobavachalcone attenuates myotube atrophy induced by TNF- $\alpha$  through muscle atrophy F-box signaling and the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 cascade. *Phytother Res*. 2019 ; 33(2) : 403-11. <https://doi.org/10.1002/ptr.6235>
4. Kim BH. The Effects of Acupuncture at GB34 on Disuse Muscle Atrophy in Rats. *J Korean Med Rehabil*. 2018 ; 28(4) : 1-9. <https://doi.org/10.18325/jkmr.2018.28.4.1>
5. Chung YJ, Lee YK, Lee BH, Kim JS, Lee HJ. The Protective Effects of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim Pharmacopuncture on Disuse Muscle Atrophy in Rat Gastrocnemius Muscle. *J Acupunct Res*. 2019 ; 36(4) : 238-44. <https://doi.org/10.13045/jar.2019.00199>
6. 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. <https://doi.org/10.2114/jpa2.30.195>
7. Choi YH. Effects of Schisandrae Fructus Supplementation on Apoptosis and Inflammatory Response in Gastrocnemius Muscle of Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy Mice. *Herb Formula Sci*. 2017 ; 25(3) : 363-74. <https://doi.org/10.14374/HFS.2017.25.3.363>
8. Kim HJ, Ahn SH, Park SY. The Effects of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* on Osteoporosis and Muscle Dystrophy of Male Mice. *J Int Korean Med*. 2019 ; 40(1) : 1-12. <https://doi.org/10.22246/jikm.2019.40.1.1>
9. Koo ST, Hwang JH, Sohn IC, Kim KS. Effect of Daebangpungtang herbal acupuncture on the carrageenan-induced arthritis in rats. *Korean J Acupunct*. 2005 ; 22(3) : 83-104.
10. Sung BG, Park YI, Kim JJ, Kim MS, Kim NK, Lim KS. Analgesic Effect of Daebangpung-tang on a Rat Model of Adjuvant-induced Arthritis. *Korean J Oriental Medical Physiology & Pathology*. 2002 ; 16(1) : 124-32.
11. Heo J. *Donguibogam*. 1st ed. Seoul : Bubin Publishers Company. 2005: 583.
12. Herb-med DB information. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. Available from URL: [http://www.nifds.go.kr/herb/m\\_442/list.do](http://www.nifds.go.kr/herb/m_442/list.do)
13. Shibaguchi T, Yamaguchi Y, Miyaji N, Yoshihara T, Naito H, Goto K, et al. Astaxanthin intake attenuates muscle atrophy caused by immobilization in rats. *Physiol Rep*. 2016 ; 4(15) : e12885. <https://doi.org/10.14814/phy2.12885>
14. Shin KM, Ko IG, Kim SE, Jin JJ, Hwang L, Kim SH, et al. Low-frequency electroacupuncture improves locomotor function after sciatic crushed nerve injury in rats. *J Exerc Rehabil*. 2018 ; 14(6) : 927-33. <https://doi.org/10.12965/jer.1836594.297>
15. Shao L, Liu Y, Xiao J, Wang Q, Liu F, Ding J. Activating metabotropic glutamate receptor-7 attenuates visceral hypersensitivity in neonatal maternally separated rats. *Int J Mol Med*. 2019 ; 43(2) : 761-70. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.4022>
16. Seo YJ, Lew JH. The Effect of Red Ginseng on Sarcopenic Rat. *J Int Korean Med*. 2018 ; 39(6) : 1168-80. <https://doi.org/10.22246/jikm.2018.39.6.1168>
17. Reid MB, Li Y. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res*. 2001 ; 2(5) : 269-72. [doi.org/10.1186/rr67](https://doi.org/10.1186/rr67)
18. Jung TS, Kang SS, Choi CW. Clinical study on 1 case of both lower limbs weakness patient diagnosed wei symptom. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2012 ; 26(5) : 784-7.
19. Ko HJ, Shin JC. A Case Report of Rhabdomyolysis Patient Treated

- with Traditional Korean Medicine. *Korean J Acupunct.* 2017 ; 34(3) : 172-8. <https://doi.org/10.14406/acu.2017.019>
20. Midrio M. The denervated muscle: Facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol.* 2006 ; 98(1) : 1-21. <https://doi.org/10.1007/s00421-006-0256-z>
21. Matsumoto Y, Nakano J, Oga S, Kataoka H, Honda Y, Sakamoto J, et al. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2013.12.031>
22. Udaka J, Terui T, Ohtsuki I, Marumo K, Ishiwata S, Kurihara S, et al. 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. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00330.2011>
23. Yoon BC, Yu BK, Lee MH. Exercise effects on the atrophy of denervated muscles in rat. *Phys Ther Korea.* 2000 ; 7(3) : 34-48.
24. Volk T, Wang S. Protection of muscle nuclei. *Oncotarget.* 2015 ; 6(27) : 23046-7. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5240>
25. Zhou J, Liu B, Liang C, Li Y, Song YH. Cytokine Signaling in Skeletal Muscle Wasting. *Trends Endocrinol Metab.* 2016 ; 27(5) : 335-47. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.03.002>
26. Powers SK, Lynch GS, Murphy KT, Reid MB, Zijdewind I. Disease-Induced Skeletal Muscle Atrophy and Fatigue. *Med Sci Sports Exerc.* 2016 ; 48(11) : 2307-19. [10.1249/MSS.0000000000000975](https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000975)
27. Phillips SM, Glover EI, Rennie MJ. Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2009 ; 107(3) : 645-54. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00452.2009>